

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – FCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL – PPGATR

CLÉO CARVALHO OHANA

RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE
CORYNESPORA CASSIICOLA (BERK. & CURT.) C.T. WEI NO AMAZONAS, BRASIL

MANAUS

2023

CLÉO CARVALHO OHANA

RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE
CORYNESPORA CASSIICOLA (BERK. & CURT.) C.T. WEI NO AMAZONAS, BRASIL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia Tropical, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Agronomia Tropical.

DRA. JÂNIA LÍLIA DA SILVA BENTES LIMA

DRA. ANA FRANCISCA TIBÚRCIA AMORIM FERREIRA E FERREIRA

MANAUS

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O36r Ohana, Cléo Carvalho
Resistência a fungicidas e caracterização filogenética de
Corynespora cassiicola (Berk. & Curt.) C.T. Wei no Amazonas,
Brasil / Cléo Carvalho Ohana . 2023
107 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Jânia Lília da Silva Bentes Lima
Coorientadora: Ana Francisca Tibúrcia Amorim Ferreira e Ferreira
Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Fitopatógeno. 2. Mancha-alvo. 3. Resistência microbiana. 4.
Classificação filogenética. 5. Agricultura tropical. I. Lima, Jânia Lília
da Silva Bentes. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

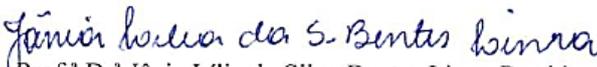
CLÉO CARVALHO OHANA

**RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE
CORYNESPORA CASSIICOLA (BERK. & CURT.) C.T. WEI NO AMAZONAS,
BRASIL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia Tropical, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Agronomia Tropical.

Aprovado em: 06 de junho de 2023.

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Jânia Lília da Silva Bentes Lima, Presidente

Universidade Federal do Amazonas

gov.br

CLAUDIO BELMINO MAIA
Data: 28/08/2023 14:17:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Claudio Belmino Maia, Membro

Universidade Estadual do Maranhão


Prof. Dr. José Ferreira da Silva, Membro

Universidade Federal do Amazonas


Prof./Dr. Luadir Gasparotto, Membro

Embrapa Amazônia Ocidental

gov.br

Documento assinado digitalmente
ROSALÉE ALBUQUERQUE COELHO NETTO
Data: 31/08/2023 17:42:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra Rosalee Albuquerque Coelho Netto, Membro

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dedico este trabalho a todos os professores e colegas
que fizeram parte da minha trajetória na UFAM. Que
todos os desejos que recebi até hoje sejam multiplicados
na vida de cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

Á D'us pela minha vida e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo deste período;

Á minha mãe Ivocleide por todo o esforço investido na minha educação e por ser meu apoio mais importante no desafio de ser mãe e permanecer na vida acadêmica;

Ao meu filho Ivo por ser a luz que ilumina meu caminho, a força que me ajuda a evoluir e por me presentear com o maior amor do mundo;

Ao meu pai Moysés (*in memoriam*), e demais entes queridos que vibraram com meu ingresso no doutorado e se foram durante os anos de pandemia por deixarem memórias positivas;

Á professora Jânia Lília pela dedicação em sua orientação em toda a minha jornada de estudos e aprendizagem e por fornecer todas as bases necessárias para a realização deste trabalho;

Á professora Ana Francisca sempre disponível a compartilhar todo o seu vasto conhecimento possibilitando a realização deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia FCA/UFAM que compartilharam os inúmeros desafios que enfrentamos sempre com o espírito colaborativo;

Aos docentes da Faculdade de Ciências Agrárias e do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da UFAM que contribuíram com a minha formação acadêmica e profissional;

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa durante o período do doutorado.

*A natureza em seus caprichos e mistérios
condensa em pequenas coisas, o poder de
dirigir as grandes; nas sutis, a potência de
dominar as mais grosseiras; nas coisas
simples, a capacidade de reger as complexas*

Ana Maria Primavesi

RESUMO GERAL

Corynespora cassiicola é um fungo fitopatogênico com ampla gama de espécies hospedeiras que representa ameaça à produtividade de culturas de interesse agrônomo em ambientes tropicais. No estado do Amazonas, o fungo é agente causador da doença mancha-alvo em solanáceas, cucurbitáceas e outras hortaliças. Este estudo avalia a ocorrência de resistência a fungicidas de *C. cassiicola* coletados em áreas agrícolas do Amazonas por meio de ensaios de inibição do crescimento *in vitro* de colônias, sob diferentes concentrações de Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol, bem como investiga o efeito destes fungicidas no controle da mancha-alvo em tomateiros por meio da inoculação do patógeno e aplicação dos produtos em condições de viveiro. Adicionalmente, a diversidade de linhagens do fungo foi caracterizada por meio de inferência filogenética. Embora os produtos tenham sido capazes de diminuir significativamente a severidade da mancha-alvo em tomateiros, os isolados de *C. cassiicola* demonstraram alta resistência a todos os fungicidas testados nos ensaios de resistência aos fungicidas *in vitro*. A análise filogenética revelou a existência de pelo menos duas linhagens de *C. cassiicola* no Amazonas, que foram correlacionadas às linhagens PL1 e PL4, identificadas em sequências de referência na literatura.

Palavras-chave: Fitopatógeno, Mancha-alvo, Resistência microbiana, Classificação filogenética, Agricultura tropical.

