



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Caracterização de isolados de *Corynespora cassicola* e avaliação
da sensibilidade *in vitro* a fungicidas**

Frederick Mendes Aguiar

Brasília - DF

2015

Frederick Mendes Aguiar

Caracterização de isolados de *Corynespora cassicola* e avaliação da sensibilidade *in vitro* a fungicidas

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Orientador

Ailton Reis, Dr.

Brasília

Distrito Federal - Brasil

FICHA CATALOGRÁFICA

Aguiar, Frederick Mendes

Caracterização de isolados de *Corynespora cassiicola* e avaliação da sensibilidade *in vitro* a fungicidas. Orientação: Ailton Reis. 2015. 109p.

Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1 - mancha-alvo. 2 - ITS; fator de alongação 1- α e β -tubulina. 3 - morfologia e patogenicidade.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Aguiar, F.M. 2015. Caracterização de isolados de *Corynespora cassiicola* e avaliação da sensibilidade *in vitro* a fungicidas. Brasília, Universidade de Brasília, Tese de Doutorado. 109p.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Frederick Mendes Aguiar

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Caracterização de isolados de *Corynespora cassiicola* e avaliação da sensibilidade *in vitro* a fungicidas

GRAU: DOUTOR ANO: 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. Ao autor reservam-se os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Aos meus pais Deusdedit Mendes e Maria da Glória, meus irmãos Hericka e Patrick, aos cunhados e meu sobrinho Bruno pelo apoio e carinho que nunca me faltaram.

OFEREÇO

A minha noiva Danielle, pelo amor, compreensão, paciência, ajuda e dedicação. Ao Prof. Dr. Ailton Reis pelo constante apoio, incentivo e amizade, bem como pelo exemplo de dedicação ao saber.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, saúde, amor eterno, força suprema e inspiração, recebidos nesta minha vida;

Aos meus pais, irmãos, avó, sobrinho, afilhados, cunhados, tios, primos e familiares pelo apoio em todos os momentos da minha trajetória;

A minha noiva Danielle, o grande amor da minha vida, com quem irei me casar em breve, por ser esta pessoa tão especial na minha vida, por me ajudar sempre que preciso, pelo apoio nos momentos difíceis, pela compreensão transmitida nos momentos de ausência, por suportar e ficar sempre ao meu lado e pelo amor que sente por mim;

Ao meu orientador Dr. Ailton Reis pelos ensinamentos, por seu incentivo, disponibilidade e apoio sempre, pela paciência, por seu exemplo de ética e dedicação à profissão, além da indiscutível amizade e confiança conquistada durante esse período;

À Universidade de Brasília (UnB) pelo apoio institucional, à University of Florida (Gulf Coast Research and Education Center) e à Embrapa Hortaliças (CNPq) pelo acolhimento, serviços prestados e estrutura oferecida;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília pelo profissionalismo e amizade dispensados durante o período em que estive na instituição;

Aos colegas da turma de fitopatologia 2011-2015 da UnB, em especial a minhas amigas Amanda e Larissa, por todos os momentos de alegria e superação vividos durante o doutorado;

Aos pesquisadores da Embrapa Hortaliças, em especial ao Dr. Carlos Lopes pela amizade, confiança, compreensão e ensinamentos oferecidos no decorrer dessa tese;

Aos funcionários da Embrapa Hortaliças, em especial a Fabiana e Luana, pela ajuda, amizade eterna e convivência durante minha pesquisa;

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças: Edivânio (ensinamentos oferecidos), Maurício, Luiz, Cléia, Elenice, Jeferson, Malurriê, Michele, Túlio, Amanda e Wagner pelos momentos agradáveis, pela amizade e ajuda recebida durante esse período;

Aos pesquisadores da Embrapa hortaliças Dra. Maria Esther Boiteux e Dr. Leonardo Boiteux pela utilização da infraestrutura do laboratório de genômica e melhoramento vegetal, aos vários ensinamentos oferecidos e convivência durante minha pesquisa.

Ao colega Márcio Adalberto, pela amizade construída nesse tempo de convivência;

Aos pesquisadores da University of Florida (Gulf Coast Research and Education Center), principalmente ao Dr. Gary Vallad pela amizade, confiança, orientação, paciência, compreensão e aos vários ensinamentos oferecidos no decorrer do doutorado sanduíche;

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da University of Florida: Ai-vy, Steve, Scott, Sujan, Jack, Heather, Rebecca Willis, Sammi, Michelle Philpot, Micky, Julie, Michelle, Isabela, Bruna, em especial ao meu grande amigo Tyler Jacoby pela receptividade, parceria, ajuda sempre que necessária, paciência, confiança e principalmente por grande amizade;

A CAPES e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo;

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Pesquisador Ph.D. **Ailton Reis**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Caracterização de isolados de *Corynespora cassiicola* e avaliação da sensibilidade *in vitro* a fungicidas

Frederick Mendes Aguiar

TESE APROVADA em __/__/____ por

Professor, Doutor Cleber Furlanetto (Universidade de Brasília)
Examinador Interno

Professor, Doutor Helson Mario Martins do Vale (Universidade de Brasília)
Examinador Interno

Pesquisadora, Doutora Fernanda Rausch Fernandes (Embrapa Quarentena Vegetal)
Examinadora Externa

Pesquisadora, Doutora Mirtes Freitas Lima (Embrapa Hortaliças)
Examinadora Externa

Pesquisador, Ph.D. Carlos Alberto Lopes (Embrapa Hortaliças)
Suplente

Pesquisador, Ph.D. Ailton Reis (Embrapa Hortaliças)
Orientador (Presidente)

Brasília - Distrito Federal
Brasil
2015

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Resumo Geral.....	iv
General Abstract.....	vi
Capítulo 1. Introdução Geral e Revisão de Literatura.....	1
A cultura do tomate.....	2
A cultura do pepino.....	4
Mancha-alvo.....	5
Etiologia.....	6
Caracterização.....	8
Ocorrência.....	10
Sobrevivência e disseminação.....	11
Sintomatologia.....	12
Controle.....	13
Justificativas e Hipóteses.....	16
Objetivos: geral e específicos.....	17
Referências.....	18
Capítulo 2. Variabilidade genética, morfológica e patogênica de isolados de <i>Corynespora</i> do Brasil e da Flórida.....	28
Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	34
Resultados e Discussão.....	44
Referências.....	66
Capítulo 3. Sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i>, provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas, a fungicidas.....	75
Resumo.....	76
Abstract.....	77
Introdução.....	78
Material e Métodos.....	81
Resultados e Discussão.....	86
Referências.....	102

Conclusões Gerais.....	108
Perspectivas Futuras.....	109

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Origem geográfica e espécie hospedeira dos isolados de <i>Corynespora</i> utilizados nas análises filogenética, morfométrica e patogênica.....	35
Tabela 2. Caracterização visual e Taxa de crescimento micelial (mm/d) de colônias de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> aos 5 dias de incubação.....	57
Tabela 3. Comprimento (μm), largura (μm) e números de pseudoseptos dos conídios de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> aos 5 dias de incubação.....	61
Tabela 4. Patogenicidade de três isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> a diferentes espécies de plantas de importância econômica.....	65

Capítulo 3

Tabela 1. Origem geográfica e espécie hospedeira dos isolados utilizados no teste de sensibilidade a fungicidas.....	82
Tabela 2. Determinação da dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial de isolados de <i>C. cassiicola</i> em 50% (DE50) aos fungicidas clorotalonil, tebuconazole e carbendazim.....	88
Tabela 3. Determinação da dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial de isolados de <i>C. cassiicola</i> em 50% (DE50) aos fungicidas pyrimethanil, fludioxonil e cyprodinil.....	91
Tabela 4. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) de isolados de <i>C. cassiicola</i> provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil a nove diferentes fungicidas.....	95
Tabela 5. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil.....	98

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Sintomas de mancha-alvo em folha de tomate (A), em fruto de tomate (B) e em folha de pepino (C)..... 13

Capítulo 2

- Figura 1.** Mapa do Brasil apresentando o local de coleta dos isolados de *C. cassiicola*..... 38

- Figura 2.** Gel de agarose (1,5%) mostrando o produto da PCR obtido com os primers ITS4/ITS5 (A), tub-F1/tub-R2 (B) e EF1-728F/EF1-986R (C), compreendendo as regiões genômicas ITS, fator de alongação 1- α e β -tubulina de *Corynespora cassiicola* originados de diferentes regiões e hospedeiras. Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (M)..... 44

- Figura 3.** Árvore filogenética de 104 sequências de ITS gerada a partir de análise de Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 réplicas não paramétricas de bootstrap. Foram utilizadas 93 sequências dos isolados do Brasil e da Flórida, 10 sequências (AB539456.1 - *Perilla frutescens* L., Japão; AB539444.1 - *Cucumis sativus* L., Japão; AB539447.1 - *Solanum lycopersicum* L., Japão; AB539450.1 - *Solanum melongena* L., Japão; AB539448.1 - *Capsicum annum*. L., Japão; AB539462.1 - *Capsicum annum*. L., Japão; JQ814329.1 - *Hevea brasiliensis* L., Brasil; JN545761.1 - *Malvaviscus concinnus* Kunth, Equador; KF810910.1 - *Hydrangea macrophylla* T., Brasil; KF266787.1 - *Solanum lycopersicum* L., Brasil) dos isolados de *C. cassiicola* depositadas no GenBank e a sequência do isolado de *C. smithii* NBRC8162 que foi utilizado como *outgroup*..... 47

- Figura 4.** Árvore filogenética de 109 sequências do gene fator de alongação 1- α gerada a partir de análise de Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 réplicas não paramétricas de bootstrap. Foram utilizadas 100 sequências dos isolados do Brasil e da Flórida, 8 sequências (AB539236.1 - *Perilla frutescens* L., Japão; AB539242.1 - *Cucumis sativus* L., Japão; AB539252.1 - *Cucumis sativus* L., Japão; AB539267.1 - *Hydrangea macrophylla* L., Japão; AB539271.1 - *Solanum lycopersicum* L., Japão; AB539285.1 - *Solanum melongena* L., Japão; AB539290.1 - *Capsicum annum*. L., Japão; AB539292.1 - *Capsicum annum*. L., Japão) dos isolados de *C. cassiicola* depositadas no GenBank e a sequência do isolado de *C. smithii* NBRC8162 que foi utilizado como *outgroup*..... 50

- Figura 5.** Árvore filogenética de 91 sequências do gene β -tubulina gerada a partir de análise de Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 réplicas não paramétricas de bootstrap. Foram utilizadas 81 sequências dos isolados do Brasil e da Flórida, 9 sequências (AB539169.1 - *Perilla frutescens* L., Japão; AB539175.1 - *Cucumis sativus* L., Japão; AB539174.1 - *Perilla frutescens* L., Japão; AB539204.1 - *Solanum lycopersicum* L., Japão; AB539208.1 - *Solanum lycopersicum* L., Japão; AB539218.1 - *Solanum melongena* L., Japão; AB539223.1 - *Capsicum annum*. L., Japão; AB539225.1 - *Capsicum annum*. L., Japão; AB539234.1 - *Plumeria rubra* L., Japão) dos isolados de *C. cassiicola* depositadas no GenBank e a sequência do isolado de *C. smithii* NBRC8162 que foi utilizado como *outgroup*..... 55

- Figura 6.** Variabilidade morfológica da colônia entre isolados *Corynespora cassiicola* aos 5 dias de incubação em meio de cultura BDA 50%, temperatura de 25 \pm 2 °C e fotoperíodo de 8 horas. (F) Frente da placa e (V) Verso da placa..... 58

Figura 7. Variabilidade morfológica dos conídios entre isolados <i>Corynespora cassiicola</i> com 5 dias de incubação. Isolados: (A) EH-1989, (B) EH-1503, (C) EH-2107, (D) EH-1049, (E) EH-2045, (F) EH-2082, (G) EH-2124, (H) EH-1720. Escala: 50 µm.....	60
Figura 8. Distribuição em percentual (%) da curvatura (A) e forma (B) dos conídios dos isolados <i>Corynespora cassiicola</i> com 5 dias de incubação.....	61
Figura 9. Estabilidade patogênica de três isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> a diferentes espécies de plantas de importância econômica em dois experimentos: Abóbora (1), Abobrinha (2), Alface Crespa Vanda (3), Alface Raider (4), Berinjela (5), Couve (6), Feijão-caupi (7), Feijão-de-vagem (8), Jiló (9), Maxixe (10), Melão (11), Pepino Taisho (12), Pepino Tsuyataro (13), Pimentão (14), Quiabo (15), Repolho (16), Rúcula (17), Salsa (18), Soja (19), Tomate Dominador F1 (20), Tomate Tospodoro (21), Trapoeraba (22), Vinagreira (23).....	66

Capítulo 3

Figura 1. Distribuição de frequência de isolados em faixas de concentrações das doses efetivas de (A) carbendazim e clorotalonil e (B) tebuconazole para inibir em 50% (DE50) o crescimento micelial <i>in vitro</i> de isolado <i>Corynespora cassiicola</i>	90
Figura 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) do isolado <i>Corynespora cassiicola</i> a diferentes fungicidas nos experimentos 1 e 2.....	101

Resumo Geral

Aguiar, Frederick Mendes. **Caracterização de isolados de *Corynespora cassiicola* e avaliação da sensibilidade *in vitro* a fungicidas**. 2015. 109p. Doutorado em Fitopatologia - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A mancha-alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, tornou-se uma das mais importantes doenças da parte aérea do tomateiro e pepineiro em diversas regiões produtoras do Brasil e do mundo nos últimos anos. Além do tomate e pepino, este fungo apresenta uma grande diversidade de hospedeiras sendo relatado em mais de 350 espécies de plantas, distribuídas por mais de 80 países. Os isolados deste fungo também apresentam uma grande diversidade morfológica, principalmente em relação à coloração da colônia, tamanho e formato dos conídios, dificultando ainda mais sua identificação e caracterização. Outra dificuldade relacionada à mancha-alvo é a ausência de cultivares comerciais resistentes e de fungicidas recomendados para o tomate e o pepino no Brasil, sendo um grande desafio para seu controle. Em função dos problemas apresentados, esta tese teve como objetivo investigar a variabilidade genética, morfométrica e patogênica entre isolados de *Corynespora* de diferentes plantas hospedeiras e regiões geográficas e verificar *in vitro* a sensibilidade micelial de isolados de *Corynespora* a diferentes fungicidas. Na caracterização molecular todos os isolados avaliados foram identificados como pertencentes à espécie *C. cassiicola*. Quanto à distribuição e a resolução intraespecífica dos isolados avaliados, as sequências obtidas das regiões genômicas ITS e fator de alongação 1- α apresentaram limitada resolução intraespecífica dos isolados quanto à hospedeira de origem e região geográfica de coleta nas respectivas árvores filogenéticas. Já a árvore filogenética com as sequências do gene β -tubulina apresentou melhor distribuição dos isolados quanto à hospedeira de origem, com formação de dois clados distintos, cada um representado em sua maioria por isolados provenientes da cultura do tomate e do pepino. Os treze isolados de *C. cassiicola* utilizados na caracterização morfométrica apresentaram grande variabilidade quanto à cor da colônia, com a ocorrência de seis diferentes cores; quanto à textura micelial, os isolados dividiram em sete com textura fina e seis com textura cotonosa; e quanto ao formato da colônia, com predominância da forma poligonal. A taxa de crescimento micelial foi de 6,05 mm/d. As dimensões dos conídios variaram de 7,39 a 386,05 μ m de comprimento, 5,8 a 14,08 μ m de largura e 0 a 24 para o número de pseudoseptos. Os três isolados de *C. cassiicola* avaliados confirmaram patogenicidade às suas hospedeiras de origem. Somente oito espécies de plantas

avaliadas não apresentaram suscetibilidade aos isolados. Após caracterização molecular, morfométrica e patogênica dos isolados de *C. cassiicola* avaliados, concluiu-se que, exceto para a região β -tubulina, nenhuma relação entre a hospedeira de origem e a região geográfica de coleta dos isolados foi estabelecida neste estudo. No teste de sensibilidade a fungicidas, em ensaios preliminares foi obtida a dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial de *C. cassiicola* em 50% (DE50). Nos resultados, os fungicidas clorotalonil e carbendazim apresentaram altos valores da DE50 para a maioria dos isolados avaliados, com média superior a 50 mg.L⁻¹. Para o fungicida tebuconazole, os valores da DE50 variaram de 0,50 a 18,79 mg.L⁻¹. Já para os fungicidas pyrimethanil, fludioxonil e cyprodinil, verificou-se menores valores da DE50 quando comparados aos fungicidas anteriores. Após estes ensaios, as concentrações obtidas foram de 1 mg.L⁻¹ para o fungicida fludioxonil, 3 mg.L⁻¹ para cyprodinil, 5 mg.L⁻¹ para boscalid e fluopyram, 10 mg.L⁻¹ para tebuconazole, azoxystrobin e pyrimethanil e 50 mg.L⁻¹ para clorotalonil e carbendazim. Os resultados obtidos no teste de inibição do crescimento micelial (ICM) de 55 isolados de *C. cassiicola*, mostraram uma variação entre os fungicidas e os isolados avaliados. O fungicida fludioxonil na concentração de 1 mg.L⁻¹ apresentou maior valor de ICM quando comparado aos demais fungicidas avaliados, com valor médio de 85,69%. Já o fungicida clorotalonil apresentou menor valor de ICM, com média de 31,56%. O isolado EH-1710 apresentou maior valor de ICM de 74,14%, já o isolado EH-2125 apresentou o menor valor entre os isolados avaliados, com média de 34,57%. Os resultados obtidos evidenciam uma grande expectativa de efeitos satisfatórios do fungicida fludioxonil no controle da mancha-alvo. Já os fungicidas carbendazim, pyrimethanil, azoxystrobin e, principalmente, clorotalonil apresentam grande possibilidade de desenvolvimento de resistência dos isolados de *C. cassiicola*.

Palavras-chave: mancha-alvo, ITS, fator de alongação 1- α , β -tubulina, morfologia, patogenicidade, fungicidas.

General Abstract

Aguiar, Frederick Mendes. **Characterization of *Corynespora cassiicola* isolates and evaluation of *in vitro* sensitivity to fungicides**. 2015. 109p. Doctorate in Plant Pathology - Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Target spot, caused by the fungus *Corynespora cassiicola*, has been one of the most important disease of the aerial parts of the tomato and cucumber plants in different regions of Brazil and world in the last years. Besides the tomato and cucumber, this fungus has a big host diversity, detected in more than 350 plants, distributed by more than 80 countries. The isolates of this fungus also have a big morfological diversity, mainly in relation to colony colour, conidia size and shape. These characters difficult its identification and characterization to species level. Another difficult concerning to target spot is the absence of resistant cultivars and fungicides recommended for tomato and cucumber in Brazil, representing a big challenge for its control. In function on the presented problems, this thesis aimed to investigate the genetic variability, morphometric and pathogenic among *Corynespora* isolates from different geographic regions and test the *in vitro* mycelial sensitivity of *Corynespora* isolates to different fungicides. In the molecular characterization all isolates were identified as *C. cassiicola*. As to distribution and intraspecific resolution of isolates, the sequences obtained from genomic regions ITS and elongation factor 1- α showed limited intraspecific resolution of the isolates as to host of origin and geographical region of collection in its phylogenetic trees. The phylogenetic tree with the sequences of β -tubulin gene showed better distribution of isolates as to its host of origin. In this tree it was formed two distinct clades, each one represented mostly by isolates from tomato and cucumber crop. Thirteen isolates of *C. cassiicola* used in morphometric characterization showed big variability as to color, with occurrence of six different colors; as to texture, with isolates divided into seven presenting fine texture and six with cottony texture; and as to colony shape, with predominance of polygonal shape. The mycelial growth rate was 6.05 mm/d. The dimensions of the conidia ranged from 7.39 to 386.05 mm in length, 5.8 to 14.08 mm in width and 0 to 24 for the number of pseudosepts. The three isolates of *C. cassiicola* tested confirmed pathogenicity to its host of origin. Only eight species of plants tested didn't show susceptibility to isolates. After molecular, morphometric and pathogenic characterization of isolates of *C. cassiicola* tested, was concluded that, except for β -tubulin region, no relationship between host of origin and geographical region of isolates was established in this study. In the fungicidal sensitivity test was performed in preliminary tests

to determine the actual dose able of inhibiting the mycelial growth of *C. cassiicola* by 50% (ED50). In the results, the fungicide chlorothalonil and carbendazim showed great ED50 values to majority of isolates, with average higher to 50 mg.L⁻¹. For the tebuconazole fungicide the values of ED50 varied from 0.50 to 18.79 mg L⁻¹. The pyrimethanil, cyprodinil and fludioxonil fungicides presented lower values of DE50 when compared to the former fungicides. After these tests, the ED50 concentrations found were 1 mg.L⁻¹ to fludioxonil, 3 mg.L⁻¹ to cyprodinil, 5 mg l⁻¹ to boscalid and Fluopyram, 10 mg.L⁻¹ to tebuconazole, azoxystrobin and pyrimethanil and 50 mg L⁻¹ to chlorothalonil and carbendazim. The results obtained in the inhibition test of mycelial growth (ICM) of 55 isolates of *C. cassiicola*, showed a variation among fungicides and isolates tested. The fludioxonil fungicide at a concentration of 1 mg L⁻¹ showed higher ICM when compared to fungicides tested, with average of 85.69%. Already chlorothalonil fungicide showed the lowest ICM values with average of 31.56%. EH-1710 showed higher ICM of 74.14% and the isolate EH-2125 showed the lowest value of ICM among the isolates tested, with average of 34.57%. The results show a great expectation of good effects of fludioxonil fungicide on target spot control. Already carbendazim fungicides, pyrimethanil, azoxystrobin and chlorothalonil showed great possibility of development of resistance of isolates of *C. cassiicola*.

Keywords: target spot, ITS, elongation fator 1- α , β -tubulin, morphology, pathogenicity, fungicides.

Guidance Committee: Ailton Reis - Embrapa Hortaliças (Advisor).

CAPÍTULO 1

Introdução Geral e Revisão de Literatura

Introdução Geral e Revisão de Literatura

A cultura do tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum* L., sin.: *Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma hortaliça pertencente à família das solanáceas, da qual fazem parte a batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*S. melongena* L.), jiló (*S. gilo* Raddi), pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.), o fumo (*Nicotiana tabacum* L.), entre outras (Van Balken, 2015). O tomate é a segunda hortaliça mais consumida no mundo, seguida apenas pela batata. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais, alcançando uma das maiores produtividades dessa olerícola (IBGE, 2014). Considerada uma espécie cosmopolita, o tomate tem como centro de origem primário o estreito território limitado ao norte pelo Equador, ao sul pelo norte do Chile, a oeste pelo Oceano Pacífico e a leste pela Cordilheira dos Andes (Filgueira, 2013).

Inicialmente, o tomateiro foi cultivado somente como planta ornamental, isso devido ao grande temor pelas toxinas, já que muitas solanáceas encontradas na época eram consideradas venenosas. Esta hortaliça foi introduzida na região onde hoje está o México (considerada como centro secundário de origem), onde recebeu o nome “tomatle” (do náuatle “fruto chato”), passando a ser cultivada e melhorada (Filgueira, 2013). No Brasil, o consumo e o cultivo do tomate foram difundidos pelos imigrantes europeus, principalmente os italianos, espanhóis e portugueses (Silva & Giordano, 2000).

Devido à sua região de origem, o tomateiro, como toda planta pertencente à família Solanaceae, possui sensibilidade a variações extremas de temperatura, ocorrendo abortamento ou inibição da floração com o excesso de calor, e morte das folhas em temperaturas próximas a 0 °C. Diante destas características, as variedades de tomate são melhoradas visando o local, a forma de cultivo e a sua finalidade para o consumo (Camargo *et al.*, 2006a).

O tomateiro é uma planta herbácea, de porte arbustivo, com sistema radicular pivotante, quando o plantio é realizado por sementes, ou fasciculada quando por transplântio. Possui caule flexível, piloso, com abundante ramificação lateral. Suas flores são hermafroditas, pequenas e reunidas em cachos. Os frutos são bagas carnosas de tamanho e formato variáveis conforme a cultivar e, quando maduros, apresentam coloração vermelha. Possuem sementes pequenas, pilosas e imersas na mucilagem placentária. A planta, apesar de ser perene, é cultivada como cultura anual. Apresenta dois hábitos de crescimento que condicionam o tipo de cultivo: o hábito indeterminado, onde ocorre predominância da gema apical sobre as gemas laterais, comum na maioria das cultivares para a produção de frutos para mesa; e o hábito determinado, onde há crescimento vegetativo menos vigoroso e a planta assume a forma de uma moita, predominante à produção de frutos para a agroindústria (Clemente & Boiteux, 2012; Filgueira, 2013).

O tomateiro e espécies silvestres afins são plantas dicotiledôneas, diplóides e tipicamente autógamas, com baixa percentagem de cruzamento natural. Atualmente, 13 espécies do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) foram reconhecidas, podendo ser agrupadas em dois complexos (*esculentum* e *peruvianum*), de acordo com o grau de facilidade de cruzamento natural com *S. lycopersicum*. As espécies silvestres *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites* e *S. peruvianum* são as de maior interesse para os melhoristas por possuírem genes de resistência a vários patógenos (Peralta *et al.*, 2008; Clemente & Boiteux, 2012).

A cultura do tomate possui uma área mundial plantada de 4,8 milhões de hectares, com uma produtividade média de 33,6 t/ha, chegando a uma produção de 161,7 milhões de toneladas (FAO, 2015). Os principais produtores mundiais são: China, Estados Unidos da América (EUA), Turquia, Índia, Egito, Itália, Espanha e Brasil (Camargo *et al.*, 2006b).

O Brasil está entre os 10 países maiores produtores de tomate, considerado como o terceiro em produtividade. Em 2014, o país produziu cerca de 4,3 milhões de toneladas, em

uma área de aproximadamente 66 mil hectares, com produtividade média de aproximadamente 66 t/ha. Em relação à safra passada, ocorreu um aumento de 7,71% na produção nacional, de 7,82% na área plantada, porém uma redução de 0,30% no rendimento médio (IBGE, 2014).

A produção brasileira está concentrada principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste. O Estado de Goiás é o primeiro colocado, tanto em produção quanto em produtividade (1,33 milhões toneladas e 84 t/ha respectivamente), seguido do São Paulo, com aproximadamente 675 mil toneladas e um rendimento de 66 t/ha (IBGE, 2014). Minas Gerais também tem uma grande participação na produção nacional de tomate com uma produção de 563 mil toneladas e um rendimento de 69 t/ha.

A cultura do pepino

O pepino (*Cucumis sativus* L.) é uma hortaliça pertencente a família das cucurbitáceas, da qual fazem parte a abóbora (*Cucurbita* spp.), melão (*Cucumis melo* L.), melancia (*Citrullus vulgaris* Schrad), maxixe (*Cucumis anguria* L.) e o chuchu (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). É considerada a segunda cucurbitácea mais plantada no mundo, perdendo apenas para a melancia (Almeida, 2006).

A cultura do pepino tem como centro de origem primário a região da Índia próxima ao Himalaia, tendo sido levado para a China onde deu origem a um grupo com frutos mais alongados e diâmetros reduzidos. Outro grupo, que foi levado primeiramente para às ilhas Formosas e depois à ilha de Okinawa, chegou ao Japão dando origem aos grupos "Aodai" e "Aonaga", conhecidos atualmente no mercado como pepinos "Comum" e "Japonês", respectivamente. Outros tipos de pepino que existem no mercado são "Caipira" e "Conserva" (Medeiros *et al.*, 2010).

O pepineiro é uma planta herbácea, anual, de crescimento indeterminado no sentido vertical ou prostrado dependendo do manejo utilizado, possui hastes longas e ramas com gavinhas. É uma planta predominantemente monóica com polinização cruzada. O sistema radicular é superficial. O pepino é uma hortaliça fruto, de clima tropical que apresenta seu melhor desenvolvimento em temperaturas entre 20 e 30 °C, umidade relativa do ar entre 60 e 65% e não tolera geada (Filgueira, 2013). Devido à grande dificuldade em se cultivar sob baixas temperaturas, os produtores brasileiros passaram a cultivar pepino em ambiente protegido a partir da década de 80, sendo uma das hortaliças mais cultivadas em ambiente protegido no Brasil e no mundo (Wilcken *et al.*, 2010).

A cultura do pepino possui uma área mundial plantada de aproximadamente 2,1 milhões de hectares, chegando a uma produção de 65,1 milhões de toneladas. A China é o maior produtor mundial e responde por aproximadamente 73% da produção anual mundial, seguida pela Turquia (1,7 milhões de toneladas), Irã (1,6 milhões de toneladas) e Estados Unidos (9 milhões de toneladas). Em 2012, a produção anual de pepino na América do Sul foi de aproximadamente 128 mil toneladas, em uma área plantada de 8 mil hectares e com produtividade média de 16 t/ha (FAO, 2015).

No Brasil, o cultivo do pepino se dá em pequenas áreas nos mais diversos estados, sendo os principais produtores São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Bahia. A produção é destinada principalmente ao mercado interno e as quantidades exportadas são consideradas inexpressivas. Em 2013, o volume total de pepino comercializado nas Centrais de Abastecimento Geral do Estado de São Paulo (CEAGESP) foi de aproximadamente 55,4 mil toneladas (AGRIANUAL, 2015).

Mancha-alvo

A cultura do pepino e, principalmente, a cultura do tomate destacam-se por apresentar um amplo histórico de doenças de diversas etiologias que, dependendo do nível de resistência genética do cultivar usado, podem causar perdas significativas na produção. A importância das doenças em uma dada região depende de vários fatores, tais como virulência do patógeno; condições ambientais favoráveis como temperatura, umidade e época do ano; bem como, sensibilidade das variedades e/ou híbridos cultivados (Lopes & Dos Santos, 2000).

As doenças podem ser transmissíveis, ou seja de causa biótica, ou não-transmissíveis de causa abiótica. As transmissíveis são causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides. As não-transmissíveis são causadas por deficiência ou excesso de nutrientes, falta ou excesso de água no solo, fitotoxidez, etc (Lopes & Dos Santos, 2000). Os fungos são microrganismos causadores do maior número de doenças na tomaticultura. O uso de fungicidas para o combate de diversas doenças causadas por este grupo de patógenos representa cerca de 15% dos custos de produção na cultura do tomate (Da costa lage, 2011).

A maioria das doenças causadas por fungos são, principalmente, da parte aérea das plantas. Uma doença de parte aérea relativamente recente que vem configurando nos últimos anos um novo desafio para diversas espécies de plantas de interesse econômico mundial, incluindo o tomateiro e o pepineiro, é a mancha-alvo ou mancha de corinéspora (Mendonça *et al.*, 2012).

Etiologia

O agente causador da mancha-alvo ou mancha de corinéspora é o fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, o qual apresenta distribuição mundial, atacando uma ampla gama de hospedeiras, como hortaliças, espécies frutíferas, ornamentais e algumas plantas invasoras (Reis & Boiteux, 2007). Este fungo já foi encontrado parasitando folhas, flores, caules e raízes de vegetais (Dixon *et al.*, 2009), cistos de nematoides (Carris &

GLAWE, 1986), até mesmo causando doenças em humanos (Huang *et al.*, 2010; Lv *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2013). Quando isolado de materiais provenientes de plantas sintomáticas, este fungo é classificado como patogênico, porém, se for proveniente de material decomposto ou de tecido vivo assintomático, este é classificado como saprofítico e endofítico, respectivamente (Déon *et al.*, 2014).

Em teste de patogenicidade realizado com isolado de *C. cassicola* coletado de material em decomposição de mamão (*Carica papaya*), este foi patogênico ao tomate e ao pepino, porém não patogênico ao mamão, indicando que um único isolado pode ser patogênico e saprofítico (Dixon *et al.*, 2009).

Nas espécies vegetais, *C. cassicola* é encontrado em mais de 350 plantas hospedeiras em mais de 80 países, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, porém já foram feitos relatos ocasionais da presença deste fungo em regiões temperadas (Silva *et al.*, 1995; Farr & Rossman, 2015). O fungo já foi relatado em um grande número de culturas economicamente importantes, incluindo algodão (*Gossypium hirsutum* L.), soja (*Glycine max* L.), feijão de corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), mamão (*Carica papaya* L.), melancia (*Citrullus vulgaris* Schrad), pimenta (*Capsicum frutescens* L.), seringueira (*Hevea brasiliensis* L.), gergelim (*Sesamun indicum* L.), mandioca (*Manihot* sp.), mamona (*Ricinis communis* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), (Qi *et al.*, 2011). Relatos de novas hospedeiras deste fungo têm ocorrido em todo o mundo, tais como eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden) e café conilon (*Coffea canephora* cv. *Conilon* L.) no Brasil (Souza *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2014), quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) em Bangladesh, manjerição (*Ocimum basilicum* L.) na Itália (Garibaldi *et al.*, 2007), seringueira (*Hevea brasiliensis* L.) na China (Jinji *et al.*, 2007) e mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no Sri Lanka (Silva *et al.*, 2000).

Corynespora cassiicola é um fungo pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Dothideomycetes*, ordem *Pleosporales*, família *Dematiaceae*, gênero *Corynespora* e espécie *C. cassiicola* (Déon *et al.*, 2012). Na literatura ainda não foram feitos relatos da fase teleomórfica deste fungo.

De acordo com Ellis & Holliday (1971), *C. cassiicola* produz em meio de cultura uma colônia de coloração branca, progredindo para um cinza escuro e tornando-se mais tarde um emaranhado preto oliváceo. O micélio é geralmente imerso e não apresenta estroma. Os conidióforos são simples, eretos ou ligeiramente flexuosos, ocasionalmente ramificados, lisos, de coloração pálida a marrom escuro, contendo de quatro a quinze septos, com células basais intumescidas, medindo de 110-850 µm de comprimento por 4-11 µm de largura. Os conídios podem ser produzidos isoladamente ou em cadeia de dois a seis, são lisos, variando de obclavados a cilíndricos, retos ou ligeiramente curvados, visivelmente afinados em direção ao ápice, com 4 a 20 pseudoseptos (os septos não se estendem à parede externa dos esporos), medem de 40-420 µm de comprimento e 10-20µm de largura no ponto mais largo, podendo chegar a 520 µm x 22 µm em meio de cultura. Possuem coloração marrom oliváceo, com hilo (ponto de ligação ao conidióforo ou a outros conídios) de coloração escura na base e uma ligeira borda, possui germinação polar.

Os clamidósporos são formados *in vitro* e *in vivo*. Quando *in vitro* podem ser terminais, intercalares ou formando correntes de até cinco clamidósporos. No entanto, quando encontrados *in vivo*, apresentam apenas as formas terminais e intercalares, sendo hialinos, de formato oval e dimensão de 16-30 por 14-20 µm (Oliveira *et al.*, 2012).

Caracterização

Alguns isolados de *C. cassiicola* apresentam patogenicidade para uma grande diversidade de plantas hospedeiras, enquanto outros isolados mostram-se específicos ao

hospedeiro de origem. Existem também aqueles que são patogênicos somente quando associados a ferimentos. Devido à grande variabilidade de hospedeiros dentro da espécie *C. cassicola*, o agrupamento de isolados com base na hospedeira se torna problemático para prever patogenicidade e parentesco genético. Isolados com diferentes perfis genéticos de patogenicidade podem ser encontrados no mesmo hospedeiro (Dixon *et al.*, 2009). No Brasil e na grande maioria dos países, as informações sobre a base filogenética, a diversidade genética e a patogenicidade dos isolados de *C. cassicola* ainda não estão bem esclarecidas.

Pouco se sabe sobre a relação evolutiva de alguns fungos. Classicamente, a identificação e a classificação dos fungos, ao contrário de outros importantes patógenos, como bactérias ou vírus, baseia-se principalmente em critérios morfológicos facilmente observados, como o tipo de conídios, número de septos conidiais e conidiogênese. Portanto, o crescimento do patógeno em meio de cultura apropriado permite que os seus traços mais característicos sejam reconhecidos. Infelizmente, alguns fungos patogênicos apresentam em meio de cultura somente a fase vegetativa (ausência de esporulação), sendo observadas apenas hifas ou outras estruturas inespecíficas (Guarro *et al.*, 1999).

No entanto, alguns grupos de fungos, devido à sua importância econômica ou patogênica, necessitam ser estudados mais amplamente. A abordagem molecular oferece novos caminhos para o esclarecimento sobre o processo evolutivo desses fungos. Dois importantes avanços técnicos estimularam o uso de técnicas moleculares. O primeiro foi o surgimento da PCR, que permite realizar análise utilizando uma pequena quantidade de tecido fúngico. O segundo foi o desenvolvimento de primers universais específicos para fungos (Guarro *et al.*, 1999).

Vários trabalhos baseados na técnica da PCR têm sido realizados para identificar e diferenciar isolados ou raças de *C. cassicola* e outros fungos fitopatogênicos. Dixon *et al.* (2009), utilizando sequências de alguns genes de 143 isolados de *C. cassicola*, entre eles, da

região ribossômica ITS (*internal transcribed spacer region*) e o gene que codifica a actina (Act-1), observaram concordância em relação à planta hospedeira de origem, porém não houve concordância em relação à localização geográfica da coleta dos isolados. Qi *et al.* (2011), também não encontraram concordância entre 22 isolados de *C. cassiicola* em relação à localização geográfica dos isolados, utilizando a técnica molecular ISSR (*Internal Simple Sequence Repeat*) com 16 primers. Com base nas técnicas moleculares de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplification Polymorphic DNA*), Silva *et al.* (1995) encontraram evidências de especialização para hospedeiras em isolados de seringueira e mamão, porém não houve relação com a localização geográfica da coleta dos isolados. Shimomoto *et al.* (2011) utilizando análise de múltiplos genes em 67 isolados de *C. cassiicola* com o gene da β -tubulina, fator de alongação 1- α , calmodulina e actina, encontraram três grupos associados à planta hospedeira de origem.

Ocorrência

No tomateiro, *C. cassiicola* causa grandes prejuízos em mais de 25 países, tanto em cultivo protegido, quanto no campo (Schlub *et al.*, 2009), entre eles cita-se a Austrália, Índia, Cuba, Romênia, Estados Unidos principalmente no estado da Flórida (Vallad & Burlacu, 2011) e Brasil, na Região Norte e no Estado do Maranhão, etc (Lopes *et al.*, 2005). O primeiro relato desse fungo causando doença em tomateiro foi feito por Deighton em Serra Leoa (Wei, 1950), seguido pela Índia (Mohanty & Mohanty, 1955), Austrália (Simmonds, 1958), os Estados Unidos (Blazquez, 1972) e sul da Nigéria (Bliss *et al.*, 1973).

No Brasil, a mancha-alvo do tomateiro foi relatada pela primeira vez por Alves *et al.* (1985), em Manaus. Até pouco tempo, essa doença era praticamente ausente nas outras regiões produtoras do País. Entretanto, em 2006/2007, com a ocorrência de chuvas intensas e temperaturas acima da média nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, foram observadas

epidemias severas de mancha-alvo em lavouras comerciais de tomate de mesa nos municípios de Nerópolis, Goianópolis e Anápolis, em Goiás e em Araguari-MG. Também foram observadas epidemias da doença em tomate em cultivo protegido nos Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul nos anos de 2005 e 2006, respectivamente (Reis & Boiteux, 2007).

No pepineiro, até 2003, a mancha-alvo era considerada uma doença de importância secundária, entretanto, nos últimos anos passou a ser um dos principais patógenos desta cultura ocasionando danos de até 60%, principalmente nos estados de São Paulo, Paraná e Goiás, tanto em cultivo convencional quanto em cultivo protegido (Teramoto *et al.*, 2011). O fungo *C. cassicola* foi relatado pela primeira vez causando doença em pepino por Blazquez (1967), no estado da Flórida (Estados Unidos). No Brasil, a mancha-alvo do pepineiro foi relatada pela primeira vez por Verzignassi *et al.* (2003) no estado do Paraná.

Sobrevivência e disseminação

A mancha-alvo nas culturas de tomate e pepino, é mais problemática quando cultivadas em locais com temperaturas variando de 20°C a 32°C, umidade relativa do ar igual ou superior a 80% e molhamento foliar com duração de 16-44 horas (Mendonça *et al.*, 2012). O patógeno sobrevive em restos culturais por até dois anos, em sementes contaminadas e infectando diversas plantas hospedeiras (Reis & Boiteux, 2007).

Sua disseminação é realizada pelo vento, água e sementes. O vento é o responsável pela remoção dos conídios e pelo seu transporte para outras plantas ou lavouras e a remoção é favorecida pelo tempo seco. Já na superfície da planta e na presença de água livre, o conídio germina, produzindo tubo germinativo e apressório. Quando a disseminação é realizada com o auxílio da água, ocorre principalmente pela água da chuva e respingos de água de irrigação por aspersão (Bedendo, 1995). As sementes são responsáveis, principalmente, pela disseminação a longa distância de uma área infectada para outra.

Quando são depositados na superfície da planta hospedeira, os conídios de *C. cassicola* fixam-se por meio dos apressórios, em seguida emitem o tubo germinativo iniciando-se a penetração de forma direta por meio da superfície da epiderme. Por ser um parasita necrotrófico, o fungo *C. cassicola* coloniza sua hospedeira retirando os seus nutrientes, o que significa que o mesmo mata as células da planta hospedeira antes de invadi-las. Para isso, o patógeno produz a toxina cassicolin que é liberada nas células e mata os tecidos adjacentes ao local da infecção, sendo o desenvolvimento e a invasão dos tecidos sempre realizada pela atividade saprofítica, com retirada de nutrientes de células mortas (Mesquini, 2012).

Sintomatologia

Os sintomas da doença no tomateiro têm início com a ocorrência de manchas pequenas e aquosas na superfície da folha, as quais eventualmente tornam-se marrom-escuras (Mendonça *et al.*, 2012). Nesse início, os sintomas na folha podem ser confundidos com pinta-preta (*Alternaria solani*) e mancha-bacteriana (*Xantomonas* spp.). Com o progresso da doença, as lesões aumentam de tamanho tornando-se bastante distintas das outras doenças. Estas lesões são circulares e de coloração marrom-claras medindo de aproximadamente 1 cm de diâmetro, sendo que em algumas variedades podem apresentar anéis concêntricos e um halo clorótico circundante (Pernezny & Simone 1993). Com a expansão das lesões ocorre desfolha generalizada. Nos ramos e pecíolos, ocorrem manchas amarronzadas e alongadas (Kurt, 2004).

Nos frutos, inicialmente são observadas pequenas pontuações marrom-escuras e circulares que aumentam e tornam-se marrons com um centro mais claro, podendo rachar. Os frutos maduros desenvolvem grandes lesões circulares marrons, com uma visível coloração

que varia do cinza escuro ao preto no centro, devido ao crescimento de fungos, que posteriormente se racham e formam verdadeiras "crateras" nos frutos (Reis & Boiteux, 2007).

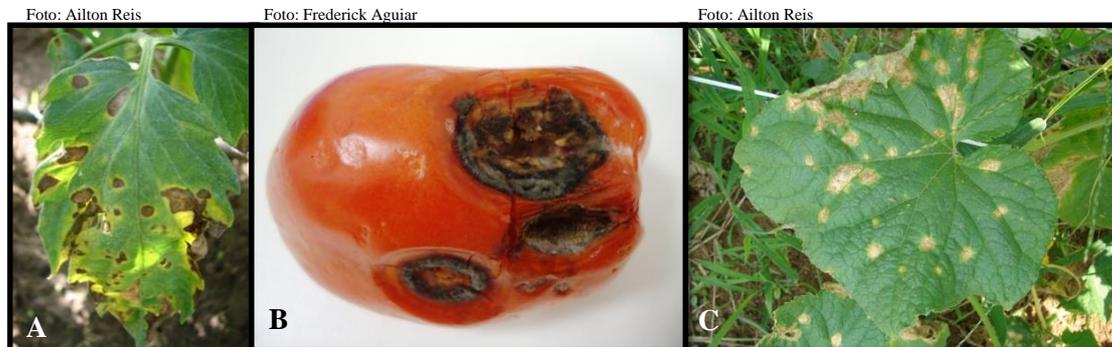


Figura 1. Sintomas de mancha-alvo em folha de tomate (A), em fruto de tomate (B) e em folha de pepino (C).

Os sintomas da mancha-alvo no pepineiro surgem logo após o transplântio, inicialmente na forma de pequenas manchas angulares, de coloração clara, que evoluem para manchas circulares, com o centro de cor palha e pequeno halo amarelo claro. Com o progresso da doença, as manchas crescem, tomando formato arredondado e apresentando centro marrom claro e bordos encharcados de coloração olivácea. Ainda não foram observados sintomas da doença em caule, frutos e raízes (Teramoto *et al.*, 2011).

Controle

As perdas ocasionadas por doenças em plantas de importância econômica estão entre os principais fatores que causam prejuízos aos agricultores. O controle da maioria das doenças é eficiente somente quando adotado um programa de manejo integrado adequado, no qual são utilizadas cultivares resistentes, controle biológico ou alternativo e adoção de medidas de exclusão, evasão, erradicação e proteção (Muliterno de Melo, 2009).

O controle da mancha-alvo do tomateiro se torna difícil devido a vários fatores, como condições ambientais favoráveis à doença; arquitetura exuberante da copa do tomateiro, que

favorece o molhamento foliar causado pelo orvalho, água da chuva ou irrigação por aspersão (Schlub *et al.*, 2009) e ocorrência de plantas daninhas hospedeiras de *C. cassiicola* (Papa, 2005). Outro fator de grande importância é a ausência de cultivares comerciais de tomate resistentes a este patógeno, apesar de fontes de resistência já terem sido encontradas há mais de 15 anos na cultura do pepino na Europa e atualmente nos Estados Unidos (Vallad & Burlacu, 2011). No Brasil, o híbrido de pepino “Taisho” é relatado como resistente à *C. cassiicola* (Sakata, 2015). Portanto, a identificação de fontes de resistência para a cultura do tomate se torna muito importante para o controle desta doença.

Atualmente, o controle adequado de mancha-alvo dessas culturas em todo o mundo é realizado principalmente por aplicações periódicas de fungicidas. No tomateiro, Jones & Jones (1984), utilizando clorotalonil e combinações de mancozeb com compostos cúpricos, relataram bons resultados no controle de *C. cassiicola* em plantas de tomate. Já Kingsland & Sitterly (1986) utilizando captafol (Difolatan 80w) isoladamente ou em combinação com oxiclureto de cobre e zineb, encontraram bons resultados no controle da mancha-alvo no tomateiro. Pernezny *et al.* (2002), mostraram que o ativador de resistência em plantas acibenzolar-S-metil (ASM) e o fungicida azoxistrobina apresentaram bons resultados no controle da mancha-alvo. Na cultura do pepino, Castro (1979) utilizou 11 fungicidas no controle de *C. cassiicola* em pulverizações realizadas logo após o aparecimento dos primeiros sintomas. Os fungicidas mais eficientes foram clorotalonil, carbendazim associado a maneb, e maneb associado com zinco. Teramoto *et al.* (2004) observaram inibição total do crescimento micelial de *C. cassiicola* pelos fungicidas mancozeb e tebuconazole.

Os produtos químicos, citados anteriormente, são regulamentados para uso na cultura do tomate e pepino pelo órgão regulador nos Estados Unidos. Porém, no Brasil ainda não existem produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão regulador no país, para o controle químico de *C. cassiicola* na cultura do

tomate e na cultura do pepino. Por outro lado, existem no próprio MAPA, registros de 16 fungicidas para o controle de *C. cassiicola* na cultura da soja, entre os quais estão as estrobilurinas, os triazóis e suas misturas (Mesquini, 2012).

Devido à falta de fungicidas registrados para estas culturas no Brasil, atualmente o controle químico dessa doença é realizado com fungicidas recomendados para o controle da pinta-preta do tomateiro causada por espécies de *Alternaria* ou por produtos utilizados no controle de *C. cassiicola* na cultura da soja, ambos com registro no MAPA (Reis & Boiteux, 2007).

Porém, a utilização de fungicidas não recomendados para o patógeno ou cultura específica pode levar ao surgimento de sérios problemas futuros, entre eles a baixa eficiência no controle químico devido ao surgimento de estirpes do patógeno resistentes aos compostos químicos utilizados (Ghini & Kimati, 2000). O surgimento de estirpes resistentes a determinado princípio químico vem sendo evidenciado desde o início da década de 70 (Ishii, 2005). Os fungos possuem a capacidade de desenvolver mecanismos que lhes conferem resistência a produtos tóxicos, devido à sua grande capacidade de multiplicação e variabilidade genética, criando assim, várias oportunidades para a seleção espontânea de linhagens resistentes ao fungicida (Parreira *et al.*, 2009).

Neste contexto, fungos fitopatogênicos sensíveis a um determinado fungicida podem passar a apresentar menor sensibilidade ou tornar-se resistentes, devido à mutação ou outro mecanismo de variabilidade. Por exemplo, a aplicação intensiva de fungicidas sistêmicos com modo de ação específico pode vir a selecionar isolados resistentes, fazendo com que um determinado fungo adquira resistência aos produtos utilizados (Garcia, 1999). Dessa forma, um dos pontos fundamentais para evitar o surgimento da resistência adquirida pelo patógeno é a tomada de decisão correta de como será feito o controle químico. O uso de fungicidas de risco em combinação com outro de baixo risco de seleção para resistência ou a rotação com

diferentes fungicidas são medidas recomendadas para aplicações por longos períodos (Ishii, 2005).

Outras medidas que podem auxiliar no controle da mancha-alvo é o tratamento químico das sementes e o uso de sementes certificadas. Na cultura da soja, Reis *et al.* (2010) recomendam o uso do fungicida tiram e do carbendazim em mistura. A rotação de culturas utilizando milho e outras espécies de gramíneas é recomendada para essa doença por Almeida *et al.* (2005). O biocontrole, utilizando uma proteína de *Bacillus cereus*, apresentou bons resultados como promotor de crescimento e indutor de resistência em folhas de tomateiro contra *C. cassiicola* (Romeiro *et al.*, 2010). Entretanto, não existem produtos biológicos para o controle da mancha-alvo do tomateiro disponíveis para comercialização no Brasil.

Justificativas e Hipóteses

Com o aumento nos últimos anos do número de casos de mancha-alvo em diferentes culturas de interesse econômico no Brasil e a grande variabilidade de hospedeiras apresentado por esse patógeno, o agrupamento de isolados com base na hospedeira e na diferenciação morfológica dos isolados se torna problemático para predizer patogenicidade e parentesco genético (Dixon *et al.*, 2009). Alguns isolados de *C. cassiicola* são patogênicos a uma grande diversidade de plantas hospedeiras, enquanto outros mostram-se específicos ao hospedeiro de origem. Portanto, faz-se necessário obter informações sobre a base filogenética, a diversidade genética e a patogenicidade dos isolados de *C. cassiicola*, no intuito de se estabelecer métodos de controle mais efetivos, e gerar informações para o melhoramento vegetal.

Devido à falta de fungicidas registrados para esta cultura no Brasil, o controle químico dessa doença baseia-se em produtos registrados para outros patógenos e outras culturas (Reis & Boiteux, 2007). Porém, a utilização não recomendada para o patógeno ou cultura específica pode levar ao surgimento de sérios problemas futuros de resistência de alguns isolados a

alguns compostos químicos (Ghini & Kimati, 2000), logo, o estudo do comportamento apresentado pelos isolados brasileiros a diferentes produtos químicos se faz necessário.

Considerando o exposto, as hipóteses testadas neste estudo foram as seguintes:

- No Brasil, os isolados coletados de diferentes hospedeiras e diferentes regiões pertencem a diferentes espécies de *Corynespora*;
- Mesmo não existindo fungicida recomendado para o controle de *C. cassiicola* na cultura de tomate e pepino, já existem isolados resistentes a algum princípio químico;
- Os isolados de *Corynespora* do Brasil apresentam especificidade para a hospedeira de origem.

Objetivos

Objetivo Geral: Investigar a variabilidade genética, morfométrica e patogênica entre isolados de *Corynespora* de diferentes hospedeiras e diferentes regiões geográficas e, verificar, mediante testes *in vitro* a sensibilidade micelial de isolados de *C. cassiicola* a diferentes fungicidas.

Objetivos Específicos:

- Realizar análise filogenética dos isolados a partir das sequências obtidas;
- Realizar caracterização morfométrica de isolados de *C. cassiicola* representativos de diferentes grupos das árvores filogenéticas;
- Realizar caracterização patogênica de isolados de *C. cassiicola* para diferentes espécies hospedeiras;

- Avaliar *in vitro* a sensibilidade micelial de *C. cassiicola*, a diferentes fungicidas.

Referências

AGRIANUAL - Anuário da Agricultura Brasileira. 2015. Disponível em: <http://www.agriannual.com.br/>. Acesso em: 26 de Fevereiro de 2015.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M. & MEYER, M. C. 2005. Doenças da Soja (*Glycine max*). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (eds.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. vol.2. Agronômica Ceres. São Paulo. p.569-588.

ALMEIDA D. 2006. Manual de culturas hortícolas. vol. 2. Editorial Presença. Lisboa. 346p.

ALVES, M.L.B; LOURD, M. & NODA, H. 1985. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* em caráter epidêmico em tomates de Manaus. Fitopatologia Brasileira 10:229.

BEDENDO, L.P. 1995. Ambiente e doença. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3 ed. Agronomia Ceres. São Paulo. vol.1. p.331-341.

BERKELEY, M.J. 1869. On collection of fungi from Cuba Part II. Botanical Journal of the Linnean Society. vol.10. p.341-392.

BLAZQUEZ CH, 1967. *Corynespora* leaf spot of cucumber. Proceed-ings of the Florida State Horticultural Society 80, 177–182.

BLAZQUEZ, C.H. 1972. Target spot of tomato. Plant Disease Report. 56:243-245.

BLISS, F.A.; ONESIROSAN, P.T. & ARNY, D.C. 1973. Inheritance of resistance in tomato to target leaf spot. *Phytopathology* 63: 837-840.

CAMARGO, A.M.M.; CAMARGO, F.P.; ALVES, H.S. & CAMARGO FILHO, W.P. 2006a. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. *Informações Econômicas*. São Paulo. vol.36. p.8-20.

CAMARGO, A.M.M.; CAMARGO, F.P.; ALVES, H.S. & CAMARGO FILHO, W.P. 2006b. Desenvolvimento do sistema agroindustrial do tomate. *Informações Econômicas*. São Paulo. vol. 36. p.53-57.

CARRIS, L.M. & GLAWE, D.A. 1986. Isolation of the soybean pathogens *Corynespora cassiicola* and *Phialophora gregata* from cysts of *Heterodera glycines* in Illinois. *Mycologia* 78:503-506.

CASTRO M.A.S. 1979. Leaf blight by *Corynespora*: a new disease on cucumber (*Cucumis sativus*) in the Valley of Culiacan, Sinaloa, México and its chemical control. *Plant Disease Reporter*. 63:599-601.

CLEMENTE, F.M.T. & BOITEUX, L.S. 2012. Produção de tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa Hortaliças. p.344 : il.

COOKE, M. C. 1986. New melon disease. *The Gardeners' Chronicle*. vol. 3. n.20. p.271-272.

DA COSTA LAGE, D. A. 2011. Progresso temporal da queima e do oídio em tomateiro orgânico em diferentes sistemas e níveis de irrigação. *Boletim de Pesquisa 74 e Desenvolvimento* ISSN 1677-2229.

DEIGHTON, F.C. 1936. Preliminary list of fungi and diseases of plants in Sierra Leone. Kew Bulletin. p.397-424.

DÉON, M.; SCOMPARIN, A.; TIXIER, A.; MATTOS, C.; LEROY, T.; SEGUIN, M; ROECKEL-DREVET, P. & PUJADE-RENAUD, V. 2012. First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. Fungal Diversity 54: 87-99.

DÉON, M.; FUMANAL, B.; GIMENEZ, S.; BIEYSSE, D.; OLIVEIRA, R.R.; SHUIB, S.S.; BRETON, F.; ELUMALAI, S.; VIDA, J.B.; SEGUIN, M.; LEROY, T.; ROECKEL DREVET, P. & PUJADE RENAUD, V. 2014. Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. Fungal Biology, 118(1):32-47.

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

ELLIS, M.B. & HOLLIDAY, P. 1971. *Corynespora cassiicola*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 303:1-2.

FAOSTAT - FAO Statistics Division. 2015. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acesso em: 26 de Fevereiro de 2015.

FARR, D.F. & ROSSMAN, A.Y. 2015. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em < http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Corynespora%20cassiiicola&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes >. Acesso em: 30 de abril de 2015.

FILGUEIRA, F.A.R. 2013. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. : UFV. Viçosa. p.421.

GARCIA, A. 1999. A resistência dos fungos como consequência da utilização de fungicidas sistêmicos: mecanismos de resistência. monitoramento e estratégias anti-resistência. Porto Velho: Embrapa Rondônia, p28. (EMBRAPA-CPAF Rondônia. Documentos, 45).

GARIBALDI, A.; RAPETTI, S.; ROSSI, J. & GULLINO ML, 2007. First report of leaf spot caused by *Corynespora cassiicola* on basil (*Ocimum basilicum*) in Italy. Plant Disease 91. 1361.

GHINI, R. & KIMATI, H. 2000. Resistência de fungos a fungicidas. 1ª edição. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.78.

GUARRO, J.; GENE, J. & STCHIGEL, A.M. 1999. Developments in fungal taxonomy. Clinical Microbiology Reviews 12: p.454-500.

GUSSOW, H.T. 1906. Ueber eine neue Krankheit an Gurken in England (*Corynespora mazei*, Güssow gen. et spec. nov.) Z. Pflkrankh. vol.16. p.10-13.

HUANG, H.K.; LIU, C.E.; LIOU, J.H.; HSIUE, H.C.; HSIAO, C.H. & HSUEH, P.R. 2010. Subcutaneous infection caused by *Corynespora cassiicola*, a plant pathogen. Journal of Infection 60:188–90.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. Levantamento sistemático da produção agrícola. 2014. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=4&z=t&o=26&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1>
Acesso em: 26 de Fevereiro de 2015.

ISHII H. 2005. Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agricultural Research Quarterly* 40:205-211.

JINJI, P.; ZHANG, X.; QI, Y.; XIE, Y.; ZHANG, H. & ZHANG, H. 2007. First record of *Corynespora* leaf fall disease of Hevea rubber tree in China. *Aust Plant Dis Notes*. 2:35-6.

JONES, J. & JONES, J. 1984. Target spot of tomato: Epidemiology and control. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* n.97. p.216-218. (Abstract).

KAWAMURA, E. 1931. On the causal fungus of ring spot of cowpea (*Cercospora vignicola* n. sp.). *Fungi Nippon Fungological Society*. v.1. p.14-20.

KINGSLAND, G.; SITTERLY, R. 1986. Studies on fungicides for control of *Corynespora cassiicola* leaf spot of tomatoes in the Republic of Seychelles. *Microbiology Abstract Section C*. n.15. p.94. (Abstract).

KURT S. 2004. Host-specific toxin production by the tomato target leaf spot pathogen *Corynespora cassiicola*. *Turk J Agric and Fores* 28:389-395.

LOPES, C.A.; DOS SANTOS, J.R.M. 2000. Doenças: Identificação e Controle. *In: Silva J. B. C. da; Giordano L. B. (Orgs.) Tomate para o processamento industrial. Brasília DF: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças. p. 36-59.*

LOPES, C.A.; REIS, A. & BOITEUX, L.S. Doenças fúngicas. *In: Lopes, C.A.; Ávila, A.C. (Org.). Doenças do tomateiro. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2005. p.17-51.*

LV, G.X.; GE, Y.P.; SHEN, Y.N.; LI, M.; ZHANG, X.; CHEN, H.; DENG, S.; DE HOOG, G.S. & LIU, W.D. 2011. Phaeohyphomycosis caused by a plant pathogen, *Corynespora cassiicola*. Medical mycology. 49:657-61.

MEDEIROS, P.R.F.; DUARTE, S.N.; DIAS, C.T.S.; SILVA, M.F.D. 2010. Tolerância do pepino à salinidade em ambiente protegido: Efeitos sobre propriedades físico-químicas dos frutos. Irrigação. vol. 15. n.3. p.301-311.

MENDONÇA, R.F.; RODRIGUES, W.N.; JESUS JÚNIOR, W.C.; SAMBUGARO, R. & MARTINS, L.D. 2012. Mancha de corynespora: desafio para a cultura do café conilon no Estado do Espírito Santo. Enciclopédia Biosfera. Goiânia. vol.8. n.14. p.724-734.

MESQUINI, R.M. 2012. Componentes monocíclicos e quantificação de danos no patossistema *Corynespora cassiicola* - soja/Renata Moreschi Mesquini. Piracicaba, p.92 : il.

MOHANTY, N.N. & MOHANTY, N.W. 1955. Target leaf spot of tomatoes. Sci. and Culture Calcutta. 21: 330-332.

MULITERNO DE MELO, M. 2009. Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiicola* em soja. Dissertação de Mestrado. Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo. p.76.

OLIVE, L.S.; BAIN, D.C. & LEFEBVRE, C.L. 1945. A leaf spot of cowpea and soybean caused by an undescribed species of *Helminthosporium*. Phytopatology. St. Paul. vol.35, p.822 -831.

OLIVEIRA, R. R.; AGUIAR, B.M.; TESSMANN, D.J.; PUJADE-RENAUD, V. & VIDA, J. 2012. Chlamydospore formation by *Corynespora cassiicola*. Tropical Plant Pathology. Brasília. vol.37. n.6.

PAPA, M.F.S. 2005. Doenças da acerola (*Malpighia emarginata*). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. Agronômica Ceres. São Paulo. vol.2. p.15-18.

PARREIRA, D.F.; NEVES, W.S. & ZAMBOLIM, L. 2009. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas. Maranhão. vol.3, n.2, p.24-34.

PERALTA, I.E.; SPOONER, D.M. & KNAPP, S. 2008. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). Systematic Botany Monographs 84: 1–186.

PERNEZNY, K. & SIMONE, G.W. 1993. Target spot of several vegetable crops. University of Florida, 1993. Disponível em: < <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/VH/VH05200.pdf> > Acesso em: 26 de Fevereiro de 2015.

PERNEZNY, K.; STOFFELLA, P.; COLLINS, J.; CARROLL, A. & BEANY, A. 2002. Control of target spot of tomato with fungicides, systemic acquired resistance activators, and a biocontrol agent. Plant Protection Science. 38:81-88.

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

REIS, A. & BOITEUX, L.S. 2007. Mancha-de-corinéspora do tomateiro. Comunicado Técnico, Embrapa Hortaliças. Brasília-DF. Outubro. ISSN 1414-9850.

REIS, E.M.; REIS, A.C. & CARMONA, M.A. 2010. Manual de fungicidas – Guia para o Controle Químico de Doenças de plantas. 6 ed. Editora UPF. Passo Fundo. p.226.

REIS, B.P.; LANNA FILHO R.; ALFENAS R.F. & ALFENAS A.C. 2014. First report of *Corynespora cassiicola* causing severe leaf blight on Eucalyptus in Brazil. New Disease Reports 29, 7.

ROMEIRO, R. S.; FILHO, R.L.; MACAGNAN, D.; GARCIAI, F.A.O. & SILVA H.S.A. 2010. Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassiicola*. Tropical Plant Pathology. Lavras. vol.35. n.1. p.11-15.

SAKATA SEED SUDAMERICA. 2015. Disponível em <http://www.sakata.com.br/>. Acessado em 20 de março de 2015.

SCHLUB, R.L.; SMITH, L.J.; DANTOFF, L.E. & PERNEZNY, K. 2009. An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. Acta Horticulturae 808:25-28.

SHIMOMOTO, Y.; SATO, T.; HOJO, H.; MORITA, Y.; TAKEUCHI, S.; MIZUMOTO, H.; KIBA, A. & HIKICHI, Y. 2011. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. Plant Pathology 60:253-260.

SILVA, J.B.C. & GIORDANO, L.B. 2000. Tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa Hortaliças. p.168.

SILVA, W.P.K.; DEVERALL, B.J. & LYON, B.R. 1995. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. Australian Journal of Botany. 43:609-618.

SILVA, W.P.K.; WIJESUNDERA, R.L.C.; KARUNANAYAKE, E.H.; JAYASINGHE, C.K. & PRIYANKA, U.M.S. 2000. New hosts of *Corynespora cassiicola* in Sri Lanka. Plant Disease 84. 202.

SIMMONDS, J.H. 1958. Science Branch, Plant Pathology Section. Qd. Dept. Agric. Rept. 1957-58: 58-59.

SOUZA, A. F.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; MENDES, C.; FREITAS, R.L.; ZAMBOLIM, E.M.; JESUS JUNIOR, W.C. & PEREIRA, O.L. 2009. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and berry spots on *Coffea canephora* in Brazil. Australasian Plant Diseases Notes, Collingwood, v.4, n.1, p.72-74.

TERAMOTO, A.; MARTINS, M.C.; FERREIRA, L.C. & CUNHA, M.G. 2011. Reaction of hybrids, inhibition in vitro and target spot control in cucumber. Horticultura Brasileira 29: 342-348.

TERAMOTO, A.; MARTINS, M.C.; FISCHER, I.H.; ANGELI, S.S.; SCHIMDT, D.F. & VEIGA, J. 2004. Controle químico in vitro de *Corynespora cassiicola*, agente causal da mancha alvo em pepino. In: Congresso Brasileiro DE Fitopatologia. 37. SBF. Brasília. p.85-86.

VALLAD, G.E. & BURLACU, V. 2011. initial Characterization of *Corynespora cassiicola* and *Alternaria* spp. affecting Florida Tomatoes: Fungicide resistance, pathogen variability, and host resistance. Disponível em <http://swfrec.ifas.ufl.edu/docs/pdf/veg-hort/tomato-institute/proceedings/ti11_proceedings.pdf>. Acesso em: 21 de Janeiro de 2015.

VAN BALKEN, J.A.M. 2015. The plant family of the *Solanaceae*: a comprehensive overview. Disponível em <[http:// www.hvanbalken.com](http://www.hvanbalken.com)>. Acesso em: 21 de Janeiro de 2015.

VERZIGNASSI, J.R.; VIDA, J.B. & TESSMANN, D.J. 2003. *Corynespora cassiicola* causando epidemias de manchas foliares em pepino ‘japonês’ sob estufa no norte do Paraná. Fitopatologia Brasileira 28: 570.

WEI, C.T. 1950. “Notes on *Corynespora*.” Mycological Papers, No. 34. Commonwealth Mycol. Inst. Kew. p.10.

WILCKEN, S.R.S.; ROSA J.M.O.; HIGUTI A.R.O.; GARCIA M.J.M.; CARDOSO A.I.I. 2010. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em porta-enxertos e híbridos de pepino. Horticultura Brasileira. Brasília. DF. vol.28. n.1. p.100-103.

YAMADA, H.; TAKAHASHI, N.; HORI, N.; ASANO, Y.; MOCHIZUKI, K.; OHKUSU, K. & NISHIMURA, K. 2013. Rare case of fungal keratitis caused by *Corynespora cassiicola*. Journal of Infection and Chemotherapy 19(6): p.1167-1169.

CAPÍTULO 2

Variabilidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Corynespora* do Brasil e da Flórida

Variabilidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Corynespora* do Brasil e da Flórida

Resumo

Devido à grande diversidade morfológica e patogênica existente entre os isolados do fungo *Corynespora cassiicola*, causador da mancha-alvo em diversas culturas de importância econômica por todo o mundo, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização molecular, morfométrica e patogênica de isolados de *Corynespora* provenientes de diferentes hospedeiras coletados em diferentes regiões do Brasil e do estado da Flórida, nos Estados Unidos. Os 112 isolados avaliados foram identificados como pertencentes apenas à espécie *C. cassiicola*. As regiões genômicas ITS, fator de alongação 1- α e β -tubulina apresentaram comportamentos diferentes quanto à distribuição e a resolução intraespecífica dos isolados avaliados. As árvores filogenéticas das regiões ITS e fator de alongação apresentaram limitada resolução intraespecífica dos isolados quanto à hospedeira de origem e região geográfica de coleta. A árvore filogenética construída utilizando-se somente as sequências da região β -tubulina apresentou melhor distribuição dos isolados quanto à hospedeira de origem, com formação de dois clados distintos, cada um deles representado em sua maioria por isolados provenientes da cultura do tomate e do pepino. Treze isolados de *C. cassiicola*, representativos das árvores filogenéticas, apresentaram grande variabilidade morfológica quanto à cor, textura e forma da colônia, bem como, à taxa de crescimento micelial. Quanto à cor da colônia, os isolados apresentaram seis diferentes cores. A forma poligonal predominou entre as colônias. Quanto à textura da colônia, os isolados dividiram-se em dois grupos, 7 com textura fina e 6 com textura cotonosa. A média da taxa de crescimento micelial foi de 6,05 mm/d. As dimensões dos conídios variaram de 7,39 a 386,05 μ m de comprimento, 5,8 a 14,08 μ m de largura e 0 a 24 para o número de pseudoseptos. No teste de patogenicidade os três isolados de *C. cassiicola* avaliados confirmaram patogenicidade às suas hospedeiras de origem. Somente oito espécies de plantas avaliadas não apresentaram suscetibilidade aos isolados. Após caracterização molecular, morfométrica e patogênica dos isolados de *C. cassiicola* avaliados, concluiu-se que, exceto para a região β -tubulina, nenhuma relação entre a hospedeira de origem e a região geográfica de coleta dos isolados foi estabelecida neste estudo.

Palavras-chave: mancha-alvo, ITS, fator de alongação 1- α , β -tubulina, filogenia.

Genetic variability, morphological and pathogenic of *Corynespora* isolates from Brazil and from Florida

Abstract

Because of the big morphologic and pathogenic diversity that exists among the isolates of the fungus *Corynespora cassiicola*, causal agent of target spot of many crops worldwide, this work aimed to do the molecular, morphometric and pathogenic characterization of *Corynespora* isolates from different host and different geographic regions of Brazil and from Florida State, USA. All 112 isolates belong to the species *C. cassiicola*. The genomic regions ITS, elongation factor 1- α and β -tubulin presented different behaviour as to distribution and resolution intraspecific of isolate tested. Phylogenetic trees of the ITS regions and elongation factor showed limited intraspecific resolution of isolates as to host of origin and geographical region. The phylogenetic tree, constructed using only the sequences of the gene β -tubulin, showed better distribution of isolated as to host of origin, with the formation of two distinct clades each one represented mostly by isolates from tomato and cucumber. Thirteen isolates of *C. cassiicola* representatives of phylogenetic trees showed a great morphological variability as to colour, texture and shape of the colony, as well as the mycelial growth rate. For colony color, the isolates showed six different colors. The polygonal form predominated among the colonies. For colony texture isolates were divided in two groups, 7 isolates with fine texture and 6 isolates with cottony texture. The average mycelial growth rate was 6.05 mm / day. The dimensions of the conidia ranged from 7.39 to 386.05 mm in length, 5.8 to 14.08 mm in width and 0 to 24 for the number of pseudoseptos. In the pathogenicity test all the three isolates of *C. cassiicola* tested confirmed pathogenicity to their host of origin. Only eight species of plants tested didn't show susceptibility to any isolate. After molecular characterization, morphometric and pathogenic isolates of *C. cassiicola* tested, it was concluded that, except for the β -tubulin region, no relationship between the host of origin and geographical region of the isolates was established in this study.

Key-words: target spot, ITS, elongation factor 1- α , β -tubulin, phylogeny.

Introdução

Uma das mais importantes doenças da parte aérea do tomateiro e pepineiro em diversas regiões produtoras, principalmente no estado da Flórida, nos Estados Unidos, na Região Norte do Brasil, no Estado do Maranhão e, nas regiões centro-oeste e sudeste, é a mancha-alvo ou mancha de corinéspora (Reis & Boiteux, 2007; Vallad & Burlacu, 2011).

O fungo causador da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei, apresenta ampla distribuição geográfica principalmente nos trópicos, sendo relatado em mais de 350 plantas hospedeiras, em mais de 80 países, parasitando folhas, flores, caules, raízes de vegetais, cistos de nematoides e tecido humano (Carris & GLAWE, 1986; Dixon *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2013; Farr & Rossman, 2015). Este fungo causa grandes problemas em diversas culturas de importância econômica por todo o mundo, incluindo o café conilon (Souza *et al.*, 2009), eucalipto (Reis *et al.*, 2014), seringueira (Chee, 1990), algodão (Jones, 1961), pepino (Blazquez, 1967), soja (Seaman & Shoemaker, 1964), fumo (Fajola & Alasoadura 1973) e tomate (Mohanty & Mohanty 1955).

O fungo *C. cassiicola* foi primeiro detectado na cultura do tomate em 1936 por F. C. Deighton em Serra Leoa na África Ocidental (Wei, 1950). No Brasil, o primeiro relato desse patógeno no tomateiro foi realizado por Alves *et al.* (1985) na cidade de Manaus no estado do Amazonas. Na cultura do pepino, seu primeiro relato ocorreu no estado da Flórida, nos Estados Unidos (Blazquez, 1967). No Brasil, esta doença do pepino foi relatada pela primeira vez por Verzignassi *et al.* (2003) no estado do Paraná. Por apresentar uma grande diversidade em relação à forma com que parasita suas hospedeiras, os isolados de *Corynespora* são classificados como patogênicos quando isolados de materiais provenientes de tecido sintomático e, saprofítico e endofítico quando isolados de material em decomposição ou de tecido vivo assintomático, respectivamente (Boosalis & Hamilton, 1957; Kingsland &

Sitterly, 1986; Chase, 1993; Raffel *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004; Kodsueb *et al.*, 2008; Chomcheon *et al.*, 2009).

Um mesmo isolado de *Corynespora* pode apresentar comportamento saprofítico e patogênico em relação a diferentes hospedeiras, pode também ser patogênico a grande número de hospedeiras ou ser patogênico somente à hospedeira de origem (Onesirosan *et al.*, 1974; Kingsland & Sitterly, 1986; Cutrim & Silva, 2003; Oliveira *et al.*, 2007). Outro dado importante a respeito da diversidade desse fungo é a ocorrência de raças e forma *specialis* (f.sp.). Ismail & Jeyanayagi (1999) identificaram duas raças de *C. cassiicola* infectando clones de seringueira. A raça 1 infectando os clones RRM 600, GT1 e IAN 873 e a raça 2 infectando RRIM 2020. Pereira *et al.* (2003), em teste de patogenicidade com diferentes hospedeiras e com 17 biótipos de *Lantana* spp. de diferentes países, observaram especificidade e severidade de quatro isolados de *C. cassiicola* provenientes de plantas de lantana, hortênsia, tomate e trapoeraba a suas hospedeiras de origem. Neste trabalho, os autores nomearam o isolado de *C. cassiicola* proveniente de plantas de lantana de *C. cassiicola* f. sp. *lantanae*.

Os isolados de *Corynespora* também apresentam grande diversidade morfológica, principalmente em relação à coloração da colônia, tamanho e formato dos conídios. Nghia *et al.* (2008), em análise morfométrica de isolados de seringueira na Malásia, observaram grande diversidade dos isolados em relação à cor da colônia, variando de marrom claro a cinza escuro. Os esporos variaram em obclavado, cilíndrico ou oval, retos ou curvos e de diversos tamanhos. Já Sousa & Bentes (2014) observaram grande variabilidade na coloração das colônias entre isolados do mesmo hospedeiro, entre isolados de hospedeiros diferentes e até mesmo entre diferentes meios de cultura. Nos meios batata dextrose ágar e batata sacarose ágar, a coloração das colônias variou de cinza a cinza escuro, no meio aveia ágar, predominou

o cinza claro e, no meio cenoura ágar, a maioria dos isolados apresentou coloração hialina a cinza claro.

Devido à ampla diversidade patogênica e morfológica dos isolados de *Corynespora*, estudos da variabilidade genética têm sido realizados no intuito de identificar variabilidade na população deste patógeno. Nghia *et al.* (2008), utilizando análise de ISSR (Internal Simple Sequence Repeat) com 8 “primers”, em 21 isolados provenientes de clones de seringueira de diferentes regiões da Malásia, encontraram dois grupos distintos separados em relação à região geográfica de coleta. Um grupo com isolados das regiões de Johor e Selangor e outro grupo com isolados de diferentes regiões. Silva *et al.* (1998), também observaram variabilidade genética de 32 isolados de *C. cassiicola* de diferentes hospedeiras e diferentes regiões geográficas para as regiões ITS (*internal transcribed spacer region*) por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), e para o DNA total por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Neste caso foi observada correlação em relação à cor da colônia, taxa de crescimento da colônia e virulência à berinjela, porém não houve relação com a região geográfica de coleta dos isolados.

No Brasil, assim como em outros países, ainda são poucas as informações sobre a variabilidade genética entre isolados de *Corynespora*. Os poucos trabalhos existentes são restritos à utilização de isolados provenientes da mesma cultura ou mesma região geográfica, bem como, a utilização de números reduzidos de isolados ou de regiões genômicas, como observado nos trabalhos citados anteriormente. Entre eles podem ser citados o trabalho desenvolvido por Oliveira (2008), que fizeram análise filogenética de 24 isolados, provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil, utilizando somente os *primers* ITS1 e ITS2 e o trabalho de Kajiwara *et al.* (2009) que utilizaram dois pares de *primers* (ITS1 e ITS2; β -tub 2a e β -tub 2b) para testar a variabilidade de 27 isolados de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do país.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização molecular, morfométrica e patogênica dos isolados de *Corynespora* provenientes de diferentes hospedeiras coletados em diversas regiões do Brasil e do estado da Flórida, nos Estados Unidos.

Material e Métodos

Todas as atividades relacionadas à análise filogenética dos isolados de *Corynespora* foram conduzidas no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças (CNPQ), em Brasília-DF, Brasil e no Laboratório de Fitopatologia da University of Florida (Gulf Coast Research and Education Center), Wimauma, FL, USA.

Obtenção dos isolados de *Corynespora*

Sessenta e nove isolados de *C. cassiicola*, pertencentes à micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, obtidos de diferentes hospedeiras em diversas regiões do Brasil e 43 isolados pertencentes à micoteca do Laboratório de Fitopatologia da University of Florida foram analisados neste estudo (Tabela 1; Figura 1). Inicialmente os isolados foram recuperados da água (isolados do Brasil) e de glicerol 35% (isolados da Florida), para placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (Castellani, 1939; Menezes & Silva-Hanlin, 1997). Após esta etapa, todos os isolados foram purificados com a confecção de culturas monospóricas, para assegurar a uniformidade genética.

Tabela 1. Origem geográfica e espécie hospedeira dos isolados de *Corynespora* utilizados nas análises filogenética, morfométrica e patogênica.

Isolados	Ano de isolamento	Localização	Espécies Hospedeiras
*EH - 1013 ^a	2004	Pará - PA	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1019	2004	Pará - PA	<i>Cucurbita moschata</i> D.
EH - 1021	2004	Pará - PA	<i>Lactuca sativa</i> L.
EH - 1026	2004	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1027	2004	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1045	2004	Maranhão - MA	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1047	2004	Maranhão - MA	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1048	2004	Maranhão - MA	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
*EH - 1049	2004	Maranhão - MA	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1065	2004	Pará - PA	<i>Hydrangea macrophylla</i> T.
EH - 1066	2004	Pará - PA	<i>Malpighia emarginata</i> D.C.
EH - 1067	2004	Pará - PA	<i>Carica papaya</i> L.
EH - 1068	2004	Pará - PA	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1069	2004	Pará - PA	<i>Lactuca sativa</i> L.
EH - 1070	2004	Pará - PA	<i>Cucumis melo</i> L.
EH - 1090	2005	Espírito Santo - ES	<i>Carica papaya</i> L.
EH - 1091	2005	Espírito Santo - ES	<i>Carica papaya</i> L.
EH - 1092	2005	Espírito Santo - ES	<i>Carica papaya</i> L.
EH - 1107	2005	Goiás - GO	<i>Zinnia elegans</i> JAC.
*EH - 1187	2005	Paraná - PR	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1188	2005	Paraná - PR	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1453	2005	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1454	2005	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1472	2005	Tocantins - TO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1479	2005	Tocantins - TO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
*EH - 1503	2006	Goiás - GO	<i>Sesamum indicum</i> L.
EH - 1504	2006	Goiás - GO	<i>Sesamum indicum</i> L.
EH - 1656	2006	Goiás - GO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1657	2006	Goiás - GO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1659	2006	Goiás - GO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1665	2006	Minas Gerais - MG	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1666	2006	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1667	2006	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1699	2007	Amazonas - AM	<i>Brassica oleracea. var. capitata</i> L.
EH - 1708	2007	Rondônia - RO	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1709	2007	Tocantins - TO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1719	2007	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
*EH - 1720	2007	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1721	2007	Amazonas - AM	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1722	2007	Amazonas - AM	<i>Solanum lycopersicum</i> L.

EH - 1723	2007	Amazonas - AM	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1724	2007	Amazonas - AM	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1769	2008	Rio de Janeiro - RJ	<i>Momordica charantia</i> L.
EH - 1796	2009	Santa Catarina - SC	<i>Catharanthus roseus</i> L.
EH - 1816	2008	Rondônia - RO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
*EH - 1824	2009	Ceará - CE	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1828	2009	Ceará - CE	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1830	2009	Ceará - CE	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp
EH - 1840	2009	Brasília - DF	<i>Cucumis sativus</i> L.
*EH - 1927	2009	Espírito Santo - ES	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1928	2009	Espírito Santo - ES	<i>Cucumis sativus</i> L.
*EH - 1989	2010	Pernambuco - PE	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1990	2010	Pernambuco - PE	<i>Cucumis sativus</i> L.
*EH - 2045	2011	Brasília - DF	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
*EH - 2082	2011	Pernambuco - PE	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 2083	2011	Pernambuco - PE	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 2095	2012	Paraná - PR	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.
EH - 2100	2012	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 2101	2012	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
*EH - 2102	2012	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 2105	2013	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 2106	2013	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
*EH - 2107	2013	Pernambuco - PE	<i>Commelina benghalensis</i> L.
EH - 2108	2013	Pernambuco - PE	<i>Commelina benghalensis</i> L.
EH - 2109	2013	Goiás - GO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 2110	2013	Goiás - GO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
*EH - 2124	2014	Paraná - PR	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.
EH - 2127	2014	Amazonas - AM	<i>Cucurbita pepo</i> L.
EH - 2128	2014	Amazonas - AM	<i>Cucurbita pepo</i> L.
GEV 107	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 108	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1341	2013	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1342	2013	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1343	2013	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1344	2013	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1539	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1540	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1541	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1542	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1543	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1544	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1545	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1546	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1547	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1548	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.

GEV 1549	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1550	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1551	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1552	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1553	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1554	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1555	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1556	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1557	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1558	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1559	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1560	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1563	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1564	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 1566	2014	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 58	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 60	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 618	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 619	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 620	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 621	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 623	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 624	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 625	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 626	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 627	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
GEV 628	2008	Flórida - FL	<i>Solanum lycopersicum</i> L.

^a Código referente à coleção de origem.

* Código referente aos isolados utilizados na caracterização morfométrica.

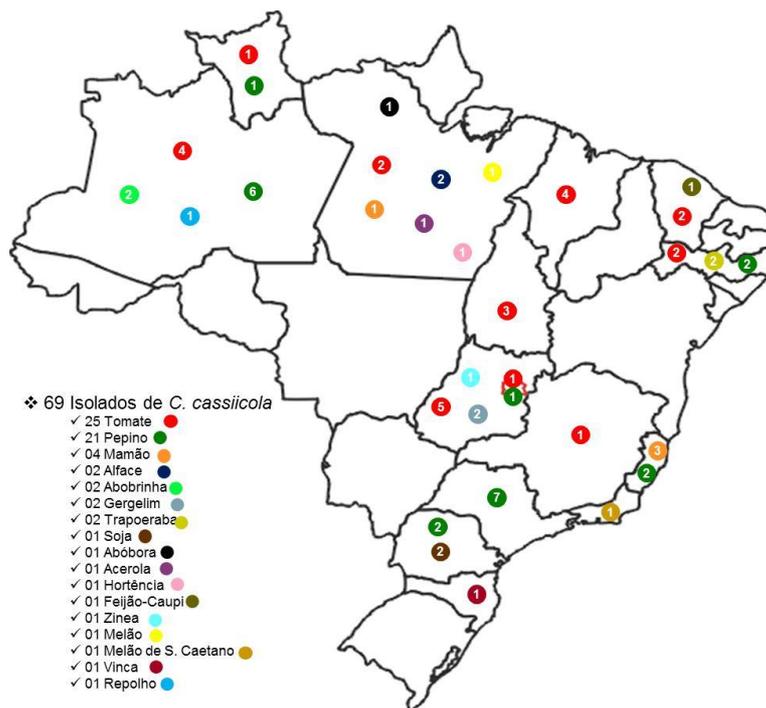


Figura 1. Mapa do Brasil apresentando o local de coleta dos isolados de *Corynespora*.

Extração de DNA

O DNA genômico dos isolados brasileiros foi extraído conforme metodologia descrita por Boiteux *et al.* (1999). Já o DNA genômico dos isolados de *Corynespora* da Flórida foi extraído por meio de protocolo adaptado neste estudo de Dellaporta *et al.* (1983) e Boiteux *et al.* (1999), conforme descrito. Inicialmente, o micélio de cada isolado do fungo obtido de cultura monospórica com aproximadamente sete dias de idade, crescido em meio BDA à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 8h, foi cuidadosamente retirado da placa de Petri com o auxílio de uma lâmina de vidro estéril e armazenado em microtubo de 2 ml contendo esferas. Em cada microtubo foi adicionado 1 ml de Dellaporta *buffer* e $140 \mu\text{L}$ de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) a 10%. As amostras foram agitadas por 5 segundos utilizando o vortex, em seguida, foram agitadas por 30 segundos na velocidade 5 (o ciclo foi repetido) utilizando o aparelho do tipo Precellys[®] 24. Após esta etapa, os microtubos foram levados para o

freezer a -80°C por 10 minutos e, logo após, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados à cada amostra 250 μL de KoAC 8M (*Potassium acetate*). As amostras foram agitadas por 5 segundos no vortex, em seguida, levadas para o freezer a -21°C por 2 minutos, posteriormente, foram centrifugadas a 12000 rpm por 2 minutos. Decorrida essa etapa, 900 μL do sobrenadante foram coletados e transferidos para microtubos de 1.5 ml contendo 540 μL de isopropanol. Novamente, as amostras foram agitadas por 5 segundos, levadas para o freezer a -21°C por 2 minutos e centrifugadas a 12000 rpm por 2 minutos no vortex. Em seguida, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o *pellet* remanescente foi lavado com álcool 70% ($\sim 600 \mu\text{L}$) por duas vezes. Depois de retirado o excesso do álcool, os microtubos abertos foram colocados em incubadora a 37°C por 25 minutos para total evaporação do álcool. Por último, foram adicionados em cada microtubo 100 μL de TE (Tris-HCl 1mM pH 8,0; EDTA 0,5mM), contendo RNase 0,1mM, em seguida, estes foram armazenados em freezer a -4°C *overnight*. Finalizada a extração do DNA genômico, este foi quantificado em aparelho do tipo NanoDrop[®], em seguida, armazenado em freezer a 21°C para posterior uso.

Reação da Polimerase em Cadeia – PCR

Para a reação de PCR foram utilizados os seguintes pares de *primers*: ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), com *amplicon* de 600 pares de bases (pb); EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') e EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'), com *amplicon* de 334 pares de bases (pb); tub-F1 (5'-CCTCAAACCGGTCAATG-3') e tub-R2 (5'-CTGGGTCAACTCGGGGAC-3'), com *amplicon* de 979 pares de bases (pb) (White *et al.*, 1990; Carbone & Kohn, 1999; Shimomoto *et al.*, 2011).

As reações de 20µl foram conduzidas utilizando 2µl de 10xPCR *Buffer*, 1µl de 10mM dNTPs, 0,6 µl de 50mM MgCl₂, 1,8µl de cada *primer* (50pmoles/µl), 0,3µl de Taq DNA Polimerase, 2µl do DNA genômico (aproximadamente 50 ng µl⁻¹) e 10,50µl de água Milli-Q[®] autoclavada. A amplificação dos fragmentos de DNA ocorreu em termociclador My Cycler[™] (BIO RAD). O programa utilizado para amplificação do gene β-tubulina foi 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 94° por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Por fim, um ciclo de 72°C por 7 minutos. Para o gene fator de alongação 1-α o mesmo programa do gene β-tubulina foi utilizado, porém com alteração na temperatura de anelamento para 58°C. Já o programa utilizado para o gene ITS foi 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° por 30 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose (1,5%) em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 120 V durante 2 horas, colorido com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

Para a purificação das amostras (produtos da reação da PCR) foi utilizado o produto ExoSAP-IT[®] (Affymetrix). Após a purificação, as amostras foram encaminhadas para o sequenciamento no laboratório de genômica da Embrapa Hortaliças (Brasília, Brasil) e para a empresa Elim Biopharmaceuticals (Hayward, Califórnia).

Análise das sequências

Para a construção das árvores filogenéticas, as sequências de nucleotídeos obtidas dos diferentes isolados de *Corynespora* foram sequenciados para a região ITS (*internal transcribed spacer region*) e para os genes β-tubulina e fator de alongação 1-α. O sequenciamento dos isolados brasileiros foi realizado no laboratório de genômica da Embrapa Hortaliças (Brasília, Brasil) e dos isolados americanos na empresa Elim Biopharmaceuticals (Hayward, Califórnia). Sequências *forward* e *reverse* de cada isolado foram usadas para

formar suas respectivas sequências consenso. As sequências para cada gene foram alinhadas com base no algoritmo MUSCLE disponível no programa MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). As árvores filogenéticas, baseadas nas sequências, foram construídas com base na Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. O modelo *General Time Reversible* (GTR) foi usado para a reconstrução filogenética. As árvores de Máxima Verossimilhança com bootstrap de 1000 réplicas foram construídas utilizando o programa MEGA v.6, enquanto a análise Bayesiana foi estimada pelo programa MrBayes 3.1 (Ronquist & Huselsenbeck, 2003) com 1.000.000 gerações da Markov chain Monte Carlo (MCMC). As árvores foram visualizadas utilizando o programa FigTree versão 1.4.

Na construção das árvores filogenéticas foram utilizadas, além das sequências dos isolados de *C. cassiicola* em estudo (Tabela 1), 26 sequências (AB539456.1, AB539236.1, AB539169.1, AB539444.1, AB539242.1, AB539175.1, AB539174.1, AB539252.1, AB539267.1, AB539447.1, AB539271.1, AB539204.1, AB539208.1, AB539450.1, AB539285.1, AB539218.1, AB539448.1, AB539290.1, AB539223.1, AB539462.1, AB539292.1, AB539225.1, AB539234.1, JN545761.1, JQ814329.1, KF810910.1, KF266787.1) da região ITS, dos genes fator de alongação 1- α e β -tubulina de isolados de *C. cassiicola* depositadas no GenBank e a sequência do isolado de *C. smithii* NBRC8162 que foi utilizado como *outgroup*.

Caracterização morfológica da colônia

Para este ensaio foram utilizados 13 isolados de *C. cassiicola* representativos de diferentes grupos das árvores filogenéticas (Tabela 1). Um disco de 9 milímetros de diâmetro retirado da margem de uma colônia de *C. cassiicola* com aproximadamente 5 dias de crescimento em meio de cultura BDA 50%, foi colocado no centro de uma placa de Petri sobre o meio de cultura BDA 50%. Em seguida, as placas foram vedadas e mantidas na

câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 8 horas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada tratamento. Na avaliação foram observadas características como cor, forma e textura da colônia. As colônias foram mensuradas diariamente, com medições perpendiculares do diâmetro da colônia, por um período de 5 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio do programa SISVAR (Ferreira, 2011).

Caracterização morfológica de conídios

Para a mensuração dos conídios foram utilizados os mesmos isolados da caracterização morfológica da colônia, exceto o isolado EH-2045 proveniente da cultura do tomate que não apresentou esporulação. Após finalizadas as medições das colônias, os esporos produzidos foram recolhidos e fixados em lâminas de vidro contendo lactofenol para posterior observação. A morfologia e as dimensões dos conídios de cada isolado foram fotografadas usando PowerShot A6501S Modelo da câmara Canon fixo em microscópio Primo Star Zeiss e medidas com AxioVisionLE software (50 conídios foram observados para cada isolado, exceto para os isolados EH-1187, EH-1927 e o EH-1989, cujas observações foram realizadas em 42, 38 e 31 conídios, respectivamente. Foram mensuradas as seguintes dimensões dos conídios: comprimento, largura (região mediana) e número de pseudo-septos. Em relação ao formato, foram divididos quanto à forma (oval, obclavado, cilíndrico e Y) e curvatura (reto ou curvado). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio do programa SISVAR (Ferreira, 2011).

Teste de patogenicidade

Para o teste de patogenicidade foram utilizadas 23 espécies de plantas de importância econômica, sendo algumas reconhecidas como hospedeiras de *C. cassicola*. O semeio foi realizado em bandejas de isopor com 128 células preenchidas com substrato Plantmax®. Após as plantas atingirem duas folhas verdadeiras, estas foram transplantadas para vasos plásticos contendo 1 kg de substrato esterilizado (100 L de solo; 200 g de adubo super simples; 100 g de calcário; 40 g de sulfato amônio e 20 L de casca de arroz).

No preparo do inóculo, foram utilizados os isolados EH-1049, EH-2102 e EH-2107, provenientes da cultura do tomate, pepino e trapoeraba respectivamente. Após 10 dias de incubação em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 8 horas, o meio de cultura BDA 50% contendo esporos do fungo foi raspado utilizando um pincel e água destilada. A concentração de conídios existente na suspensão após filtragem com o auxílio de gaze esterilizada foi aferida em câmara de Neubauer e posteriormente ajustada para 1×10^4 conídios/mL.

Para a inoculação foi utilizado atomizador De Vilbs nº15. O inóculo foi aspergido sobre as folhas, em ambas as faces, até o “ponto de escorrimento”, no estágio em que as espécies vegetais apresentaram o número de folhas suficiente para a inoculação. As plantas controle foram tratadas com água destilada e esterilizada. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento, sendo um vaso com três plantas considerado uma unidade experimental. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas (100% UR) e, em seguida, mantidas em condição de casa-de-vegetação.

Após 10 dias da inoculação foi feita a avaliação observando a incidência da doença em relação ao total de plantas inoculadas. Um segundo experimento foi realizado utilizando os mesmos isolados e hospedeiras com o objetivo de confirmar os resultados obtidos. Os dados

foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio do programa SISVAR (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

Reação da Polimerase em Cadeia – PCR

Todos os isolados de *Corynespora* avaliados, provenientes de diferentes hospedeiras e regiões do Brasil e da Flórida apresentaram fragmentos de DNA de aproximadamente 600 pares de bases (pb) quando amplificado pelos primers ITS4 e ITS5, de aproximadamente 979 pares de bases (pb) para os primers tub-F1 e tub-R2 e de aproximadamente 334 pares de bases (pb) para os primers EF1-728F e EF1-986R (Figura 2).

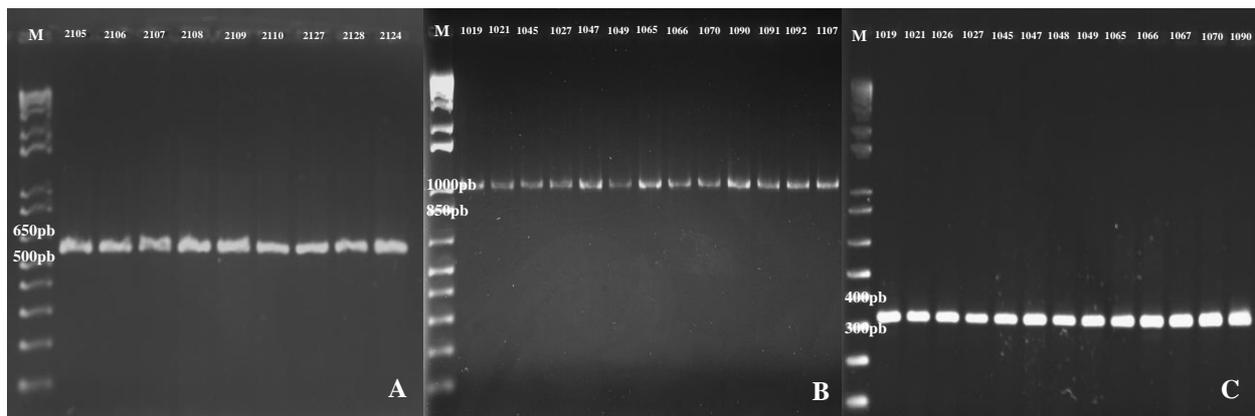


Figura 2. Gel de agarose (1,5%) mostrando o produto da PCR obtido com os *primers* ITS4/ITS5 (A), tub-F1/tub-R2 (B) e EF1-728F/EF1-986R (C), compreendendo as regiões genômicas ITS, fator de alongação 1- α e β -tubulina de *Corynespora cassiicola* originados de diferentes regiões e hospedeiras. Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (M).

As sequências dos isolados de *Corynespora* obtidas nesse trabalho, quando comparadas com sequências depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando-se a ferramenta BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*), demonstraram que todos os isolados apresentaram identidade de nucleotídeos

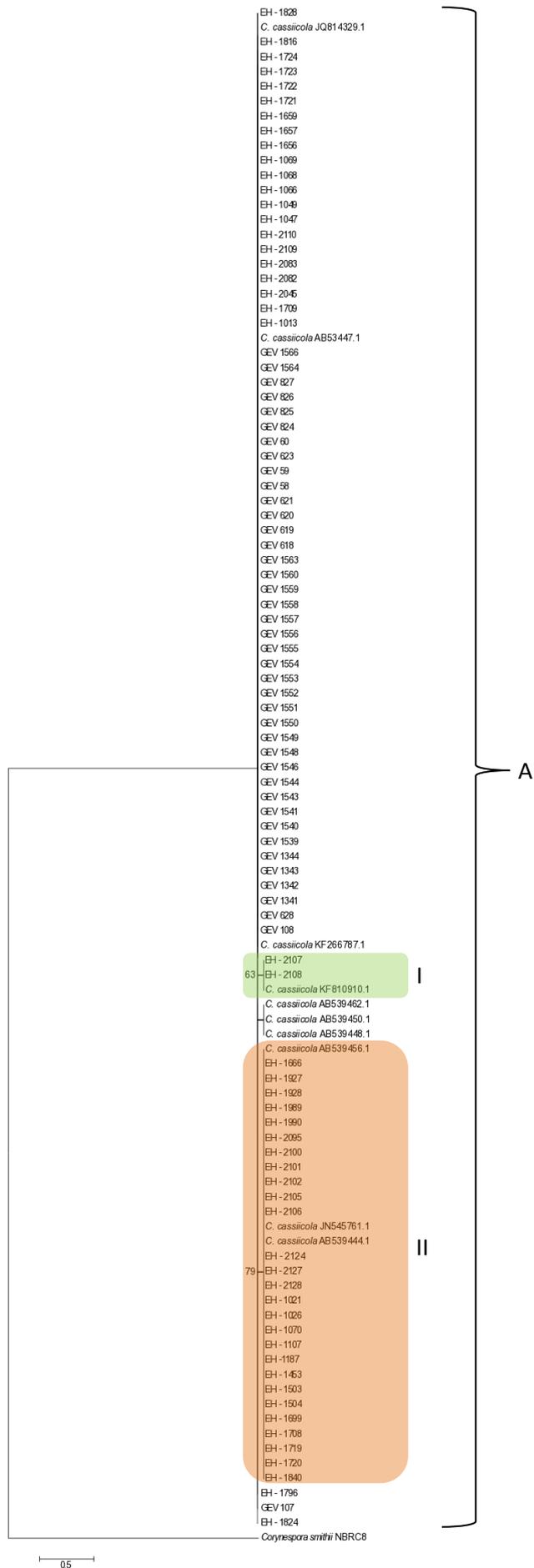
com isolados de *C. cassiicola*. A identidade de sequências variou de 92 a 100% para o gene da β -tubulina, de 94 a 100% para o gene do fator de alongação 1- α e de 91 a 100% para a região ITS. A menor identidade foi encontrada entre os isolados EH-1989 (92%), EH-1656 (94%) e EH-1824 (91%), para os genes β -tubulina, fator de alongação 1- α e região ITS, respectivamente. Apesar da grande diversidade dos isolados quanto à hospedeira de origem e a região geográfica de coleta, não foi identificada neste estudo nenhuma espécie diferente de *C. cassiicola*. Isto confirma a ampla gama de hospedeiras e distribuição geográfica de *C. cassiicola*, conforme já relatado em diversos artigos (Lamotte, 2007; Déon *et al.*, 2014; Farr & Rossman, 2015).

A árvore filogenética gerada com 104 sequências da região ITS, baseada no método de Máxima Verossimilhança, agrupou os isolados em um grande clado (A), quando comparado com *C. smithii* utilizado como *outgroup* (Figura 3). Este clado contém isolados de *C. cassiicola* de diferentes hospedeiras e diferentes regiões geográficas do Brasil e da Flórida, bem como sequências de isolados de referência de *C. cassiicola* obtidos do GenBank. Internamente ao clado A, foram observados dois sub clados (I e II). O sub clado I é formado pelos isolados EH-2107 e EH-2108, ambos provenientes de plantas de trapoeraba do estado de Pernambuco, suportado por um bootstrap de 63% e o sub clado II, formado em sua grande maioria por isolados provenientes da cultura do pepino de diversas regiões geográficas, suportado por um bootstrap de 79% (Figura 3). Os isolados de *C. cassiicola* provenientes da cultura de tomate do Brasil e da Flórida, bem como, os isolados referência do Japão e do Brasil, não apresentaram formação de sub clados, apenas um agrupamento único dentro do grande clado A. Estes resultados indicam a baixa resolução intraespecífica da região ITS para este fungo, seja relacionado com a hospedeira de origem ou com a região geográfica de coleta dos isolados. Contudo, neste estudo foi observada no sub clado II, uma tendência ao agrupamento

de isolados de *C. cassicola* provenientes da cultura do pepino. Por outro lado, nenhum tipo de relação quanto à região geográfica de origem foi observada (Figura 3).

Esses resultados corroboram os de Oliveira (2008) em análise filogenética utilizando 24 isolados de *C. cassicola* provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil. Os resultados mostraram que a região ITS permitiu somente a identificação da espécie, diferenciando os 24 isolados somente do gênero *Helminthosporium*, agrupado anteriormente à espécie *C. cassicola*. Nenhuma relação foi encontrada quanto à hospedeira de origem ou a região geográfica de coleta dos isolados. Romruensukharom *et al.* (2005), utilizando os primers ITS4 e ITS5, por meio da técnica de RFLP em 24 isolados de seringueira coletados de diferentes regiões geográficas da Tailândia, observaram que essa região permitiu também somente a identificação da espécie. Neste mesmo trabalho, os autores também utilizaram a técnica de RAPD, onde foi possível separar os isolados em três distintos clados, porém não foi observada relação desses clados com à região geográfica de coleta dos isolados. Bakhshi *et al.* (2015), relataram em estudo utilizando 161 isolados de *Cercospora* provenientes de 102 diferentes hospedeiras no norte do Irã, que a região ITS apresentou uma resolução limitada para quase todas as espécies, sendo capaz apenas de distinguir *C. chenopodii*, *C. solani* e *C. sorghicola* das outras espécies. Crouch *et al.* (2009), utilizando sequências da região ITS de 69 isolados de *Colletrichum* provenientes de grama, observaram que em análise filogenética realizada para este patógeno utilizando somente a região ITS, em alguns casos os resultados podem mostrar-se não confiáveis, apresentando árvore filogenética de baixo suporte e limitada resolução intraespecífica.

Figura 3. Árvore filogenética de 104 sequências de ITS gerada a partir de análise de Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 réplicas não paramétricas de bootstrap. Foram utilizadas 93 sequências dos isolados do Brasil e da Flórida, 10 sequências (AB539456.1 - *Perilla frutescens* L., Japão; AB539444.1 - *Cucumis sativus* L., Japão; AB539447.1 - *Solanum lycopersicum* L., Japão; AB539450.1 - *Solanum melongena* L., Japão; AB539448.1 - *Capsicum annum.* L., Japão; AB539462.1 - *Capsicum annum.* L., Japão; JQ814329.1 - *Hevea brasiliensis* L., Brasil; JN545761.1 - *Malvaviscus concinnus* Kunth, Equador; KF810910.1 - *Hydrangea macrophylla* T., Brasil; KF266787.1 - *Solanum lycopersicum* L., Brasil) dos isolados de *C. cassiicola* depositadas no GenBank e a sequência do isolado de *C. smithii* NBRC8162 que foi utilizado como *outgroup*.



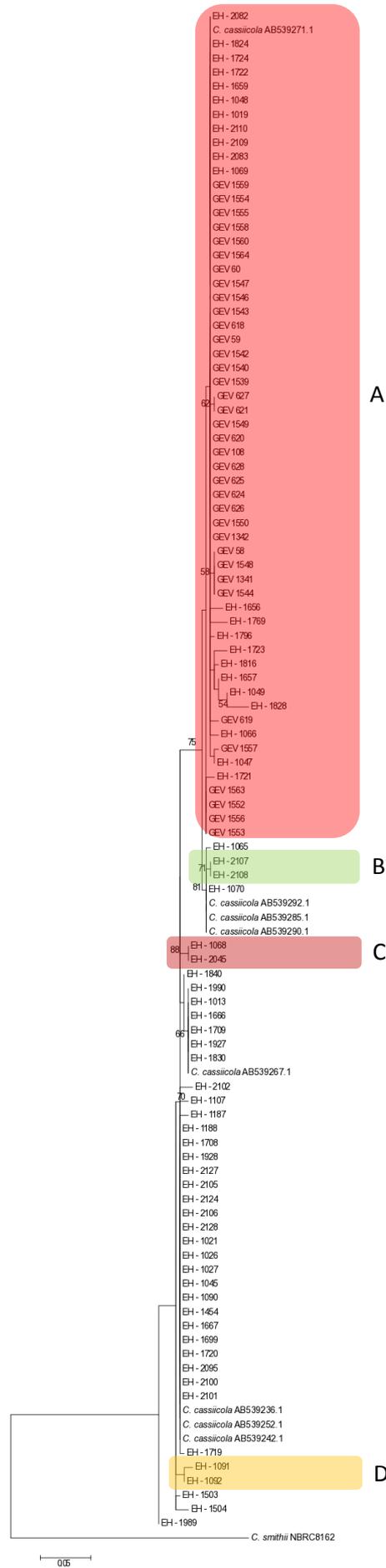
A Figura 4 ilustra a árvore filogenética gerada com 109 sequências do gene do fator de alongação 1- α . Os resultados observados nesta árvore mostram melhor distribuição dos isolados de *C. cassiicola*, com formação de um número maior de clados, quando comparado aos resultados obtidos na árvore filogenética gerada com sequências da região ITS. Porém, foi observada baixa resolução intraespecífica em relação aos isolados de diferentes hospedeiras e regiões geográficas. Entre os diversos clados apresentados nesta árvore, pode-se destacar o clado A, que apresentou o agrupamento em sua grande maioria de isolados de *C. cassiicola* proveniente da cultura do tomate, coletados no Brasil e na Flórida. Entretanto, neste clado não foi possível observar relação dos isolados quanto à região geográfica de coleta (Figura 4). Internamente a outros clados, porém bastante semelhante ao observado na árvore filogenética gerada com as sequências da região ITS, o clado B representado pelos isolados de trapoeraba (EH-2107 e EH-2108) coletados no estado de Pernambuco, também apresentaram agrupamento quando submetidos ao fator de alongação 1- α , suportado por um bootstrap de 70% (Figura 4).

No clado C, pode-se observar uma tendência desse gene ao agrupamento de isolados provenientes da cultura do tomate. Neste caso, representado pelos isolados EH-1068 e EH-2045, coletados no Estado do Pará e em Brasília respectivamente, suportado por um bootstrap de 88% (Figura 4). A tendência deste gene ao agrupamento de isolados provenientes da mesma hospedeira de origem foi reforçada no clado D, com o agrupamento dos isolados EH-1091 e EH-1092, ambos provenientes da cultura do mamão, coletados no estado do Espírito Santo. Os demais isolados, entre eles os isolados de *C. cassiicola* provenientes da cultura do pepino, agruparam em outros clados sem correlação evidente tanto em relação à hospedeira de origem, quanto à região geográfica de coleta (Figura 4).

Em estudo de filogenia utilizando a região ITS e o gene fator de alongação 1- α , Groenewald *et al.* (2013) trabalharam com 360 isolados de *Cercospora* provenientes de 88

diferentes hospedeiras e 49 países. Os resultados indicam que, quando os autores utilizaram somente a região ITS, esta foi capaz de distinguir apenas *C. zeina* e *C. zeae-maydis*. Porém, quando utilizado o gene fator de alongação 1- α , este foi capaz de distinguir 33 das 73 espécies. Ademais, os autores citam, ainda, a necessidade do sequenciamento de outros genes para uma melhor identificação das espécies. Woudenberg *et al.* (2014), também em trabalho de filogenia com 183 isolados de *Alternaria*, utilizaram uma análise com vários genes, entre eles o gene fator de alongação 1- α . Estes autores encontraram em seus resultados 62 espécies descritas e outras novas espécies de *Alternaria*, quando utilizaram esse gene.

Figura 4. Árvore filogenética de 109 sequências do gene fator de alongação 1- α gerada a partir de análise de Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 réplicas não paramétricas de bootstrap. Foram utilizadas 100 sequências dos isolados do Brasil e da Flórida, 8 sequências (AB539236.1 - *Perilla frutescens* L., Japão; AB539242.1 - *Cucumis sativus* L., Japão; AB539252.1 - *Cucumis sativus* L., Japão; AB539267.1 - *Hydrangea macrophylla* L., Japão; AB539271.1 - *Solanum lycopersicum* L., Japão; AB539285.1 - *Solanum melongena* L., Japão; AB539290.1 - *Capsicum annum*. L., Japão; AB539292.1 - *Capsicum annum*. L., Japão) dos isolados de *C. cassiicola* depositadas no GenBank e a sequência do isolado de *C. smithii* NBRC8162 que foi utilizado como *outgroup*.



A árvore filogenética baseada no método de Máxima Verossimilhança gerada a partir das sequências do gene β -tubulina, obtidas de isolados de *C. cassicola* de diferentes hospedeiras e regiões geográficas, e isolados obtidos do GenBank ilustrados na Figura 5, indicou melhor distribuição dos isolados de *C. cassicola* quando submetidos ao sequenciamento com o gene β -tubulina em comparação com a região ITS e o gene fator de alongação 1- α apresentados anteriormente.

O gene β -tubulina apresentou melhor resolução intraespecífica em relação à hospedeira de origem dos isolados com a formação de dois cladogramas significativamente distintos, clado A e clado B, com alto suporte de bootstrap. O clado A, formado principalmente pelos isolados de *C. cassicola* provenientes da cultura do tomate, coletados no Brasil e na Flórida, suportados por um bootstrap de 72%. Os isolados de referência TTRC1-1 e GCC1 obtidos do GenBank proveniente da cultura do tomate coletados no Japão, também se agruparam nesse mesmo clado.

Internamente ao clado A, foram observados três sub cladogramas (A1, A2, A3) que aparentemente evidenciam uma tendência do gene β -tubulina ao agrupamento de isolados de *C. cassicola* coletados na mesma região geográfica (Figura 5). O clado A1 foi formado pelos isolados GEV 624 e GEV 1549, ambos provenientes da cultura do tomate coletados no estado da Flórida. O clado A2, formado pelos isolados EH-1047 e EH-1049, provenientes da cultura do tomate coletados no estado do Amazonas. E o clado A3, formado pelos isolados EH-1824 e EH-1828, provenientes da cultura do tomate coletados no estado do Ceará (Figura 5).

O clado B foi formado pelo agrupamento de isolados de *C. cassicola* provenientes de diferentes hospedeiras, porém com predominância dos isolados de *C. cassicola* provenientes da cultura do pepino (Figura 5). Internamente ao clado B, foram observados outros sub cladogramas, entre eles os sub cladogramas (B1 e B2). Semelhante ao ocorrido nas árvores filogenéticas da região ITS e do gene do fator de alongação 1- α , os isolados EH-2107 e EH-2108,

provenientes de plantas de trapoeraba do estado de Pernambuco, agruparam em um único clado (B1), suportado por um bootstrap de 98% (Figura 5). O clado B2 foi formado pelo agrupamento quase que exclusivamente de isolados de *C. cassiicola* provenientes da cultura do pepino, exceto pelos isolados EH-2045 (tomate), EH-2127 e EH-2128 (abobrinha) e EH-1699 (repolho).

O isolado EH-2045 proveniente da cultura do tomate, diferente dos outros isolados de tomate, agrupou em um clado interno ao B2, com isolados de *C. cassiicola* provenientes da cultura do pepino (Figura 5). Portanto, este resultado evidencia um comportamento diferente do isolado EH-2045 quando submetido aos genes fator de alongação 1- α e β -tubulina. Quando submetido ao gene fator de alongação 1- α , este isolado agrupou com o isolado EH-1068 também proveniente da cultura do tomate, porém quando submetido ao gene β -tubulina, este agrupou com os isolados EH-1719 e EH-1927, ambos provenientes da cultura do pepino, suportado por um bootstrap de 85% (Figura 5). Walker *et al.* (2012), em trabalho de comparação dos genes fator de alongação 1- α e β -tubulina, observaram que o ritmo acelerado da evolução do gene fator de alongação 1- α cria limitações na identificação intraespecífica dos fungos.

A melhor distribuição dos isolados de *C. cassiicola* quanto à hospedeira de origem, obtida pelo gene β -tubulina, em comparação à região ITS e o gene alongação 1- α , pode ser explicada, em partes, pelo tamanho das sequências utilizadas que variaram de 979, 600 a 334 pb para o gene β -tubulina, o gene fator de alongação 1- α e a região ITS, respectivamente. Min & Hickey (2007), avaliando o efeito do comprimento das sequências de DNA de alguns fungos, demonstram que o comprimento das sequências apresenta grandes efeitos sobre os resultados das árvores filogenéticas. Concluindo que as sequências menores que 600 pb não são adequadas para uma relação filogenética precisa, porém são suficientes para a identificação de espécies.

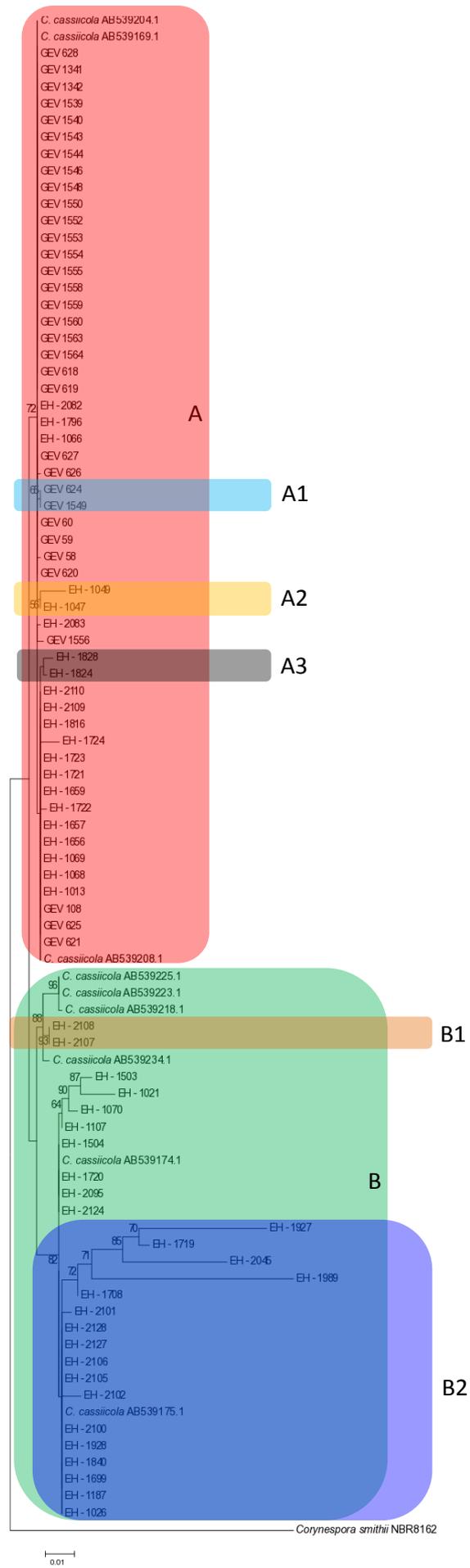
Visando uma melhor distribuição e resolução intraespecífica dos isolados de *C. cassicola* avaliados, foi construída neste trabalho uma árvore filogenética concatenada utilizando a região ITS e os genes elongação 1- α e β -tubulina. Porém, esta não apresentou os resultados esperados, com limitada resolução intraespecífica dos isolados avaliados. Ultimamente, um número maior de genes na construção de uma árvore filogenética concatenada, vem sendo uma prática bastante utilizada nos trabalhos de análise filogenética.

Talhinhas *et al.* (2002) realizaram as primeiras análises filogenéticas utilizando vários genes nas espécies de *Colletotrichum*. A árvore filogenética concatenada utilizando a região ITS e os genes β -tubulina e *his4*, apresentou uma boa distribuição dos isolados quanto à hospedeira de origem e a região de coleta. Porém, resultados negativos como os encontrados neste estudo vem sendo observados em outros trabalhos. Cannon *et al.* (2012) explicam este resultado em revisão realizada com *Colletotrichum* que nem sempre o aumento no número de genes pode melhorar a distribuição e resolução intraespecífica dos isolados avaliados, podendo em alguns casos diminuir o desempenho dos resultados encontrados em análise com genes separadamente. Em alguns casos, essa prática pode vir a aumentar a complexidade, mas não melhorar a clareza dos resultados. Walker *et al.* (2012) realizaram trabalho utilizando várias combinações com a região ITS, os genes elongação 1- α e β -tubulina e os primers FG1093 e MS204 de um novo gene. Os resultados indicaram que, dependendo do número e combinações de genes utilizados na construção da árvore filogenética concatenada, pode vir a limitar a distribuição e resolução intraespecífica dos isolados avaliados.

Os resultados obtidos neste estudo, tanto para o gene do fator de elongação 1- α , quanto para o gene β -tubulina, corroboram os de Shimomoto *et al.* (2011). Estes avaliaram a diversidade genética de 67 isolados de *C. cassicola* de diferentes hospedeiras, entre elas tomate, pepino e pimentão coletados no Japão, utilizando o primer universal para o gene elongação 1- α e construíram um primer para o gene β -tubulina visando a especificidade da

espécie *C. cassicola*. Nos resultados eles obtiveram 3 clados relacionados com a hospedeira e patogenicidade dos isolados, porém nenhuma relação quanto à origem geográfica dos isolados foi observada. Kajiwara *et al.* (2009), além da região ITS, também utilizaram o gene β -tubulina para análise filogenética de 27 isolados de *C. cassicola* de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil. Eles observaram uma tendência ao agrupamento dos isolados em relação à hospedeira de origem distribuídos em três clados, porém eles também não observaram nenhum agrupamento de isolados quanto à região geográfica.

Figura 5. Árvore filogenética de 91 sequências do gene β -tubulina gerada a partir de análise de Máxima Verossimilhança, reconstruída com robustez de 1000 réplicas não paramétricas de bootstrap. Foram utilizadas 81 sequências dos isolados do Brasil e da Flórida, 9 sequências (AB539169.1 - *Perilla frutescens* L., Japão; AB539175.1 - *Cucumis sativus* L., Japão; AB539174.1 - *Perilla frutescens* L., Japão; AB539204.1 - *Solanum lycopersicum* L., Japão; AB539208.1 - *Solanum lycopersicum* L., Japão; AB539218.1 - *Solanum melongena* L., Japão; AB539223.1 - *Capsicum annum* L., Japão; AB539225.1 - *Capsicum annum* L., Japão; AB539234.1 - *Plumeria rubra* L., Japão) dos isolados de *C. cassiicola* depositadas no GenBank e a sequência do isolado de *C. smithii* NBR8162 que foi utilizado como *outgroup*.



Morfologia da colônia

Os 13 isolados de *C. cassiicola* apresentaram grande variabilidade morfológica quanto à cor, textura e forma da colônia, bem como, à taxa de crescimento micelial (Tabela 2; Figura 6). Quanto à cor da colônia, entre os isolados avaliados foram observadas sete diferentes cores, quando analisada a frente da placa, estas variaram do branco ao marrom escuro, e cinco diferentes cores foram observadas quando a análise foi realizada no verso da placa, estas variaram do cinza claro ao preto (Tabela 2; Figura 6).

Neste estudo, os resultados mostram uma predominância de isolados de *C. cassiicola* com colônias de formato poligonal. Quando observada a textura da colônia, sete isolados apresentaram colônias com textura fina e seis apresentaram uma textura cotonosa. Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos encontrados por Qi *et al.* (2011), em trabalho de caracterização morfológica de 22 isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiras da China. Estes autores encontraram cinco diferentes cores de colônia variando do branco ao verde escuro. Diferente do encontrado no presente trabalho, a predominância observada pelos autores foi de colônias com textura cotonosa, porém os dois trabalhos foram bastante similares quanto ao formato da colônia, com predominância de isolados com colônias de forma poligonal. Não foi observada nenhuma relação quanto à hospedeira de origem e a região geográfica de coleta dos isolados.

Diferença significativa em relação à taxa de crescimento micelial foi observada entre os isolados de *C. cassiicola* avaliados (Tabela 2). Comparando-se a taxa de crescimento micelial dos diferentes isolados de *C. cassiicola* foi possível observar, em teste de variância, formação de cinco grupos distintos. O primeiro grupo representado pela letra “a” na Tabela 2, formado pelos isolados EH-1503 e EH-2045 apresentou a menor taxa de crescimento micelial. O isolado EH-2045 proveniente da cultura do tomate apresentou menor taxa de crescimento micelial (3,3 mm/d) e menor diâmetro da colônia (16,5 mm). Os grupos “b” (EH-

1187 e EH-2107), “c” (EH-1049, EH-1720 e EH-1824) e “d” (EH-1013, EH-1927, EH-2082, EH-2101 e EH-2124) apresentaram taxa de crescimento micelial e diâmetro da colônia intermediária. Já o grupo “e”, formado apenas pelo isolado EH-1989 proveniente da cultura do pepino, apresentou maior taxa de crescimento micelial (8,57 mm/d) e maior diâmetro da colônia (42,87 mm) entre os isolados avaliados (Tabela 2).

Nghia *et al.* (2008), utilizando isolados de *C. cassiicola* da cultura da seringueira na Malásia, encontraram em teste de Duncan, 12 grupos distintos quanto à taxa de crescimento micelial. A taxa de crescimento micelial dos isolados variou de 5,7 a 10,0 mm/d e diâmetro da colônia variando de 40,3 a 70,8mm. Oliveira (2008), utilizando isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiras do Brasil, obteve taxa de crescimento micelial com média de 6,8 mm/d, bastante semelhante à média encontrada no presente trabalho, que foi de 6,05 mm/d.

Tabela 2. Caracterização visual e taxa de crescimento micelial (mm/d) de colônias de isolados de *Corynespora cassiicola* aos 5 dias de incubação.

Isolado	Cor da Colônia		Textura	Forma	Taxa de Crescimento (mm/d)		Diâmetro da Colônia
	Frente	Verso					
EH-1013	Cinza	Cinza Claro	Cotonosa	Circular	7,22	d	36,12
EH-1049	Oliváceo	Cinza Claro	Fina	Poligonal	5,85	c	29,25
EH-1187	Marron	Marron Claro	Fina	Poligonal	4,92	b	24,62
EH-1503	Cinza	Cinza Claro	Cotonosa	Poligonal	3,37	a	16,87
EH-1720	Marron Escuro	Marron Escuro	Fina	Poligonal	5,4	c	27
EH-1824	Marron Claro	Marron Claro	Cotonosa	Poligonal	5,65	c	28,25
EH-1927	Branca	Cinza Claro	Cotonosa	Poligonal	6,95	d	34,75
EH-1989	Branca	Marron Claro	Cotonosa	Circular	8,57	e	42,87
EH-2045	Marron Claro	Marron Escuro	Cotonosa	Poligonal	3,3	a	16,5
EH-2082	Oliváceo	Cinza Claro	Fina	Poligonal	7,1	d	35,5
EH-2102	Oliváceo	Preto	Fina	Circular	7,8	d	39
EH-2107	Verde Escuro	Preto	Fina	Poligonal	5,05	b	25,25
EH-2124	Oliváceo	Cinza Escuro	Fina	Poligonal	7,52	d	37,62

Taxa de crescimento micelial e diâmetro da colônia seguidos pela mesma letra minúscula (na coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

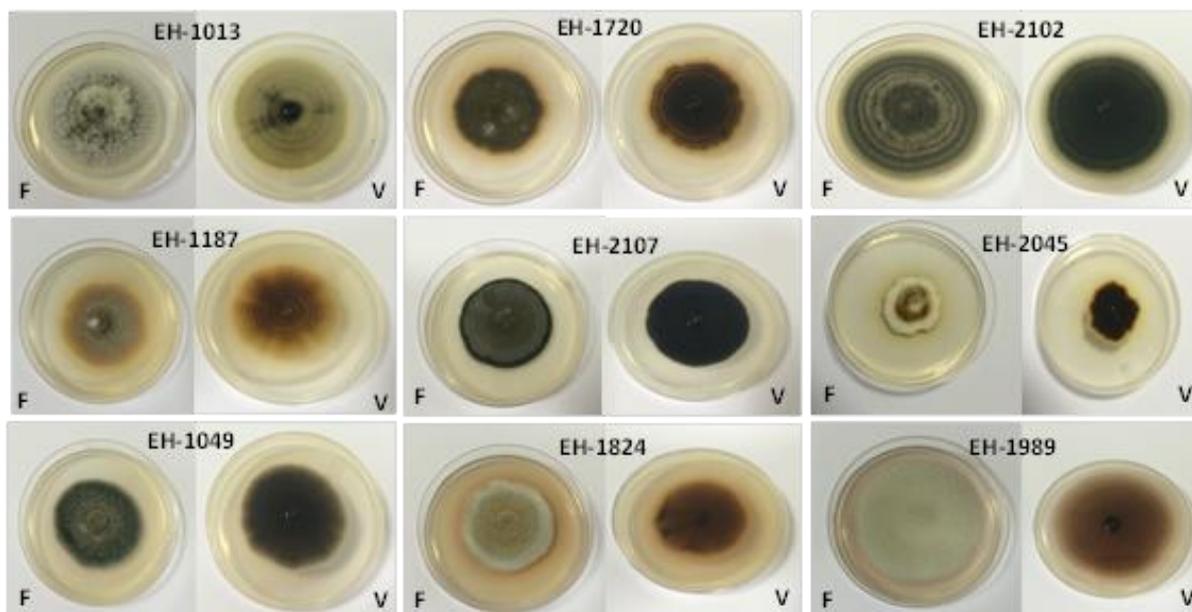


Figura 6. Variabilidade morfológica da colônia entre isolados *Corynespora cassiicola* aos 5 dias de incubação em meio de cultura BDA 50%, temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 8 horas. (F) Frente da placa e (V) Verso da placa.

Morfologia dos conídios

A morfologia dos conídios também foi muito variável entre os isolados de *C. cassiicola* avaliados (Tabela 3; Figura 7). Quanto às dimensões dos conídios, todos os isolados de *C. cassiicola* variaram de 7,39 a 386,05 µm de comprimento, 4,48 a 14,08 µm de largura e 0 a 24 para o número de pseudoseptos (Tabela 3). Quando comparados esses resultados com os limites inferior e superior propostos por Ellis & Holliday (1971) para a descrição da espécie, que varia de 40 a 420 µm de comprimento, 10 a 20 µm de largura e 4 a 20 para o número de pseudoseptos, observa-se uma pequena diferença nas dimensões dos conídios obtidos neste estudo. Todos os isolados apresentaram limite inferior do comprimento de conídio menor que 40 µm proposto por Ellis & Holliday (1971), porém, quanto ao limite superior, todos os isolados avaliados estão dentro do padrão descrito para a espécie. Os resultados para a largura dos conídios também apresentaram as mesmas variações observadas quanto ao comprimento dos conídios. Quanto ao número de pseudoseptos, todos os isolados

avaliados diferiram quanto ao limite inferior e superior descrito para a espécie. Todos os isolados apresentaram limite inferior de pseudoseptos de 0 e o isolado EH-2124 apresentou 24 pseudoseptos (Tabela 3). Qi *et al.* (2011) também encontraram diferença nas dimensões dos conídios de *C. cassiicola* quanto aos limites inferiores e superiores propostos para a espécie. Os resultados apresentados por estes autores mostraram limites inferior de 10,1 e superior de 277,2 para o comprimento, para a largura o limite inferior foi de 1,3 e o superior de 17,1 e número de pseudoseptos dos conídios de 0 a 18.

O isolado EH-2045 apresentou, após sete dias de crescimento em meio BDA 50%, somente clamidósporos, estrutura de resistência produzida por alguns microrganismos devido às condições adversas (Figura 7). De modo semelhante, Oliveira *et al.* (2012) também relatam a produção desta estrutura em colônias de isolados de *C. cassiicola* provenientes da cultura do pepino no Brasil.

Com base na análise de variância das dimensões dos conídios, os isolados de *C. cassiicola* foram divididos em cinco grupos distintos quando observado o comprimento dos conídios (Tabela 3). Os isolados EH-1503 (45,23 μm) e EH-2107 (147,29 μm) apresentaram menor e maior comprimento, respectivamente. Para a largura dos conídios, quatro grupos distintos foram formados, sendo os isolados EH-1927 (7,40 μm) e EH-1720 (10,03 μm), os de menor e maior largura, respectivamente. Quanto ao número de pseudoseptos, os isolados formaram quatro grupos distintos. O isolado EH-2124 (1,42 μm) e o isolado EH-2107 (6,04 μm) apresentaram menor e maior número de pseudoseptos, respectivamente (Tabela 4).

Os isolados de *C. cassiicola* apresentaram grande variabilidade quanto à curvatura e forma dos conídios (Figura 7; Figura 8). Todos os isolados avaliados apresentaram maior percentual de conídios retos em relação aos curvos, exceto o isolado EH-2107 que apresentou 54% dos conídios curvos. Os isolados EH-1049 e EH-2102 apresentaram grandes percentuais de conídios retos, 98% e 96%, respectivamente (Figura 8A).

Os resultados mostram uma grande variabilidade quanto à forma dos conídios, com a maioria dos isolados apresentando conídios distribuídos entre a forma oval, obclavado e cilíndrico, exceto os isolados EH-1927, EH-1989, EH-2107 e EH-2124 que apresentaram somente conídios cilíndricos e obclavados. Entre estes, somente o isolado EH-2124 apresentou mais de 50% dos conídios na forma obclavada (Figura 8B). O isolado EH-1720 proveniente da cultura do pepino destaca-se por apresentar conídios de todas as formas, sendo o único a possuir conídios com a forma de Y (Figura 8B). Isolados com conídios em forma de Y também foram encontrados por Qi *et al.* (2011) em 15 dos 22 isolados de *C. cassicola*. Porém, conídios com a forma obclavada predominaram entre os isolados avaliados por estes autores, bem como, os conídios com formato curvo.



Figura 7. Variabilidade morfológica dos conídios e clamidósporos produzidos por isolados *Corynespora cassicola* com 5 dias de incubação: (A) EH-1989, (B) EH-1503, (C) EH-2107, (D) EH-1049, (E) EH-2045, (F) EH-2082, (G) EH-2124, (H) EH-1720. Escala: 50 μm

Tabela 3. Comprimento (μm), largura (μm) e números de pseudoseptos dos conídios de isolados de *Corynespora cassiicola* aos 5 dias de incubação.

Isolado	Comprimento (μm)				Largura (μm)				Nº de pseudoseptos			
	Mínimo	Máximo	Média		Mínimo	Máximo	Média		Mínimo	Máximo	Média	
EH-1013	21,12	149,16	91.59	c	6,93	12,84	9.58	d	0	14	5.70	d
EH-1049	29,62	244,78	98.37	c	6,5	13,28	9.13	c	0	8	3.60	b
EH-1187	15,08	114,43	60.78	b	5,68	10,94	7.56	a	0	8	3.42	b
EH-1503	13,71	129,27	45.23	a	4,77	11,95	8.06	b	0	9	1.76	a
EH-1720	17,09	182,07	78.57	c	5,52	12,94	10.03	d	0	8	2.78	b
EH-1824	23,56	220,6	85.24	c	5,08	10,94	7.96	b	0	10	4.40	c
EH-1927	15,52	182,88	91.18	c	5,22	10,44	7.40	a	0	14	4.26	c
EH-1989	23,09	233,61	69.60	b	4,48	10,89	8.48	b	0	8	3.29	b
EH-2082	34,04	357,39	124.70	d	6,44	14,08	9.01	c	0	12	3.70	b
EH-2102	7,39	176,78	78.39	c	5,37	9,91	7.40	a	0	11	4.06	c
EH-2107	10,9	386,05	147.29	e	5,46	12,17	8.29	b	0	24	6.04	d
EH-2124	25,55	150,05	69.01	b	4,98	11,1	7.52	a	0	6	1.42	a

Médias seguidas de mesma letra minúscula (na coluna) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

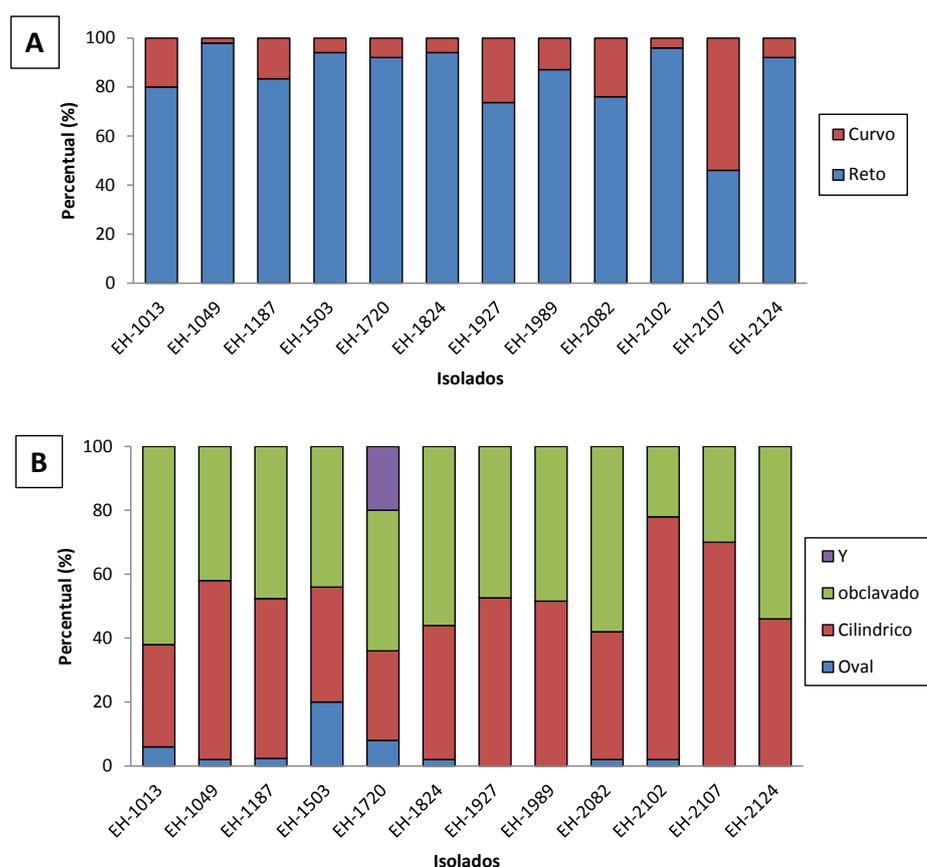


Figura 8. Distribuição em percentual (%) da curvatura (A) e forma (B) dos conídios dos isolados de *Corynespora cassiicola* com 5 dias de incubação.

Teste de patogenicidade

No teste de patogenicidade das 23 espécies de plantas avaliadas, apenas a abobrinha, as alfaces ‘Vanda’ e ‘Raider’, o jiló, o maxixe, o pimentão, o quiabo e a salsa não apresentaram suscetibilidade aos isolados de *C. cassiicola*. Os três isolados de *C. cassiicola* avaliados confirmaram patogenicidade as suas hospedeiras de origem, sendo o isolado EH-1049 patogênico aos tomates ‘Dominador’ e ‘Tospodoro’, o isolado EH-2102 patogênico aos pepinos ‘Taisho’ e ‘Tsuyataro’ e o isolado EH-2107 patogênico à trapoeraba (Tabela 4). Os resultados mostram que as espécies de planta apresentaram comportamento diferente quanto à suscetibilidade aos isolados avaliados. A abóbora, a couve e o tomate ‘Tospodoro’ foram suscetíveis aos isolados EH-1049 e EH-2107, porém não suscetíveis ao isolado EH-2102. A berinjela e o pepino ‘Taisho’ foram suscetíveis apenas ao isolado EH-2102. O melão e o repolho foram suscetíveis apenas ao isolado EH-2107. O tomate ‘Dominador’ foi suscetível aos isolados EH-1049 e EH-2102, já a planta de trapoeraba aos isolados EH-2102 e EH-2107 (Tabela 4).

Shimomoto *et al.* (2011) encontraram especificidade de isolados de *C. cassiicola* quanto à hospedeira de origem em teste de patogenicidade realizado. Dos 64 isolados de *C. cassiicola* de diferentes hospedeiras, apenas um isolado de pepino foi patogênico a todas as espécies de plantas utilizadas, os outros isolados de pepino foram patogênicos somente a plantas de pepino, bem como isolados provenientes da cultura do tomate e de perilla foram patogênicos somente a plantas de tomate e perilla, respectivamente.

Quanto à incidência das doenças os isolados apresentaram diferença significativa entre si e entre as hospedeiras avaliadas (Tabela 4). O isolado EH-1049 foi mais agressivo ao feijão-caupi, ao feijão-de-vagem e a rúcula, com média de incidência da doença de 100%. O isolado EH-2102 foi mais agressivo ao feijão-caupi, a rúcula e ao pepino ‘Tsuyataro’, com média de incidência da doença de 77,78% para o feijão-caupi e de 100% pra rúcula e pepino

‘Tsuyataro’. Já o isolado EH-2107 foi mais agressivo à abóbora, ao feijão-caupi, ao feijão-de-vagem, à rúcula, à soja e à trapoeraba, com média de incidência da doença de 77,78% para a abóbora e a soja e de 100% para ao feijão-caupi, ao feijão-de-vagem, a rúcula, e a trapoeraba (Tabela 4). O pepino ‘Tsuyataro’, o tomate ‘Tosporo’ e a trapoeraba apresentaram diferença significativa para os três isolados avaliados, sendo mais suscetíveis aos isolados EH-2102, EH-1049 e EH-2107, respectivamente (Tabela 4). Dixon *et al.* (2009), em teste de patogenicidade com 50 isolados de *C. cassicola* provenientes de diferentes hospedeiras, avaliaram a incidência da doença em oito diferentes espécies de plantas, entre elas o tomate e o pepino. O tomate e o pepino foram suscetíveis a todos os isolados testados com alta incidência da doença. De maneira similar ao encontrado no presente estudo, as demais hospedeiras apresentaram comportamento diferente quanto aos isolados avaliados por Dixon *et al.* (2009). Algumas espécies de plantas apresentaram baixa incidência da doença para alguns isolados e outras espécies não apresentaram sintomas.

A Figura 9 apresenta os resultados dos dois experimentos realizados em diferentes épocas para o teste de patogenicidade. Os resultados mostram que 14 das 23 espécies de plantas avaliadas nos dois experimentos comportaram-se de maneira semelhante quanto à suscetibilidade a *C. cassicola*, porém, algumas plantas apresentaram comportamentos diferentes nos dois experimentos. A abóbora, a berinjela, o repolho e a rúcula foram suscetíveis aos isolados de *C. cassicola* somente no primeiro experimento. Situação contrária foi observada para a abobrinha e o quiabo que foram suscetíveis aos isolados de *C. cassicola* somente no segundo experimento (Figura 9).

Qi *et al.* (2011), em teste de patogenicidade com 17 isolados de *C. cassicola* provenientes da cultura da seringueira, encontraram especificidade de alguns isolados a determinado clone de seringueira. Os clones também apresentaram comportamento diferente quanto aos isolados avaliados, sendo suscetíveis a alguns isolados e resistentes a outros.

Cutrim & Silva (2003), em teste de patogenicidade utilizando diferentes espécies de plantas a dois isolados de *C. cassiicola* provenientes da cultura do tomate, encontraram em seus resultados, suscetibilidade da abóbora, feijão-caupi, maxixe, pimentão, quiabo e vinagreira aos isolados avaliados.

Os resultados obtidos neste ensaio evidenciam a grande diversidade de hospedeiras apresentada pelos isolados de *C. cassiicola*. De todas as espécies de plantas consideradas suscetíveis aos isolados de *C. cassiicola* avaliados, exceto a rúcula, a couve e o repolho não são consideradas hospedeiras de *C. cassiicola*. Até o presente momento, não existem registros no “Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory” ou em outra literatura, de relatos de isolados de *C. cassiicola* patogênicos à cultura da rúcula, couve e repolho no mundo. A cultura da berinjela, feijão-de-vagem, *catharanthus roseus*, melão-de-são-caetano e zínia, apesar de já existirem relatos de doença causada *C. cassiicola* em outros países, no Brasil até o momento não existem relatos.

Tabela 4. Patogenicidade de três isolados de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas de importância econômica.

Hospedeira	Nome científico	EH-1049	EH-2102	EH-2107
Abóbora	<i>Cucurbita moschata</i> D.	22,22 Ba ¹	0,00 Aa ¹	77,78 Db ¹
Abobrinha	<i>Cucurbita pepo</i> L.	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Alface Crespa Vanda	<i>Lactuca sativa</i> L.	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Alface Raider	<i>Lactuca sativa</i> L.	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Berinjela	<i>Solanum melongena</i> L.	0,00 Aa	22,22 Aa	0,00 Aa
Couve	<i>Brassica oleracea</i> L.	66,67 Cc	0,00 Aa	33,33 Bb
Feijão-caupi	<i>Vigna unguiculata</i> L.	88,89 Da	77,78 Ca	100,00 Da
Feijão-de-vagem	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	100,00 Db	66,67 Ba	100,00 Db
Jiló	<i>Solanum gilo</i> Raddi	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Maxixe	<i>Cucumis anguria</i> L.	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Melão	<i>Cucumis melo</i> L.	0,00 Aa	0,00 Aa	55,56 Cb
Pepino Taisho	<i>Cucumis sativus</i> L.	0,00 Aa	55,56 Bb	0,00 Aa
Pepino Tsuyataro	<i>Cucumis sativus</i> L.	22,22 Ba	100,00 Cc	55,55 Cb
Pimentão	<i>Capsicum annuum</i> L.	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Quiabo	<i>Abelmoschus esculentus</i> L.	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Repolho	<i>Brassica ol. var. Capitata</i> L.	0,00 Aa	0,00 Aa	44,44 Cb
Rúcula	<i>Eruca sativa</i> Mill.	100,00 Da	100,00 Ca	100,00 Da
Salsa	<i>Petroselinum crispum</i> Mill.	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Soja	<i>Glycine max</i> L.	33,33 Ba	66,67 Bb	77,78 Db
Tomate Dominador F1	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	66,67 Cb	55,56 Bb	0,00 Aa
Tomate Tospodoro	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	44,45 Cb	0,00 Aa	55,55 Cb
Trapoeraba	<i>Commelina benghalensis</i> L.	0,00 Aa	44,45 Bb	100,00 Dc
Vinagreira	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	33,33 Ba	22,22 Aa	33,33 Ba

¹Incidência da doença (I) seguida pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

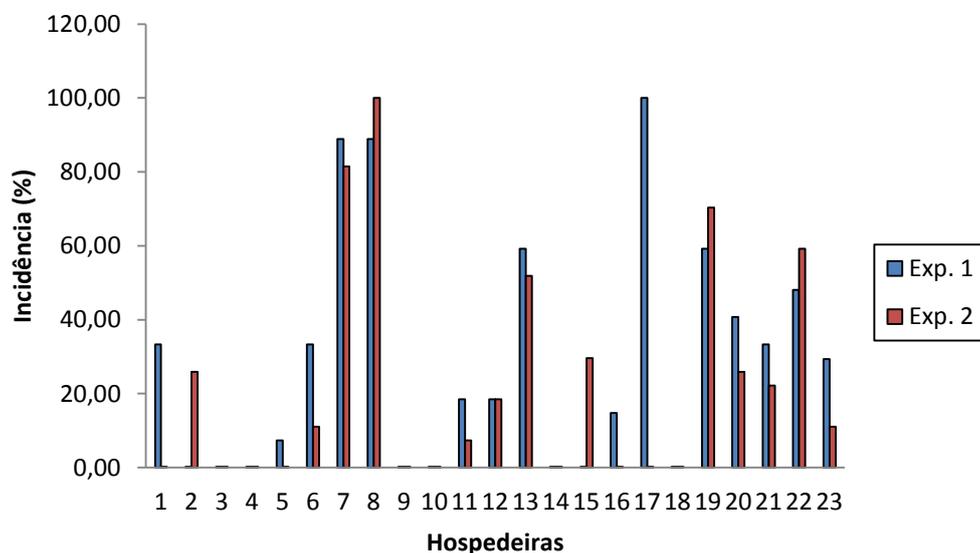


Figura 9. Estabilidade patogênica de três isolados de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas de importância econômica em dois experimentos: Abóbora (1), Abobrinha (2), Alface Crespa Vanda (3), Alface Raider (4), Berinjela (5), Couve (6), Feijão-caupi (7), Feijão-de-vagem (8), Jiló (9), Maxixe (10), Melão (11), Pepino Taisho (12), Pepino Tsuyataro (13), Pimentão (14), Quiabo (15), Repolho (16), Rúcula (17), Salsa (18), Soja (19), Tomate Dominador F1 (20), Tomate Tospodoro (21), Trapoeraba (22), Vinagreira (23).

Referências

ALVES, M.L.B; LOURD, M. & NODA, H. 1985. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* em caráter epidêmico em tomates de Manaus. Fitopatologia Brasileira 10:229.

BAKHSI, M.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A.; GROENEWALD, J.Z.; BRAUN, U. & CROUS, P.W. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. Persoonia, v. 34, p. 65-86, 2015.

BLAZQUEZ, C.H. 1972. Target spot of tomato. *Plant Disease Report*. 56:243-245.

BOITEUX L.S.; FONSECA M.E.N. & SIMON P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of American Society for Horticultural Science, Alexandria*, 124: 32-38.

BOOSALIS, M.G. & HAMILTON, R.I. 1957. Root and stem rot of soybean caused by *Corynespora cassiicola*. *Plant Dis. Rep.* 41:696-698.

CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R. & WEIR BS. 2012 - *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181–213.

CARBONE, I. & KOHN L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91, 553-6.

CARRIS, L.M. & GLAWE, D.A. 1986. Isolation of the soybean pathogens *Corynespora cassiicola* and *Phialophora gregata* from cysts of *Heterodera glycines* in Illinois. *Mycologia* 78:503-506.

CASTELLANI, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.24, p.270-276.

CHASE, A. R. 1993. *Corynespora* leaf spot and stem rot of Salvias. CFREC-Apopka Res. Rep. RH-93-12.

CHEE KH, 1990. Rubber diseases and their control. *Review of Plant Pathology* 69 7:423-430.

CHOMCHEON, P.; WIY AKRUTT A.S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; KENGTONG, S.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S. & KITTA KOOP, P. 2009. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. *Phytochemistry*, v.70, p.407-413.

CROUCH, J.A.; CLARKE, B.B. & HILLMAN, B.I. 2009. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored, graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia*, New York, v. 101, p. 648-656.

DEIGHTON, F.C. 1936. Preliminary list of fungi and diseases of plants in Sierra Leone. *Kew Bulletin*. p.397-424.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J. & HICKS, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21.

DÉON, M.; FUMANAL, B.; GIMENEZ, S.; BIEYSSE, D.; OLIVEIRA, R.R.; SHUIB, S.S.; BRETON, F.; ELUMALAI, S.; VIDA, J.B.; SEGUIN, M.; LEROY, T.; ROECKEL DREVET, P. & PUJADE RENAUD, V. 2014. Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. *Fungal Biology*, 118(1):32-47.

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

ELLIS, M.B. & HOLLIDAY, P. 1971. *Corynespora cassiicola*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* 303:1-2.

FAJOLA, A.O. & ALASOADURA, S.O. 1973. *Corynespora* leaf spot, a new disease of tobacco (*Nicotiana tabacum*). Plant Disease Reporter 57, 375-378.

FARR, D.F. & ROSSMAN, A.Y. 2015. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em < http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Corynespora%20cassiiicola&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes >. Acesso em: 30 de abril de 2015.

FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042.

GROENEWALD, J.Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J.; SHIN, H.D.; PARK, J.H.; JAMA, A.N.; GROENEWALD, M.; BRAUN, U. & CROUS, P.W. 2013. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. Studies in Mycology 75: 115–170.

ISMAIL, H. & JEYANAYAGI, I. 1999. Occurrence and identification of physiological races of *Corynespora cassiicola* of Hevea. In ‘Proceedings of the IRRDB symposium 1999’. (Eds QB Chen, JN Zhou) p. 263-272.

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

LAMOTTE, F. 2007. Purification and characterization of cassicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the fall disease of rubber tree. J. Chromatogr. B, 849(1-2), 357-362.

KAJIWARA, T.H.; SOLDERA, M.C.A.; URQUIZA, G.P.C.; VIEIRA, N.D. & ALMEIDA, A. M. R. Diversidade genética de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei, por RAPD e PCR-RFLP. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 4., 2009, Londrina. Resumos. Embrapa Soja, 2009. p.103-106.

KINGSLAND, G.; SITTERLY, R. 1986. Studies on fungicides for control of *Corynespora cassiicola* leaf spot of tomatoes in the Republic of Seychelles. Microbiology Abstract Section C. n.15. p.94. (Abstract).

KODSUEB, R.; MCKENZIE, E.H.C.; LUMYONG, S. & HYDE, K.D. 2008. Diversity of saprobic fungi on *Magnoliaceae*. Fungal Diversity 30: 37-53.

LEE, S.; MELNIK, V.; TAYLOR, J.E. & CROUS, P.W. 2004. Diversity of saprobic hyphomycetes on Proteaceae and Restionaceae from South Africa. Fungal Divers. 17:91-114.

LOPES, C.A.; REIS, A. & BOITEUX, L.S. Doenças fúngicas. In: Lopes, C.A.; Ávila, A.C. (Org.). Doenças do tomateiro. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2005. p.17-51.

MENEZES, M. & SILVA-HANLIN, D.M.W. 1997. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Imprensa Universitária. UFRPE. Recife.

MIN, X.J. & HICKEY, D.A. 2007. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. Molecular Ecology Notes 7: 365-373.

MOHANTY, N.N. & MOHANTY, N.W. 1955. Target leaf spot of tomatoes. Sci. and Culture Calcutta. 21: 330-332.

- NGHIA, N.A.; KADIR, J.; SUNDERASAN, E.; ABDULLAH, M.P.; MALIK, A. & NAPIS, S. 2008. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. *Mycopathologia*, 166, 189-201.
- OLIVEIRA, R. R.; AGUIAR, B.M.; TESSMANN, D.J.; PUJADE-RENAUD, V. & VIDA, J. 2012. Chlamydospore formation by *Corynespora cassiicola*. *Tropical Plant Pathology*. Brasília. vol.37. n.6.
- OLIVEIRA, R.R.; VIDA, J.B.; TESSMANN, D.J.; AGUIAR, B.M.; CAIXETA, M.P. & BARBOZA, A. L. 2007. Patogenicidade de isolados de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 297-299.
- ONESIROSAN, P.T.; ARNY, D.C. & DURBIN, R. D. 1974. Host specificity of Nigerian and north American isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, n. 64, p. 1364-1367.
- PEREIRA, J.M.; BARRETO, R.W.; ELLISON, C.A. & MAFFIA, L.A. 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *Lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control*, v.26, p.21-31.
- QI, Y.X.; ZHANG, X.; PU, J.J.; LIU, X.M.; LU, Y.; ZHANG, H. Q. & XIE, Y. X. 2011. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. *European Journal of Plant Pathology*. 130:83–95.
- RAFFEL, S.J.; KAZMAR, E.R.; WINBERG, R.; OPLINGER, E.S.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. & GRAU, C. R. 1999. First report of root rot of soybeans caused by *Corynespora cassiicola* in Wisconsin. *Plant Disease*. 83:696.

- REIS, B.P.; LANNA FILHO R.; ALFENAS R.F. & ALFENAS A.C. 2014. First report of *Corynespora cassiicola* causing severe leaf blight on Eucalyptus in Brazil. *New Disease Reports* 29.
- ROMRUENSUKHAROM, P.; TRAGOONRUNG, S.; VANAVICHIT, A. & TOOJINDA, T. 2005. Genetic variability of *Corynespora cassiicola* population in Thailand. *J Rubber Res.* 8:38–49.
- RONQUIST, F & HUELSENBECK, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- SEAMAN, W.L.; SHOEMAKER, R.A. 1964. Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* on soybean. *Canadian Journal of Botany*, v. 43, p. 1461-1469.
- SHIMOMOTO, Y.; SATO, T.; HOJO, H.; MORITA, Y.; TAKEUCHI, S.; MIZUMOTO, H.; KIBA, A. & HIKICHI, Y. 2011. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. *Plant Pathology* 60:253-260.
- SILVA, W.P.K.; DEVERALL B.J. & LYON B.R. 1998. Molecular, physiological and pathogenic characterization of *Corynespora cassiicola* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathology* 47:267-277.
- SMITH, L.J. 2008. Host range, phylogenetic and pathogenic diversity of *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. Ph.D. dissertation, University of Florida, Gainesville.
- SOUSA, F.M.G. & BENTES, J. L.S. 2014 .Variabilidade de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei procedentes do Amazonas, em meios de cultura. *Summa phytopathol., Botucatu* , v. 40, p. 84-87.

SOUZA, A. F.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; MENDES, C.; FREITAS, R.L.; ZAMBOLIM, E.M.; JESUS JUNIOR, W.C. & PEREIRA, O.L. 2009. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and berry spots on *Coffea canephora* in Brazil. Australasian Plant Diseases Notes, Collingwood, v.4, n.1, p.72-74.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J. & OLIVEIRA, H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. Phytopathology 92: 986-996.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A. & KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

VALLAD, G.E. & BURLACU, V. 2011. Initial Characterization of *Corynespora cassiicola* and *Alternaria* spp. affecting Florida Tomatoes: Fungicide resistance, pathogen Variability, and Host resistance. Disponível em <http://swfrec.ifas.ufl.edu/docs/pdf/veg-hort/tomato-institute/proceedings/ti11_proceedings.pdf>. Acesso em: 21 de Janeiro de 2015.

VERZIGNASSI, J.R.; VIDA, J.B. & TESSMANN, D.J. 2003. *Corynespora cassiicola* causando epidemias de manchas foliares em pepino ‘japonês’ sob estufa no norte do Paraná. Fitopatologia Brasileira 28: 570.

WALKER, D.M.; CASTLEBURY, L.A.; ROSSMAN, A.Y. & WHITE, J.F. 2012. New molecular markers for fungal phylogenetics: Two genes for species-level systematics in the Sordariomycetes (Ascomycota). Molecular Phylogenetics and Evolution 64: 500–512.

WEI, C.T. 1950. "Notes on *Corynespora*." Mycological Papers, No. 34. Commonwealth Mycol. Inst. Kew. p.10.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315-322.

WOUDENBERG, J.H.C.; TRUTER, M.; GROENEWALD, J.Z. & CROUS, P.W. (2014). Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. *Studies in Mycology*, 79, 1–47.

YAMADA, H.; TAKAHASHI, N.; HORI, N.; ASANO, Y.; MOCHIZUKI, K.; OHKUSU, K. & NISHIMURA, K. 2013. Rare case of fungal keratitis caused by *Corynespora cassiicola*. *Journal of Infection and Chemotherapy* 19(6): p.1167-1169.

CAPÍTULO 3

Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Corynespora cassicola*, provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas, a fungicidas

Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Corynespora cassiicola*, provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas, a fungicidas

Resumo

Por não existirem produtos registrados para o controle químico de *C. cassiicola* na cultura do tomate e do pepino no Brasil, este vem sendo realizado utilizando-se principalmente fungicidas recomendados para o controle da pinta-preta no tomateiro e da mancha-alvo na soja. Este é um procedimento ilegal e inadequado que pode levar à diminuição da sensibilidade e a resistência a determinados produtos. Devido a estes fatores, o presente trabalho teve como objetivo realizar testes *in vitro* da sensibilidade micelial de isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil a diferentes fungicidas. Em ensaio preliminar, utilizando-se alguns isolados de *C. cassiicola*, foi realizada a obtenção da dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial de *C. cassiicola* em 50% (DE50). Os resultados mostraram que os fungicidas clorotalonil e carbendazim apresentaram altos valores da DE50 para a maioria dos isolados avaliados, com média superior a 50 mg.L⁻¹. Para o fungicida tebuconazole os valores da DE50 variaram de 0,50 a 18,79 mg.L⁻¹. Os fungicidas pyrimethanil, fludioxonil e cyprodinil apresentaram menores valores da DE50, quando comparados aos fungicidas anteriores. Para estes fungicidas a DE50 obtida foi de 1 mg.L⁻¹ para o fludioxonil, 3 mg.L⁻¹ para cyprodinil, 5 mg.L⁻¹ para boscalid e fluopyram, 10 mg.L⁻¹ para tebuconazole, azoxystrobin e pyrimethanil e 50 mg.L⁻¹ para clorotalonil e carbendazim. No teste de inibição do crescimento micelial (ICM) de 55 isolados de *C. cassiicola*, os resultados mostraram uma variação entre os fungicidas e os isolados avaliados. O fungicida fludioxonil na concentração de 1 mg.L⁻¹ apresentou maior valor de ICM quando comparado aos demais fungicidas avaliados, com valor médio de 85,69%. Já o fungicida clorotalonil apresentou menor valor de ICM com média de 31,56%. Quanto aos isolados avaliados, o EH-1710 apresentou maior valor de ICM de 74,14% e o isolado EH-2125 apresentou o menor valor de ICM, com média de 34,57%. Os resultados obtidos evidenciam um grande potencial de uso do fungicida fludioxonil no controle de mancha-alvo.

Palavras-chave: mancha-alvo, fungicidas, controle químico.

***In vitro* sensitivity *Corynespora cassiicola* isolates from different hosts and geographic regions, to fungicides**

Abstract

Once there is no chemical product registered to control *Corynespora cassiicola* on tomato and cucumber in Brazil, the control has been made by the use of fungicides registered for early blight of tomato and target spot of soybean. This an illegal and inappropriate procedure that may lead to a decrease of sensitivity and resistant of some product.. Because these factors, this work aimed to test the *in vitro* mycelial sensitivity of *C. cassiicola* isolates from different host and different geographic regions of Brazil to different fungicides. In a preliminary test, using some *C. cassiicola* isolates, it was obtained the effective dose able to decrease micelial growth of *C. cassiicola* in 50% (ED50). As a result the fungicides chlorotalonil and carbendazim showed great ED50 values to most isolates tested, with average upper 50 mg.L⁻¹. For the tebuconazole fungicide the values of ED50 varied from 0,50 to 18,79 mg.L⁻¹. The ED50 of fungicides pyrimethanil, fludioxonil and cyprodini, was lower when compared the former fungicides. These fungicide ED50 were 1 mg.L⁻¹ to fludioxonil fungicide, 3 mg.L⁻¹ to cyprodinil, mg.L⁻¹ to boscalid and Fluopyram, 10 mg.L⁻¹ to tebuconazole, azoxystrobin and pyrimethanil and 50 mg.L⁻¹ to chlorothalonil and carbendazim. In the mycelial growth inhibition test (ICM) there was a greate variation among fungicides and the 55 *C. cassiicola* isolates tested. The fludioxonil fungicide at a concentration of 1 mg.L⁻¹ showed higher ICM when compared to fungicides tested, with average of 85.69%. Chlorothalonil fungicide showed the lowest ICM values with average of 31.56%. As to the isolates tested, the EH-1710 showed higher ICM of 74.14% and the isolate EH-2125 showed the lowest value of ICM between the isolates tested, with average of 34.57%. The results show a great expectation of good effects of fludioxonil fungicide on target spot control.

Key-words: target spot, fungicides, chemical control.

Introdução

A mancha-alvo ou mancha de corinéspora, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei, vem sendo nos últimos anos um grande desafio para diversas espécies de plantas de interesse econômico, tais como o tomateiro e o pepineiro (Mendonça *et al.*, 2012). Essa doença se torna mais problemática em regiões com temperaturas variando de 20°C a 32°C, umidade relativa do ar em torno de 80% e molhamento foliar com duração de 16-44 horas (Muliterno de Melo, 2009; Mesquini, 2012; Mendonça *et al.*, 2012).

No Brasil, o primeiro relato da mancha-alvo na cultura do tomateiro foi realizado em 1985 por Alves *et al.*, na cidade de Manaus no estado do Amazonas. Atualmente esta doença se encontra distribuída em varias regiões produtoras do país. Na cultura do pepino, a doença foi relatada inicialmente por Verzignassi *et al.* (2003) no estado do Paraná. O patógeno pode sobreviver em restos de cultura por até dois anos, em sementes contaminadas e infectando diversas plantas hospedeiras. Sua disseminação é realizada principalmente pelas sementes a longa distância e a curta distância pelo vento e pela água da chuva ou irrigação (Reis & Boiteux, 2007).

A principal característica da doença é a presença de manchas foliares que vão se multiplicando e aumentando de tamanho, reduzindo a área foliar da planta, com conseqüente queda na produção (Cardoso & Normando, 1991). Inicialmente, seus sintomas podem ser confundidos com os da pinta-preta, causada pelo fungo *Alternaria solani*, ou a mancha e pinta-bacterianas, causadas pelas bactérias *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, respectivamente (Vallad & Burlacu, 2011).

Os sintomas da mancha-alvo no tomateiro têm início com o aparecimento de manchas pequenas e aquosas na superfície da folha que, posteriormente, aumentam de tamanho e se tornam circulares e de coloração marrom clara, causando uma desfolha generalizada com o avanço da doença. Os sintomas nos frutos vão desde pequenas pontuações circulares marrom-

escuras a grandes lesões circulares marrons com coloração cinza escuro ao preto no centro, que, posteriormente, se racham tornando os frutos inadequados ao mercado consumidor (Volin *et al.*, 1989; Vallad & Burlacu, 2011).

Na cultura do pepino, os sintomas da mancha-alvo iniciam-se na forma de pequenas manchas angulares, de coloração clara, que evoluem para manchas circulares, com o centro de cor palha e pequeno halo amarelo claro. Com o progresso da doença, as manchas crescem, tomando formato arredondado e apresentando centro marrom claro e bordos encharcados de coloração olivácea. Ainda não foram observados sintomas da doença em caule, frutos e raízes (Teramoto *et al.*, 2011).

O controle da mancha-alvo baseia-se principalmente no plantio de sementes de boa qualidade, tratamento de sementes, destruição de restos de plantas após a colheita, rotação de culturas com gramíneas não hospedeiras e pulverizações com fungicidas. (Lopes *et al.*, 2005). Outra prática bastante utilizada no controle da mancha-alvo é o uso de cultivares resistentes, porém ainda não existem relatos de cultivares comerciais de tomate resistentes a essa doença no Brasil. Embora fontes de resistência já terem sido identificadas em alguns países (Vallad & Burlacu, 2011), no Brasil, o único relato de cultivar resistente à mancha-alvo foi na cultura do pepino com o híbrido “Taisho” (Sakata, 2015).

Devido a vários fatores, entre eles a falta de cultivares resistentes, o controle da mancha-alvo em outros países concentra-se no uso de aplicações periódicas de fungicidas (Schlub *et al.*, 2009). Entretanto, no Brasil ainda não existem produtos registrados para o controle químico de *C. cassiicola* na cultura do tomate e do pepino, apesar de já existir registro de 16 fungicidas para o controle deste fungo na cultura da soja (Mesquini, 2012, AGROFIT, 2015). Portanto, no Brasil o controle químico dessa doença vem sendo realizado utilizando-se principalmente fungicidas recomendados para o controle da pinta-preta no tomateiro e da mancha-alvo na soja.

A utilização de fungicidas recomendados para o controle de outro patógeno ou em outra cultura pode se basear em dosagem inadequada ao patógeno de interesse. A utilização incorreta da dose recomendada é um dos fatores que podem acarretar o surgimento de problemas futuros como: variação na sensibilidade ao produto, surgimento de estirpes do patógeno resistentes e conseqüentemente baixa eficiência no controle químico (Ghini & Kimati, 2000; FRAC, 2015). Fungos fitopatogênicos, antes sensíveis a um determinado fungicida, podem apresentar isolados com menor sensibilidade ao produto ou até mesmo tornar-se resistentes, se a aplicação for realizada de forma não recomendada. Isso pode ocorrer devido à mutação ou outro mecanismo de variabilidade do patógeno (Parreira *et al.*, 2009).

Resistência a fungicida é uma alteração estável e herdável de um patógeno a uma determinada dose de fungicida, resultando numa redução da sensibilidade ao produto. A resistência a fungicidas pode ser classificada como resistência qualitativa ou quantitativa e cruzada ou múltipla. A resistência qualitativa é governada por poucos ou apenas um gene dominante, sendo que para muitos fungicidas a mutação em um único gene é suficiente para o surgimento de estirpes resistentes. Já a resistência quantitativa é governada por vários genes com efeitos menores, apresentando relação com fungicidas de risco moderado. A resistência cruzada ocorre quando um patógeno torna-se resistente a dois ou mais fungicidas com o mesmo mecanismo de ação, conferida pelo mesmo fator genético. Já a resistência múltipla ocorre quando linhagens patogênicas que apresentam mecanismos de resistência separados para dois ou mais fungicidas não relacionados, tornam-se resistentes (Pereira, 2009; Reis *et al.*, 2010).

O desenvolvimento da resistência depende da frequência de isolados não sensíveis, do grau de resistência, da grandeza da diferença de sensibilidade dos isolados sensíveis e dos não

sensíveis, sendo este expresso pelo Fator de Resistência (Ghini & Kimati, 2000; Avozani, 2011).

No intuito de conhecer melhor o comportamento de isolados de *C. cassiicola* a diferentes grupos químicos, inúmeros trabalhos são realizados em todo o mundo. Teramoto *et al.* (2012), testando a sensibilidade de seis isolados de *C. cassiicola* de soja a sete fungicidas sistêmicos, observaram que, dos sete fungicidas testados, seis foram altamente a medianamente fungitóxicos para todos os isolados. Porém, o tiofanato-metílico do grupo químico dos benzimidazóis, não foi considerado fungitóxico aos isolados de *C. cassiicola* testados. Miyamoto *et al.* (2009), também em teste de sensibilidade ao fungicida boscalide, utilizando 438 isolados de *C. cassiicola*, encontraram resistência em 49% dos isolados testados, sendo que destes, 189 foram moderadamente resistentes e 25 altamente resistentes. Ishii *et al.* (2011), utilizando 28 isolados considerados resistentes ao boscalid em teste de sensibilidade com o fungicida fluopyram, concluíram que todos os isolados avaliados eram sensíveis.

Um dos pontos fundamentais para evitar o surgimento de patógenos resistentes a um determinado produto químico é a tomada de decisão de maneira correta de como será realizado o controle químico (Parreira *et al.*, 2009). Fazer rotação de princípios ativos ou evitar o uso de fungicidas com tendência à resistência dos isolados seria a principal estratégia a ser utilizada. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo realizar testes *in vitro* da sensibilidade micelial de isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil a diferentes fungicidas.

Material e Métodos

Todas as atividades relacionadas ao teste químico dos isolados de *C. cassiicola* foram conduzidas no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças (CNPq), em Brasília-DF

e no laboratório de Fitopatologia da University of Florida (Gulf Coast Research and Education Center), Wimauma, FL, USA.

Obtenção dos isolados de *Corynespora cassiicola*

Cinquenta e cinco isolados de *C. cassiicola*, pertencentes à micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, obtidos de diferentes hospedeiras em diversas regiões geográficas do Brasil foram analisados neste estudo (Tabela 1). Inicialmente os isolados, preservados em água (Castellani, 1939), foram recuperados em placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (Menezes & Silva-Hanlin, 1997).

Tabela 1. Origem geográfica e espécie hospedeira dos isolados utilizados no teste de sensibilidade a fungicidas.

Isolados	Ano de isolamento	Localização	Espécies Hospedeiras
EH - 1013 ^a	2004	Pará - PA	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1049	2004	Maranhão - MA	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1066	2004	Pará - PA	<i>Malpighia emarginata</i> D.C.
EH - 1068	2004	Pará - PA	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1069	2004	Pará - PA	<i>Lactuca sativa</i> L.
EH - 1070	2004	Pará - PA	<i>Cucumis melo</i> L.
EH - 1092	2005	Espírito Santo - ES	<i>Carica papaya</i> L.
EH - 1107	2005	Goiás - GO	<i>Zinnia elegans</i> JAC.
EH - 1187	2005	Paraná - PR	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1188	2005	Paraná - PR	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1453	2005	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1472	2005	Tocantins - TO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1503	2006	Goiás - GO	<i>Sesamum indicum</i> L.
EH - 1504	2006	Goiás - GO	<i>Sesamum indicum</i> L.
EH - 1656	2006	Goiás - GO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1657	2006	Goiás - GO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1665	2006	Minas Gerais - MG	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1666	2006	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1667	2006	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1699	2007	Amazonas - AM	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.
EH - 1708	2007	Rondônia - RO	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1709	2007	Tocantins - TO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1710	2007	Tocantins - TO	<i>Cucumis sativus</i> L.

EH - 1719	2007	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1720	2007	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1721	2007	Amazonas - AM	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1723	2007	Amazonas - AM	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1724	2007	Amazonas - AM	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1796	2009	Santa Catarina - SC	<i>Catharanthus roseus</i> L.
EH - 1816	2008	Rondônia - RO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1824	2009	Ceará - CE	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 1830	2009	Ceará - CE	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp
EH - 1927	2009	Espírito Santo - ES	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1928	2009	Espírito Santo - ES	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1979	2009	Goiás - GO	<i>Carica papaya</i> L.
EH - 1989	2010	Pernambuco - PE	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 1990	2010	Pernambuco - PE	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 2045	2011	Brasília - DF	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 2082	2011	Pernambuco - PE	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 2083	2011	Pernambuco - PE	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 2100	2012	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 2101	2012	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 2102	2012	São Paulo - SP	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 2105	2013	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 2106	2013	Amazonas - AM	<i>Cucumis sativus</i> L.
EH - 2107	2013	Pernambuco - PE	<i>Commelina benghalensis</i> L.
EH - 2108	2013	Pernambuco - PE	<i>Commelina benghalensis</i> L.
EH - 2109	2013	Goiás - GO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 2110	2013	Goiás - GO	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 2123	2014	Amazonas - AM	<i>Malpighia emarginata</i> D.C.
EH - 2124	2014	Paraná - PR	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.
EH - 2125	2014	Amazonas - AM	<i>Piper longum</i> Linn.
EH - 2126	2014	Maranhão - MA	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
EH - 2127	2014	Amazonas - AM	<i>Cucurbita pepo</i> L.
EH - 2128	2014	Amazonas - AM	<i>Cucurbita pepo</i> L.

^a Código referente a coleção de origem.

Determinação da sensibilidade micelial de *Corynespora cassiicola* a diferentes fungicidas

Para determinar a dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial de *C. cassiicola* em 50% (DE50), alguns isolados foram selecionados e avaliados em ensaios preliminares. No ensaio com os fungicidas tebuconazole, clorotalonil e carbendazim foram utilizados 30 isolados de *C. cassiicola* em cinco diferentes concentrações 0; 1; 10; 100 e 1000 ppm.

A DE50 dos fungicidas pyrimethanil, fludioxonil e cyprodinil foi determinada utilizando-se seis isolados de *C. cassiicola* representativos em ensaios anteriores, nas concentrações 0; 0,1; 1; 10 ppm. Já a DE50 dos fungicidas boscalid, azoxystrobin e fluopyram foi obtida de ensaios realizados por Vallad & Burlacu (2011).

O meio de cultura BDA utilizado nos ensaios foi preparado e separado em diferentes erlenmeyers (Menezes & Silva-Hanlin, 1997), após a autoclavagem, os meios foram resfriados à temperatura aproximada de 42°C com posterior adição dos fungicidas, de modo a obter as concentrações necessárias. Logo após a adição do fungicida, o meio foi homogeneizado com ajuda de um agitador magnético por 1 minuto e vertido em placas de petri (90 x 15 mm) esterilizadas.

Um dia após o preparo do meio de cultura com os fungicidas, discos de micélio dos isolados de *C. cassiicola*, obtidos de colônias com 7 dias de idade foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e fungicida. Em seguida, as placas foram vedadas e mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 8 horas. O delineamento experimental foi feito em blocos ao acaso com três repetições por tratamento e cada tratamento foi constituído por uma placa.

A avaliação foi realizada em um intervalo de três dias após a montagem do ensaio, até o preenchimento total da placa testemunha pelo fungo. Foi utilizada uma régua milimetrada para medir o diâmetro de cada colônia. O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) foi realizado por meio da fórmula $ICM = [(T - F)/T] \times 100$, onde T é o diâmetro da colônia da testemunha e F é o diâmetro da colônia do tratamento com o fungicida. Em seguida, foi estimada, por meio da utilização dos parâmetros calculados pela regressão do ICM versus o log₁₀ da concentração do fungicida, a dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial em 50% (DE50) para cada fungicida avaliado. As médias da DE50

obtidas nos ensaios para cada fungicida avaliado foram utilizadas em posterior ensaio de sensibilidade.

Efeito *in vitro* de diferentes fungicidas sobre o crescimento micelial de isolados de *Corynespora cassiicola* de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil

Neste ensaio foram utilizados 55 isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil e nove diferentes fungicidas. Quanto ao modo de ação, os fungicidas utilizados são classificados na FRAC (www.frac.info) como: Tebuconazole pertencente ao grupo G1: inibidores da Biossíntese de ergosterol; Clorotalonil ao grupo M5: múltipla ação; Carbendazin ao grupo B1: divisão celular e mitose; Pyrimethanil e Cyprodinil ao grupo D1: síntese de aminoácido e proteínas; Fludioxonil ao grupo E2: transdução do sinal osmótico; Boscalid e Fluopyram ao grupo C2: respiração (inibição do complexo II) e Azoxystrobin ao grupo C3: respiração (inibição do complexo III).

O preparo do meio de cultura BDA seguiu o mesmo protocolo utilizado no ensaio anterior. A concentração de cada fungicida a ser adicionada ao meio de cultura foi determinada pela média da DE50 obtida no ensaio de determinação da sensibilidade micelial de *C. cassiicola* a diferentes fungicidas. Logo após a adição do fungicida o meio de cultura foi homogeneizado por meio de um agitador magnético por 1 min e vertidos em placas de petri (90 x 15 mm) esterilizadas.

Para esse ensaio, discos de micélio dos isolados de *C. cassiicola*, obtidos de colônias com 7 dias de idade foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA com fungicida. Para o controle, discos de micélio do patógeno, foram transferidos para placa de Petri contendo somente meio de cultura BDA. Em seguida, as placas foram vedadas e mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 8 horas.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com três repetições por tratamento e cada tratamento foi constituído por uma placa com três isolados (Ishii *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2014). O ensaio foi repetido para garantir a fidelidade dos dados.

A avaliação foi realizada em um intervalo de três dias após a montagem do ensaio, até o preenchimento total da placa testemunha pelo fungo. Foi utilizada uma régua milimetrada para medir o diâmetro de cada colônia. O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) foi realizado por meio da fórmula $ICM = [(T - F)/T] \times 100$, onde T é o diâmetro da colônia da testemunha e F é o diâmetro da colônia do tratamento com o fungicida. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio do programa SISVAR (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

Determinação da sensibilidade micelial de *Corynespora cassiicola* a diferentes fungicidas

No ensaio com os fungicidas tebuconazole, clorotalonil e carbendazim, no qual foram utilizados 30 isolados de *C. cassiicola* em cinco diferentes concentrações 0; 1; 10; 100 e 1000 mg.L⁻¹, a dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial de *C. cassiicola* em 50% (DE50), apresentou maior variação para o fungicida tebuconazole, quando comparado aos fungicidas clorotalonil e carbendazim, sendo que essa variação também foi observada quanto aos isolados avaliados (Tabela 2).

Para o fungicida tebuconazole, os valores da DE50 variaram de 0,50 a 18,79 mg.L⁻¹. O isolado EH-1723, proveniente do estado do Amazonas, apresentou menor valor entre os isolados avaliados, com somente 0,50 mg.L⁻¹. Já o isolado EH-1724, também de tomate do estado do Amazonas, apresentou maior valor, sendo necessária uma dose de 18,79 mg.L⁻¹

para inibir em 50% o crescimento micelial. Estes resultados mostram uma variabilidade dos isolados provenientes da mesma hospedeira e da mesma região geográfica ao fungicida tebuconazole (Tabela 2). Este mesmo comportamento foi observado por Xavier *et al.* (2013) que avaliaram a sensibilidade de 24 isolados de *C. cassiicola* provenientes da cultura da soja ao fungicida carbendazim. Os isolados MES 926 e MES 930, ambos provenientes do estado do Paraná, apresentaram valores da DE50 diferentes, sendo estes de 1 mg.L⁻¹ e maior que 1000 mg.L⁻¹, respectivamente. Neste trabalho, a média da DE50 encontrada para este fungicida foi maior que 50 mg.L⁻¹.

Os isolados de *C. cassiicola* apresentaram comportamento semelhante quando observada a dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial em 50% para os fungicidas clorotalonil e carbendazim. A maioria dos isolados avaliados para os dois fungicidas apresentaram DE50 maior que 50 mg.L⁻¹. Para o fungicida clorotalonil, somente os isolados EH-1068 (7,39x10⁻³ mg.L⁻¹), EH-1719 (0,20 mg.L⁻¹), EH-2101 (0,50 mg.L⁻¹), EH-1816 (1,07x10⁻¹² mg.L⁻¹) apresentaram DE50 menor que 50 mg.L⁻¹. Quanto ao fungicida carbendazim, os isolados de *C. cassiicola* que apresentaram DE50 menor que 50 mg.L⁻¹ foram: EH-1049 (6,22x10⁻⁴ mg.L⁻¹), EH-2082 (3,64x10⁻¹⁷ mg.L⁻¹), EH-2083 (0,30 mg.L⁻¹), EH-1665 (2,5 mg.L⁻¹), EH-1920 (0,40 mg.L⁻¹) EH-1667 (8,99x10⁻¹⁷ mg.L⁻¹) (Tabela 2).

Tabela 2. Determinação da dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial de isolados de *Corynespora cassiicola* em 50% (DE50) aos fungicidas clorotalonil, tebuconazole e carbendazim.

Isolado	Estimativa da DE50		
	Clorotalonil	Tebuconazole	Carbendazim
EH-1453	> 50	7,70	> 50
EH-1724	> 50	18,79	> 50
EH-1989	> 50	4,23	> 50
EH-1722	> 50	1,61	> 50
EH-1454	> 50	4,40	> 50
EH-1013	> 50	3,10	> 50
EH-1708	> 50	8,44	> 50
EH-1824	> 50	7,30	> 50
EH-1187	> 50	7,99	> 50
EH-1723	> 50	0,50	> 50
EH-1928	> 50	2,34	> 50
EH-1068	$7,39 \times 10^{-3}$	14,67	> 50
EH-1719	0,20	3,38	> 50
EH-1049	> 50	1,86	$6,22 \times 10^{-4}$
EH-1721	> 50	1,56	> 50
EH-2082	> 50	2,90	$3,64 \times 10^{-17}$
EH-2100	> 50	2,50	> 50
EH-2102	> 50	1,81	> 50
EH-2083	> 50	11,75	0,03
EH-2101	0,50	9,08	> 50
EH-1990	> 50	2,95	> 50
EH-1479	> 50	6,92	> 50
EH-1665	> 50	9,84	24,94
EH-2045	> 50	11,89	> 50
EH-1709	> 50	0,68	> 50
EH-1720	> 50	4,40	0,04
EH-1816	$1,07 \times 10^{-12}$	6,80	> 50
EH-1472	> 50	4,80	> 50
EH-1927	> 50	3,94	> 50
EH-1667	> 50	6,75	$8,99 \times 10^{-17}$

¹ Valores da DE50 em mg.L⁻¹ .

Os fungicidas clorotalonil e carbendazim também apresentaram comportamento semelhante quando observada a frequência de isolados avaliados a diferentes níveis da DE50 (Figura 1). Dos isolados avaliados, cerca de 86,67% apresentaram DE50 maior que 50 mg.L⁻¹ e apenas 13,33% apresentaram DE50 variando entre 0,00 e 15 mg.L⁻¹ para o clorotalonil. Já para o carbendazim, 80% dos isolados apresentaram DE50 maior que 50 mg.L⁻¹, 16,67% com DE50 variando entre 0,00 e 15 mg.L⁻¹ e 3,33% apresentaram DE50 variando entre 15 e 30 mg.L⁻¹ (Figura 1). Quanto ao fungicida tebuconazole, aproximadamente 33,67% dos isolados avaliados apresentaram DE50 variando entre 0,00 e 3 mg.L⁻¹, 23% entre 6 e 9 mg.L⁻¹ e somente 3% dos isolados avaliados apresentaram DE50 variando entre 15 e 19 mg.L⁻¹ (Figura 1).

Esses resultados corroboram os de Teramoto *et al.* (2011) que, ao avaliar a inibição de isolados de *C. cassicola* a diferentes fungicidas, entre eles os fungicidas tebuconazole, clorotalonil e carbendazim, encontraram grande variação dos isolados aos fungicidas testados com valores da DE50 inferiores a 3,2 mg.L⁻¹ para o fungicida tebuconazole e valores maiores que 50 mg.L⁻¹ para os fungicidas clorotalonil e carbendazim. Os dois últimos resultados foram iguais aos encontrados no presente trabalho. Avozani (2011) também encontrou variação de quatro isolados de *C. cassicola* provenientes da soja ao fungicida carbendazim, sendo que a maioria dos isolados apresentaram DE50 maior que 40 mg.L⁻¹.

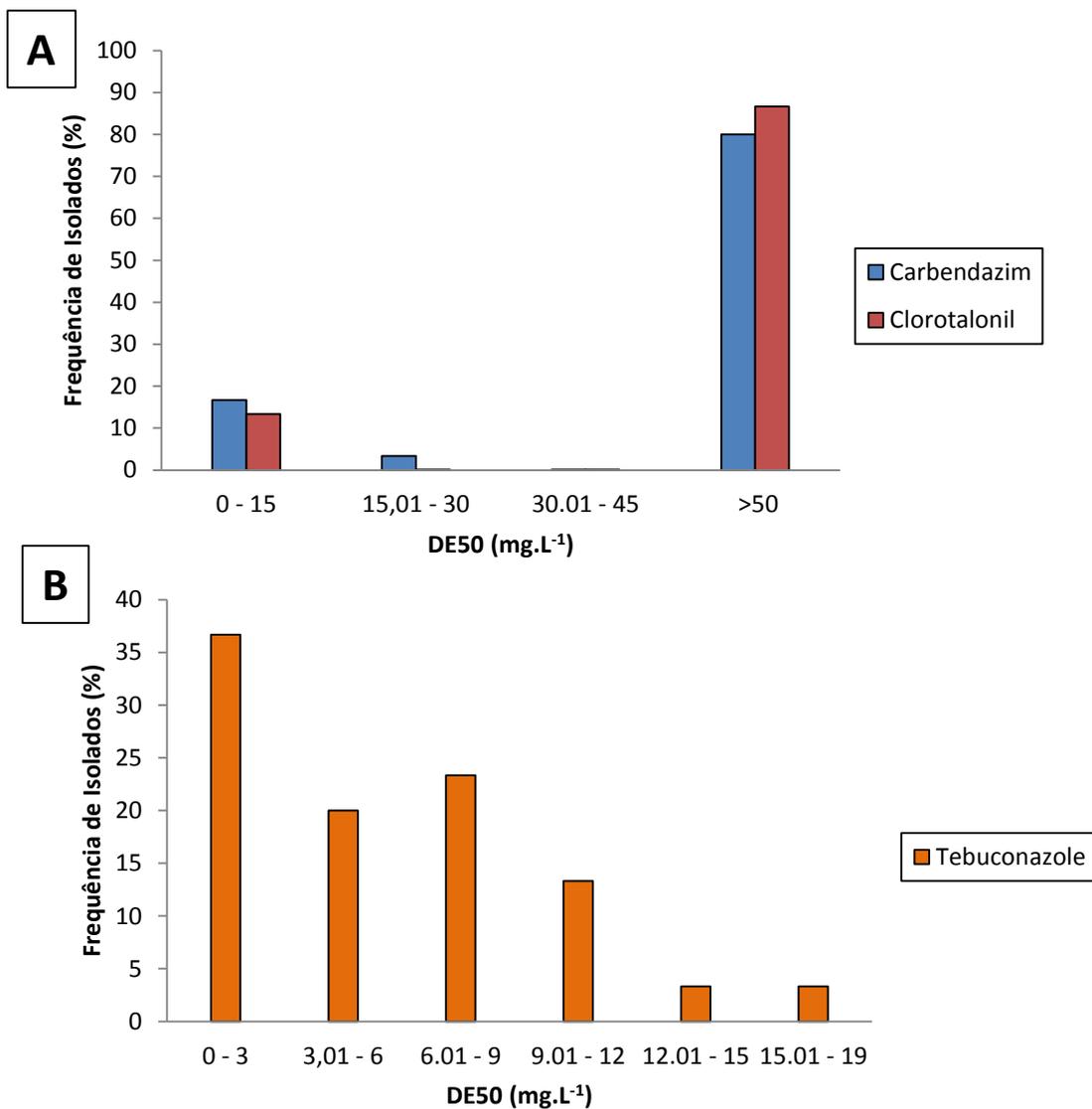


Figura 1. Distribuição de frequência de isolados em faixas de concentrações das doses efetivas de (A) carbendazim e clorotalonil e (B) tebuconazole para inibir em 50% (DE50) o crescimento micelial *in vitro* de isolados de *Corynespora cassiicola*.

Para os fungicidas pyrimethanil, fludioxonil e cyprodinil, as doses efetivas com capacidade de inibir o crescimento micelial de *C. cassiicola* em 50% foram menores quando comparadas aos fungicidas tebuconazole, clorotalonil e carbendazim. Os valores da DE50 encontrados para o fungicida pyrimethanil variaram de 0,6 a 27,23 mg.L⁻¹, sendo os isolados EH-1979 e EH-1107 com menor e maior valor da DE50, respectivamente. Os isolados EH-1979 e EH-2082 apresentaram menor e maior valor da DE50 para o fungicida cyprodinil,

variando de 0,16 a 5,41 mg.L⁻¹, respectivamente. O fungicida fludioxonil destaca-se entre os demais por apresentar baixos valores da DE50, todos menores que 0,20 mg.L⁻¹ (Tabela 3).

Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Li & Xiao (2008) em trabalho de sensibilidade de isolados de *Penicillium expansum* provenientes de maçã para os fungicidas pyrimethanil e fludioxonil. Os resultados mostram valores da DE50 menores que 0,03 mg.L⁻¹ para o fungicida fludioxonil e valores menores que 2,1 mg.L⁻¹ para o fungicida pyrimethanil. Clark *et al.* (2011), trabalhando com 40 isolados de *C. cassicola*, encontraram valores da DE50 menores que 0,50 mg.L⁻¹ para o fungicida fludioxonil.

Tabela 3. Determinação da dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial de isolados de *Corynespora cassicola* em 50% (DE50) aos fungicidas pyrimethanil, fludioxonil e cyprodinil.

Isolado	Estimativa da DE50 ¹		
	Pyrimethanil	Fludioxonil	Cyprodinil
EH-1070	2,8	0,07	2,92
EH-1107	21,38	0,05	2,60
EH-1657	4,30	0,11	1,77
EH-1979	0,60	0,20	0,16
EH-2082	27,23	0,08	5,41
EH-2110	2,35	0,02	0,88

¹ Valores da DE50 em mg.L⁻¹.

Com base nas médias da DE50 obtidas neste ensaio, foi realizada a determinação da dose efetiva capaz de inibir o crescimento micelial dos isolados de *C. cassicola* provenientes de diferentes culturas e regiões geográficas do Brasil em 50% para cada fungicida avaliado. A concentração de cada fungicida a ser adicionada ao meio de cultura foi de 1 mg.L⁻¹ para o fungicida fludioxonil, 3 mg.L⁻¹ para cyprodinil, 5 mg.L⁻¹ para boscalid e fluopyram, 10 mg.L⁻¹ para tebuconazole, azoxystrobin e pyrimethanil e 50 mg.L⁻¹ para clorotalonil e carbendazim.

Efeito *in vitro* de fungicidas sobre o crescimento micelial de isolados de *Corynespora cassicola* de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil

O teste de média realizado com os dados obtidos neste ensaio mostrou que a comparação feita entre isolados e fungicidas avaliados apresentou grande variação quanto à porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM). Os fungicidas azoxystrobin, clorotalonil, cyprodinil e tebuconazole apresentaram 5 grupos distintos com grande variação dos valores de ICM para os isolados avaliados. O fungicida tebuconazole apresentou a maior variação, com valores de ICM variando de 0 a 100%, já o fungicida azoxystrobin apresentou a menor variação com valores de ICM variando de 0 a 71,60%. Para este fungicida, quatro isolados apresentaram valor de ICM de 0%, considerados altamente resistentes (Tabela 4). Entretanto, o fungicida azoxystrobin pertence ao grupo C3 quanto ao seu modo de ação e fungicidas pertencentes a esse grupo baseiam-se na inibição da respiração mitocondrial, com interrupção da produção de ATP pelo patógeno. Alguns patógenos de plantas podem evitar os efeitos tóxicos desses fungicidas pela expressão de uma via alternativa da oxidase, para realizar a síntese de ATP. Contudo, essa via pode ser inibida pelo ácido salicylhydroxamic (SHAM), por este motivo, SHAM é geralmente adicionado aos fungicidas deste grupo quando testados *in vitro* (Hincapie, 2012).

No presente trabalho não foi adicionado o produto SHAM ao fungicida azoxystrobin. Em alguns casos a adição de SHAM ao azoxystrobin permite a inibição do patógeno, enquanto que sem a adição de SHAM não houve este efeito. Porém, com o passar do tempo, a adição de SHAM ao fungicida azoxystrobin em testes *in vitro* com alguns patógenos mostrou um efeito sinérgico na inibição do micélio, apresentando em vários trabalhos resultados não significativos com e sem a adição de SHAM, concluindo-se que a via alternativa não tem um

papel importante para os fungos avaliados (Avila-Adame *et al.*, 2003; Mondal *et al.*, 2005; Kanetis *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2012; Hincapie, 2012).

Fernando *et al.* (2010), avaliando a sensibilidade de isolados de *C. cassiicola* obtidos de seringueira, encontraram porcentagens de inibição do crescimento micelial variando de 87,27 a 100% para o fungicida tebuconazole e de 100% para o fungicida carbendazim.

Os fungicidas boscalid, carbendazim e fluopyram apresentaram seis grupos distintos quanto aos valores de ICM (Tabela 4). Para os fungicidas boscalid e fluopyram, os valores de ICM variaram de 6,50 a 85% e 0 a 81,99%, respectivamente. O fungicida carbendazim apresentou valores de ICM variando de 0 a 100%, sendo que, do total de isolados avaliados, seis apresentaram valores de ICM de 0% e 18 isolados apresentaram valores de ICM de 100%. Os resultados mostram uma grande variação entre os isolados, com alguns se apresentando altamente sensíveis e outros altamente resistentes ao fungicida carbendazim (Tabela 4). Esta variação do fungicida carbendazim é relatada por Brent & Hollomon (1995), como sendo uma “resistência cruzada negativa”, o inverso da resistência cruzada. Este fenômeno ocorre em combinações do fungicida carbendazim com outros fungicidas. Estirpes resistentes a um determinado fungicida conferem automaticamente uma mudança de sensibilidade para o carbendazim, por mutações independentes que são selecionadas por exposição a cada um dos fungicidas.

A variação de isolados a este fungicida também foi encontrada por Teramoto *et al.* (2012) em teste de sensibilidade com seis isolados de *C. cassiicola*. Três isolados apresentaram baixa inibição do crescimento micelial e outros três apresentaram ICM acima de 50%. Neste trabalho, os fungicidas boscalid e fluopyram apresentaram altos valores da inibição do crescimento micelial dos isolados avaliados.

O fungicida pyrimethanil apresentou no teste de média maior variação entre os fungicidas testados com sete grupos distintos, com valores de ICM variando de 4,09 a 100%.

Já o fungicida fludioxonil apresentou menor variação com apenas dois grupos distintos e também os maiores valores de ICM entre os isolados avaliados. Para este fungicida, os valores de ICM variaram de 65,81 a 100% (Tabela 4). Os resultados evidenciam a eficiência do fungicida fludioxonil, que apresentou inibição do crescimento micelial maior que 50% para todos os isolados de *C. cassiicola* de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil avaliados, com uma concentração de apenas 1 mg.L⁻¹.

Myresiotis *et al.* (2007), testando a resistência de 55 isolados de *Botrytis cinerea* aos fungicidas pyrimethanil, cyprodinil e fludioxonil, encontraram frequências de resistência de 49,10; 57,40 e 0,00%, respectivamente. Para o fungicida fludioxonil todos os isolados avaliados apresentaram inibição do crescimento micelial maior que 50%.

Tabela 4. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) de isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil a nove diferentes fungicidas.

Isolados	Fungicidas												
	Azoxystrobin	Boscalid	Carbendazim	Clorotalonil	Cyprodinil	Fluopyram	Fludioxonil	Pyrimethanil	Tebuconazole				
EH - 1013	43,42 Bb	55,26 Dc	61,87 Dc	24,20 Ba	66,37 Cc	42,80 Cb	81,50 Ad	39,37 Cb	80,13 Dd				
EH - 1049	37,63 Cc	43,75 Cc	100,00 Fe	42,88 Cc	77,18 Dd	-	78,46 Ad	24,18 Bb	0,00 Aa				
EH - 1066	37,69 Cb	48,35 Cb	100,00 Fd	11,41 Aa	80,08 Dc	-	94,96 Bd	44,99 Cb	72,10 Cc				
EH - 1068	29,89 Bb	32,96 Bb	2,87 Aa	23,61 Bb	55,28 Cc	13,47 Ba	75,56 Ad	36,18 Cb	47,35 Bc				
EH - 1069	29,32 Ba	50,96 Db	29,56 Ca	23,02 Ba	60,00 Cb	47,58 Cb	77,97 Ac	34,28 Ba	70,04 Cc				
EH - 1070	38,28 Ca	57,99 Db	100,00 Fd	26,51 Ba	76,19 Dc	65,25 Ec	96,84 Bd	35,16 Ca	69,03 Cc				
EH - 1092	51,00 Dc	63,08 Dd	7,31 Aa	31,42 Bb	65,69 Cd	-	94,41 Be	28,96 Bb	76,68 Ce				
EH - 1107	42,83 Cb	43,59 Cb	100,00 Fd	22,53 Ba	81,30 Dc	54,89 Db	81,28 Ac	45,65 Cb	70,14 Cc				
EH - 1187	45,51 Cc	47,83 Cc	0,00 Aa	29,76 Bb	84,04 De	-	81,25 Ae	50,05 Dc	65,99 Cd				
EH - 1188	37,57 Cb	47,20 Cb	18,21 Ba	34,88 Bb	89,85 Ec	-	96,03 Bc	47,36 Db	82,10 Dc				
EH - 1453	27,08 Ba	62,98 Dc	23,47 Ba	28,66 Ba	94,19 Ed	-	88,32 Bd	49,67 Db	79,60 Dd				
EH - 1472	38,58 Ca	48,30 Cb	77,73 Ec	28,89 Ba	93,09 Ed	68,16 Ec	83,20 Ac	100,00 Gd	82,84 Dc				
EH - 1503	19,96 Ba	29,17 Bb	93,53 Fd	41,75 Cb	83,33 Dd	59,68 E	91,94 Bd	10,76 Aa	66,10 Cc				
EH - 1504	39,23 Ca	58,61 Db	100,00 Fc	36,65 Ca	66,87 Cb	62,47 Eb	88,11 Bc	29,83 Ba	90,01 Ec				
EH - 1656	31,63 Bb	56,95 Dc	0,00 Aa	39,77 Cb	70,13 Cc	60,14 Ec	84,96 Bd	45,37 Cb	67,97 Cc				
EH - 1657	28,52 Bb	41,87 Cc	1,46 Aa	26,05 Bb	80,22 Dd	-	86,95 Bd	42,89 Cc	73,02 Cd				
EH - 1665	21,97 Ba	46,05 Cb	16,72 Ba	31,61 Ba	90,11 Ed	59,75 Ec	83,37 Ad	83,18 Fd	63,34 Cc				

EH - 1666	35,22	Ca	58,66	b	100,00	Fd	42,63	Ca	92,90	Ed	-	87,26	Bd	63,65	Eb	74,68	Cc	
EH - 1667	54,68	Db	54,80	b	100,00	Fd	15,31	Aa	77,54	Dc	70,30	Fc	91,74	Bd	48,76	Db	78,54	Dc
EH - 1699	40,11	Cb	55,27	Dc	2,63	Aa	9,09	Aa	74,19	Cd	54,59	Dc	69,59	Ad	44,62	Cb	63,33	Cd
EH - 1708	71,67	Ec	59,72	Db	7,52	Aa	9,51	Aa	100,00	Ed	66,30	Ec	94,64	Bd	50,83	Db	68,23	Cc
EH - 1709	49,12	Dc	85,76	Fd	12,05	Aa	26,78	Bb	75,28	Dd	-	87,69	Bd	41,67	Cc	83,44	Dd	
EH - 1710	29,81	Ba	30,00	Ba	100,00	Fd	43,42	Cb	98,21	Ed	81,99	Fc	97,23	Bd	97,78	Gd	88,89	Ec
EH - 1719	51,81	Dc	66,86	Ed	0,00	Aa	30,47	Bb	95,37	Ef	75,71	Fe	87,15	Bf	57,70	c	68,71	Cd
EH - 1720	55,42	Db	56,54	Db	100,00	Fc	16,98	Aa	91,18	Ec	62,65	Eb	87,05	Bc	50,99	Db	52,13	Bb
EH - 1721	28,33	Bb	57,08	Dc	0,00	Aa	30,67	Bb	61,38	Cc	-	76,86	Ad	25,41	Bb	60,89	Cc	
EH - 1723	54,96	Dc	63,51	Dc	5,55	Aa	39,79	Cb	30,67	Ab	-	65,82	Ac	52,56	Dc	91,09	Ed	
EH - 1724	23,78	Ba	57,83	Dc	81,76	Ed	34,74	Ba	50,52	Bb	-	77,45	Ad	43,20	Cb	65,88	Cc	
EH - 1796	58,89	Db	54,03	Da	100,00	Fd	45,87	Ca	66,45	Cb	68,06	Eb	83,41	Ac	46,25	Ca	75,30	Cc
EH - 1816	35,64	Cb	82,18	Fd	9,15	Aa	12,42	Aa	57,55	Cc	-	79,77	Ad	41,16	Cb	88,03	Ed	
EH - 1824	31,27	Bb	57,88	Dc	2,27	Aa	43,21	Cb	69,22	Cd	-	78,61	Ad	36,28	Cb	73,97	Cd	
EH - 1830	13,67	Aa	42,79	Cb	100,00	Fd	29,99	Bb	76,98	Dc	-	70,10	Ac	20,68	Ba	78,33	Dc	
EH - 1927	26,44	Bb	63,00	Dd	11,98	Aa	33,13	Bb	93,22	Ee	-	86,95	Be	52,94	Dc	81,40	De	
EH - 1928	0,44	Aa	67,93	Ec	15,83	Bb	17,79	Ab	85,86	Dd	-	86,40	Bd	65,33	Ec	89,96	Ed	
EH - 1979	0,00	Aa	64,70	Dc	10,98	Aa	25,85	Bb	96,94	Ee	-	87,77	Bd	98,36	Ge	83,49	Dd	
EH - 1989	26,51	Bb	59,99	Dc	7,83	Aa	25,40	Bb	90,78	Ee	55,53	Dc	96,46	Be	75,39	Fd	77,65	Dd
EH - 1990	6,34	Aa	37,43	Cc	0,00	Aa	25,26	Bb	95,60	Ee	-	76,19	Ad	42,09	Cc	80,90	Dd	
EH - 2045	0,00	Aa	27,37	Bb	8,55	Aa	53,42	Dc	63,61	Cc	35,48	Cb	72,42	Ac	37,80	Cb	64,10	Cc
EH - 2082	45,65	Cb	51,24	Db	100,00	Fd	32,86	Ba	66,67	Cc	-	70,16	Ac	31,55	Ba	69,21	Cc	

EH - 2083	34,60 Cb	51,83 Dc	100,00 Fd	44,32 Cc	57,06 Cc	-	94,92 Bd	19,69 Ba	100,00 Ed
EH - 2100	52,86 Db	46,88 Cb	2,56 Aa	44,16 Cb	88,19 Ed	50,42 Db	89,99 Bd	53,91 Db	71,28 Cc
EH - 2101	0,00 Aa	31,75 Bb	36,04 Cb	12,25 Aa	78,04 Dc	-	97,68 Bd	23,08 Bb	70,25 Cc
EH - 2102	22,21 Bb	47,71 Cc	3,20 Aa	31,14 Bb	78,53 Dd	51,17 Dc	96,12 Be	52,06 Dc	78,57 Dd
EH - 2105	26,81 Bb	50,35 Dc	5,16 Aa	24,23 Bb	86,93 Ed	74,84 Fd	100,00 Be	52,95 Dc	78,90 Dd
EH - 2106	24,46 Bb	40,65 Cc	1,54 Aa	29,64 Bb	92,11 Ee	52,35 Dc	91,74 Be	36,44 Cb	75,21 Cd
EH - 2107	23,24 Ba	41,61 Cb	100,00 Fe	62,49 Ec	72,69 Cd	39,98 Cb	94,61 Be	43,54 Cb	95,83 Ee
EH - 2108	34,57 Ca	41,89 Ca	100,00 Fc	47,11 Ca	86,07 Db	47,18 Cb	99,32 Bc	40,93 Ca	86,61 Eb
EH - 2109	18,65 Bb	71,14 Ed	0,00 Aa	24,18 Bb	68,87 Cd	56,87 Dc	74,72 Ad	27,85 Bb	85,45 De
EH - 2110	17,62 Ba	29,25 Ba	16,82 Ba	70,29 Ec	69,49 Cc	43,04 Cb	80,72 Ac	22,05 Ba	67,61 Cc
EH - 2123	39,14 Ca	42,29 Ca	100,00 Fc	48,24 Ca	83,79 Db	44,77 Ca	89,89 Bb	40,74 Ca	81,51 Db
EH - 2124	25,82 Ba	51,85 Db	100,00 Fd	55,26 Db	87,14 Ed	57,92 Eb	94,45 Bd	50,02 Db	72,41 Cc
EH - 2125	0,00 Aa	6,52 Aa	100,00 Fe	11,42 Aa	59,69 Cc	0,00 Aa	84,84 Bd	4,09 Aa	44,63 Bb
EH - 2126	31,18 Ba	55,03 Db	97,66 Fd	34,50 Ba	63,07 Cc	-	76,23 Ac	30,84 Ba	76,20 Cc
EH - 2127	58,14 Db	48,57 Cb	72,94 Ec	32,70 Ba	92,02 Ed	65,46 Eb	87,91 Bd	52,67 Db	81,76 Dc
EH - 2128	37,48 Cb	47,13 Cb	13,95 Ba	16,00 Aa	79,32 Dc	-	84,11 Ac	25,04 Ba	72,34 Cc

¹ Inibição do crescimento micelial (ICM) seguida pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Valores da DE50 em mg.L⁻¹.

Quanto aos isolados, os resultados do teste de média mostraram grande variação em relação a ICM com formação de nove grupos distintos, estes variando de 34,58 a 74,15% (Tabela 5). O isolado EH-2125, proveniente da cultura da pimenta longa do Estado do Amazonas, e o isolado EH-1068, proveniente da cultura do tomate do Estado do Pará, apresentaram os menores valores de ICM com 34,58% e 35,24%, respectivamente. O isolado EH-1710, proveniente da cultura do pepino do estado do Tocantins, apresentou maior valor de ICM com 74,15% (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) de isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil.

Isolados	ICM	Isolados	ICM	Isolados	ICM
EH - 2125	34,58 A ¹	EH - 2102	51,19 D	EH - 1719	59,31 F
EH - 1068	35,24 A	EH - 1092	52,32 D	EH - 1107	60,24 F
EH - 2045	40,30 B	EH - 1928	53,69 D	EH - 1066	61,20 F
EH - 1721	42,58 B	EH - 1830	54,07 E	EH - 1070	62,80 G
EH - 2101	43,64 B	EH - 1724	54,40 E	EH - 2083	62,80 G
EH - 1990	45,48 C	EH - 1013	54,99 E	EH - 2123	63,37 G
EH - 1699	45,94 C	EH - 1665	55,12 E	EH - 1504	63,53 G
EH - 2110	46,32 C	EH - 1503	55,14 E	EH - 1720	63,66 G
EH - 2128	46,92 C	EH - 2105	55,57 E	EH - 2107	63,78 G
EH - 1069	46,97 C	EH - 2100	55,58 E	EH - 2108	64,85 G
EH - 2109	47,53 C	EH - 1927	56,13 E	EH - 1667	65,74 G
EH - 1657	47,62 C	EH - 1188	56,65 E	EH - 2127	65,80 G
EH - 1824	49,09 D	EH - 1453	56,75 E	EH - 2124	66,10 G
EH - 2106	49,35 D	EH - 1989	57,28 F	EH - 1796	66,47 G
EH - 1723	50,49 D	EH - 1709	57,72 F	EH - 1472	68,98 H
EH - 1049	50,51 D	EH - 2126	58,09 F	EH - 1666	69,37 H
EH - 1187	50,55 D	EH - 2082	58,42 F	EH - 1710	74,15 I
EH - 1816	50,74 D	EH - 1979	58,51 F		
EH - 1656	50,77 D	EH - 1708	58,71 F		

¹ Inibição do crescimento micelial (ICM) seguida pela mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Valores da DE50 em mg.L⁻¹.

Quando cada isolado é comparado entre os diferentes fungicidas, observa-se que estes também apresentaram grande variação quanto aos valores de ICM (Tabela 4). Alguns isolados apresentaram 0% de inibição do crescimento micelial para um determinado fungicida, porém para outro fungicida o valor de ICM foi de 100% (Tabela 4). O isolado EH-2125 apresentou menores valores de ICM para cinco fungicidas, sendo que, para os fungicidas azoxystrobin e fluopyram, os valores de ICM foram de 0%. Porém, para o fungicida carbendazim o valor de ICM do isolado EH-2125 chegou a 100% (Tabela 4). O isolado EH-2083 apresentou valores de inibição do crescimento micelial de 100% para os fungicidas carbendazim e tebuconazole. Os isolados EH-1092 e EH-1719 apresentaram maior variação entre os isolados avaliados, com formação de 6 grupos distintos com ICM variando de 7,30 a 94,41% e de 0 a 95,36%, respectivamente. Em ambos os isolados, os menores valores de ICM foram para o fungicida carbendazim e os maiores valores foram para os fungicidas fludioxonil (EH-1092) e cyprodinil (EH-1719) (Tabela 4). O isolado EH-1796 apresentou menor variação dos valores de ICM entre os isolados avaliados. Os valores variaram de 45,81% para o fungicida clorotalonil e de 100% para o fungicida carbendazim (Tabela 4).

A Figura 2 apresenta os resultados dos dois experimentos realizados em diferentes épocas para o teste de sensibilidade a nove fungicidas de isolados de *C. cassiicola*. Quanto à média da porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados avaliados, os fungicidas comportaram-se de maneira muito semelhante nos dois experimentos (Figura 2). A maior variação foi percebida no fungicida cyprodinil, que no primeiro experimento gerou ICM médio de 77,58% e no segundo experimento o ICM médio foi de 66,69%. Dos nove fungicidas avaliados, cinco geraram ICM maior que 50%. O fungicida fludioxonil gerou o maior valor ICM, de aproximadamente 91,67%, e o fungicida clorotalonil, o menor valor de ICM, de aproximadamente 30,14% (Figura 2).

O fungicida fludioxonil também apresentou ótimos resultados em trabalho realizado por Amiri *et al.* (2013) com 392 isolados de *B. cinerea* em ensaio realizado na Flórida. Todos os isolados foram considerados sensíveis a este fungicida. Neste mesmo trabalho, os resultados mostram que 81% dos isolados foram resistentes ao fungicida boscalid, 24 e 21,2% foram considerados resistentes para os fungicidas pyrimethanil e cyprodinil, respectivamente.

Com esses resultados, conclui-se que o fungicida fludioxonil na concentração de 1 mg.L⁻¹ apresentou maior inibição do crescimento micelial dos isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes hospedeiras e regiões geográficas do Brasil entre os fungicidas avaliados, evidenciando um grande potencial em futuras recomendações para o controle de mancha-alvo no país.

A possibilidade de um patógeno desenvolver resistência a um determinado fungicida depende da frequência e do grau de resistência. A frequência corresponde à proporção da população de linhagens resistentes e o grau de resistência pela diferença das linhagens sensíveis e resistentes, sendo expresso pelo fator de resistência (FR) (Avozani, 2011).

Segundo Ghini & Kimati, 2000, valores de fatores de resistência maiores que 1 indicam desenvolvimento de resistência do patógeno ao fungicida. Os resultados do FR apresentados pelos fungicidas avaliados neste trabalho mostram que os fungicidas carbendazim (1,29), pyrimethanil (2,05), azoxystrobin (5,11) e clorotalonil (12,75) apresentaram isolados de *C. cassiicola* com resistência. Sendo o fungicida clorotalonil o menos indicado no controle de *C. cassiicola* por apresentar maior FR. Já o fungicida fludioxonil é o mais indicado por apresentar desenvolvimento da resistência nulo (FR = 0).

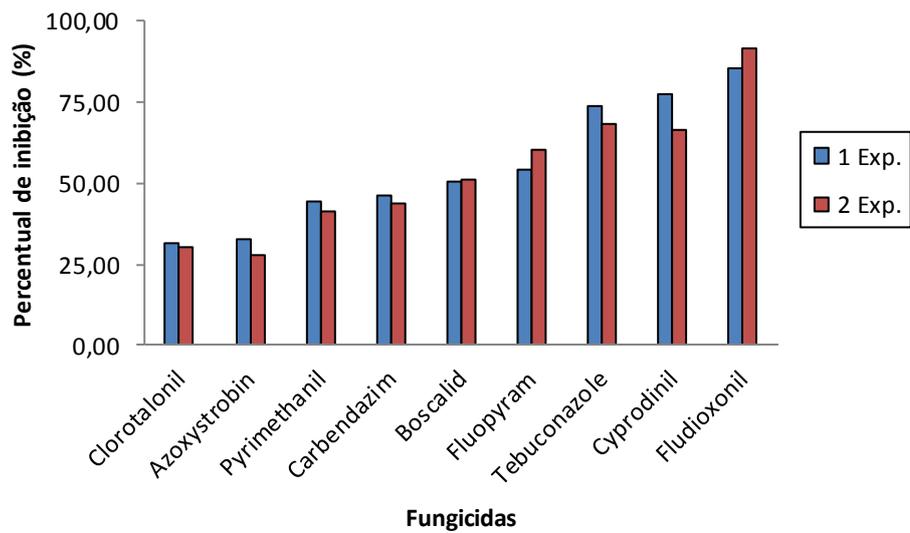


Figura 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) do isolado *Corynespora cassiicola* a diferentes fungicidas nos experimentos 1 e 2.

Referências

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários 2015. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 26 de Fevereiro de 2015.

ALVES, M.L.B; LOURD, M. & NODA, H. 1985. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* em caráter epidêmico em tomates de Manaus. Fitopatologia Brasileira 10:229.

AMIRI, A.; HEATH, S.M. & PERES, N.A. 2013. Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. Plant Disease, 97(3), 393-401.

AVILA-ADAME, C.; OLAYA, G. & KÖLLER, W. 2003. Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI fungicides. Plant Dis. 87:1426–1432.

AVOZANI, A. 2011. Sensibilidade de *Corynespora cassiicola*, isolados da soja, a fungicidas in vitro (Doctoral dissertation, Universidade de Passo Fundo).

BRENT, K.J., & HOLLOMON, D.W. (1995). Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed. Brussels: GIFAP.

CARDOSO, M.O. & NORMANDO, M.D.S. 1991. Controle químico de *Corynespora cassiicola* em tomateiro na região de Manaus. EMBRAPA, CPAA.

CASTELLANI, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. Journal of Tropical Medicine & Hygiene, v.24, p.270-276.

CLARK, J.S.; BLYTHE, E.K.; COPEL, W.E.; WINDHAM, A.S.; BOST, S.C. & WINDHAM, M. T. 2011. Growth sensitivity of *Corynespora cassiicola* to thiophanate-methyl, iprodione, and fludioxonil. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2011-0926-03-RS.

FERNANDO, T.H.P.S.; JAYASINGHE, C.K.; WIJESUNDERA, R.L.C. & SIRIWARDANA, D. 2010. Screening of fungicides against *Corynespora* leaf fall disease of rubber under nursery conditions. Journal of Plant Diseases and Protection, 117(3), 117.

FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042.

FRAC - Fungicide resistance action committee. 2015. Disponível em: <http://www.frac.info/home>. Acesso em: 01 de Maio de 2015.

GHINI, R. & KIMATI, H. 2000. Resistência de fungos a fungicidas. 1ª edição. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.78.

HINCAPIE, M. 2012. Baseline Sensitivity of *Guignardia Citricarpa*, the Causal Agent of Citrus Black Spot to Azoxystrobin, Pyraclostrobin and Fenbuconazole (Doctoral dissertation, University of Florida).

ISHII, H.; Miyamoto, T.; Ushio, S. & Kakishima, M. 2011. Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*. Pest Manag. Sci. 67:474-482.

KANETIS, L.; FORSTER, H. & ADASKAVEG, J. E. 2008. Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against *Penicillium* spp. on citrus and multiple resistance evaluations in *P. digitatum*. Plant Dis. 92:301–310.

LI, H.X. & XIAO, C.L. 2008. Baseline sensitivities to fludioxonil and pyrimethanil in *Penicillium expansum* populations from apple in Washington State. Postharv. Biol. Technol. 47:239-245.

LOPES, C.A. 2005. Introdução geral. In: Lopes, C.A. & Ávila, A.C. (Eds.). Doenças do tomateiro. Brasília: Embrapa Hortaliças. p.11-15.

MENDONÇA, R.F.; RODRIGUES, W.N.; JESUS JÚNIOR, W.C.; SAMBUGARO, R. & MARTINS, L.D. 2012. Mancha de corynespora: desafio para a cultura do café conilon no Estado do Espírito Santo. Enciclopédia Biosfera. Goiânia. vol.8. n.14. p.724-734.

MENEZES, M. & SILVA-HANLIN, D.M.W. 1997. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Imprensa Universitária. UFRPE. Recife.

MESQUINI, R.M. 2012. Componentes monocíclicos e quantificação de danos no patossistema *Corynespora cassiicola* - soja/Renata Moreschi Mesquini. Piracicaba, p.92 : il.

MIYAMOTO, T.; ISHII, H.; STAMMLER, G.; KOCH, A.; OGAWARA, T.; TOMITA, Y.; FOUNTAINE, J. M.; USHIO, S.; SEKO, T. & KOBORI, S. 2009. Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. Plant Pathology 59:873-881.

MONDAL, S.N.; BHATIA, A.; SHILTS, T. & TIMMER, L.W. 2005. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. Plant Dis. 89:1186–1194.

MULITERNO DE MELO, M. 2009. Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiicola* em soja. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitopatologia Passo Fundo) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

MYRESIOTIS, C.K.; KARAOGLANIDIS, G.S. & TZAVELLA-KLONARI, K. 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 91(4), 407-413.

PARREIRA, D.F.; NEVES, W.S. & ZAMBOLIM, L. 2009. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. *Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas*. Maranhão. vol.3, n.2, p.24-34.

PEREIRA, A.V.S. 2009. Sensibilidade a fungicidas e adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* patogênico ao mamão. Recife: UFRPE. 57p (Tese mestrado).

REIS, A. & BOITEUX, L.S. 2007. Mancha-de-corinéspora do tomateiro. Comunicado Técnico, Embrapa Hortaliças. Brasília-DF. Outubro. ISSN 1414-9850.

REIS, E.M.; REIS, A.C. & CARMONA, M.A. 2010. Manual de fungicidas – Guia para o Controle Químico de Doenças de plantas. 6 ed. Passo Fundo: Editora UPF, p.226.

SAKATA SEED SUDAMERICA. 2015. Disponível em <http://www.sakata.com.br/>. Acessado em 20 de março de 2015.

SCHLUB, R.L.; SMITH, L.J.; DANTOFF, L.E. & PERNEZNY, K. 2009. An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. *Acta Horticulturae* 808:25-28.

TERAMOTO, A.; MACHADO, T.A.; NASCIMENTO, L.M.; MEYER, M.C. & CUNHA, M.G. 2012. Sensibilidade a fungicidas de isolados de *Corynespora cassiicola* provenientes do Estado de Goiás. In Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. Soja: integração nacional e desenvolvimento sustentável: anais. Brasília, DF: Embrapa.

TERAMOTO, A.; MARTINS, M.C.; FERREIRA, L.C. & CUNHA, M.G. 2011. Reaction of hybrids, inhibition in vitro and target spot control in cucumber. Horticultura Brasileira 29: 342-348.

VALLAD, G.E. & BURLACU, V. 2011. Initial Characterization of *Corynespora cassiicola* and *Alternaria* spp. affecting Florida Tomatoes: Fungicide resistance, pathogen Variability, and host resistance. 2011 Florida tomato institute proceedings. Disponível em: http://swfrec.ifas.ufl.edu/docs/pdf/veg-hort/tomato-institute/proceedings/ti11_proceedings.pdf. Acesso em: 26 de março de 2015.

VEGA, B.; LIBERTI, D.; HARMON, PHILIP F. & DEWDNEY, M.M. 2012. A rapid resazurin-based microtiter assay to evaluate QoI sensitivity for *Alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. Plant Dis. 96:1262–1270.

VERZIGNASSI, J.R.; VIDA, J.B. & TESSMANN, D.J. 2003. *Corynespora cassiicola* causando epidemias de manchas foliares em pepino ‘japonês’ sob estufa no norte do Paraná. Fitopatologia Brasileira 28: 570.

VOLIN, R.B.; POHRONEZNY, K. & SIMONE G.W. 1989. Severe spotting of fresh market tomato fruit incited by *Corynespora cassiicola* after storm-related injury. Plant Dis., 73: 1018–1019.

WALTER, M.; STEVENSON, O.D.; AMPONSAH, N.T.; SCHEPER, R.W.A.; MCLACHLAN, A.R.G., & ZYDENBOS, S.M. 2014. Sensitivity of *Neonectria ditissima* to carbendazim fungicide in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 67, 133-138.

XAVIER, S.A.; CANTERI, M.G.; BARROS, D.C.M. & GODOY, C.V. 2013. Sensitivity of *Corynespora cassicola* from soybean to carbendazim and prothioconazole. *Trop. plant pathol.* [online]. ahead of print, Epub Aug 02.

CONCLUSÕES GERAIS

- ❖ Apesar da grande diversidade dos isolados quanto à hospedeira de origem e a região geográfica de coleta, não foi identificada neste estudo nenhuma espécie diferente de *C. cassicola*.
- ❖ A árvore filogenética construída com sequências da região β -tubulina apresentou melhor distribuição dos isolados quanto à hospedeira de origem e, em alguns casos, quanto à região geográfica de coleta.
- ❖ Após a caracterização molecular, morfométrica e patogênica dos isolados de *C. cassicola* avaliados, concluiu-se que, exceto para a região β -tubulina, nenhuma relação entre a hospedeira de origem e a região geográfica de coleta dos isolados foi estabelecida neste estudo.
- ❖ O fungicida fludioxonil apresenta uma grande expectativa de efeitos satisfatórios no controle de mancha-alvo. Já os fungicidas carbendazim, pyrimethanil, azoxystrobin e, principalmente, clorotalonil apresentam grande possibilidade de desenvolvimento de resistência dos isolados de *C. cassicola*.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ❖ Com a obtenção de diferentes resultados em relação à distribuição e resolução intraespecífica dos isolados avaliados quando submetidos a diferentes genes, faz-se necessária a utilização de outros genes ou a utilização de outras técnicas para melhor esclarecimento da variabilidade genética deste patógeno.
- ❖ Uma vez que no teste de sensibilidade foram encontrados alguns fungicidas com grande potencial para o controle de mancha-alvo, futuros ensaios em casa de vegetação e em campo fazem-se necessários para um posterior registro no Brasil.
- ❖ Após um melhor conhecimento do patógeno em relação à esporulação, trabalhos relacionados à busca por fonte de resistência são de grande interesse para o controle da mancha-alvo.