GENERAL ABSTRACT

Corynespora cassiicola, a phytopathogenic fungus with a wide range of host species, poses a threat to the productivity of various economically important crops in tropical environments. In the Amazonas state, it is the causative agent of the target spot disease in solanaceous, cucurbit, and other economically significant vegetables in agricultural production systems. The objective of this study was to evaluate the potential fungicide resistance of *C. cassiicola* collected from agricultural areas in the Amazonas state through in vitro colony growth inhibition assays using different concentrations of azoxystrobin, boscalid, Carbendazim, and Tebuconazole. Additionally, the effect of these fungicides on the control of target spot in tomato plants was investigated by inoculating the pathogen and applying the products under greenhouse conditions. Furthermore, the diversity of fungal lineages was characterized through phylogenetic inference. Although the products were able to significantly reduce the severity of target spot in tomato plants, the *C. cassiicola* isolates demonstrated high resistance to all tested fungicides in in vitro resistance assays. Phylogenetic analysis revealed the existence of at least two lineages of *C. cassiicola* in the Amazonas state, which were correlated with the PL1 and PL4 lineages identified in reference sequences in the literature.

Keywords: Phytopathogen, Target spot, Microbial resistance, Phylogenetic classification, Tropical agriculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Corynespora cassiicola</i>	19
Figura 2 - Colônias de <i>Corynespora cassiicola</i> isolados de tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i>) dez dias após o cultivo em meio de cultura batata dextrose-ágar	19
Figura 3 - Ocorrência e distribuição geográfica global de populações de <i>Corynespora cassiicola</i>	20
Figura 4 - Sintomas da mancha-alvo causada por <i>Corynespora cassiicola</i> em folhas (A) e fruto (B) de tomate cereja	23
Figura 5 - Escala de notas para quantificar a severidade de <i>Corynespora cassiicola</i> em folíolos de tomateiro.....	58
Figura 6 - Árvore filogenética consenso.....	94
Figura 7 - Árvore filogenética	96
Figura 8 - Árvore filogenética	98
Figura 9 - Descrição do grupo 1	99
Figura 10 - Descrição do grupo 2	100
Figura 11 - Mutações nos pares de bases 158 e 278 em um alinhamento de 584 pares de bases da região rDNA ITS de <i>Corynespora cassiicola</i>	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coleção de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> obtidos no Amazonas.....	54
Tabela 2 - Concentração Efetiva Média para 50% do crescimento micelial (EC50%) em relação ao tratamento controle (0 µg/mL ⁻¹) dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em meio de cultura com diferentes concentrações do fungicida Azoxistrobina.....	60
Tabela 3 - Concentração Efetiva Média para 50% do crescimento micelial (EC50%) em relação ao tratamento controle (0 µg/mL ⁻¹) dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em meio de cultura com diferentes concentrações do fungicida Boscalida.....	61
Tabela 4 - Concentração Efetiva Média para 50% do crescimento micelial (EC50%) em relação ao tratamento controle (0 µg/mL ⁻¹) dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em meio de cultura com diferentes concentrações do fungicida Carbendazim.	62
Tabela 5 - Concentração Efetiva Média para 50% do crescimento micelial (EC50%) em relação ao tratamento controle (0 µg/mL ⁻¹) dos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em meio de cultura com diferentes concentrações do fungicida Tebuconazol.....	63
Tabela 6 - Inibição do crescimento micelial (ICM%) e perfil de sensibilidade in vitro de <i>Corynespora cassiicola</i> aos fungicidas Azoxistrobina (1 µg/mL ⁻¹), Boscalida (10 µg/mL ⁻¹), Carbendazim (10 µg/mL ⁻¹), e Tebuconazol (5 µg/mL ⁻¹)	67
Tabela 7 - Severidade média e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) da mancha-alvo em tomateiros inoculados com <i>Corynespora cassiicola</i> resistentes a Azoxistrobina (1 µg mL ⁻¹), Boscalida (10 µg mL ⁻¹), Carbendazim (10 µg mL ⁻¹), Tebuconazol (5 µg mL)	74
Tabela 8 - Relação entre as linhagens filogenéticas FL1 e FL4 de <i>Corynespora cassiicola</i> e a presença de variantes resistentes aos fungicidas Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol.....	102

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Concentração do fungicida Azoxistrobina efetiva para a inibição de 50% do crescimento micelial (EC50%) de <i>Corynespora cassiicola</i>	64
Gráfico 2 - Concentração do fungicida Boscalida efetiva para a inibição de 50% do crescimento micelial (EC50%) de <i>Corynespora cassiicola</i>	64
Gráfico 3 - Concentração do fungicida Carbendazim efetiva para a inibição de 50% do crescimento micelial (EC50%) de <i>Corynespora cassiicola</i>	65
Gráfico 4 - Concentração do fungicida Tebuconazol efetiva para a inibição de 50% do crescimento micelial (EC50%) de <i>Corynespora cassiicola</i>	65
Gráfico 5 - Inibição de crescimento micelial (ICM%) de 69 isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> ao fungicida Azoxistrobina na concentração 1 µg/mL-1.....	68
Gráfico 6 - Inibição de crescimento micelial (ICM%) de 69 isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> ao fungicida Boscalida na concentração 10 µg/mL-1	69
Gráfico 7 - Inibição de crescimento micelial (ICM%) de 69 isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> ao fungicida Carbendazim na concentração 10 µg/mL-1	69
Gráfico 8 - Inibição de crescimento micelial (ICM%) de 69 isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> ao fungicida Tebuconazol na concentração 5 µg/mL-1.....	70
Gráfico 9 - Progresso da severidade de mancha-alvo causada pelos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em tomateiro <i>versus</i> tempo (dias), observados no tratamento com Azoxistrobina na concentração 1 µg/mL-1	75
Gráfico 10 - Progresso da severidade de mancha-alvo causada pelos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em tomateiro <i>versus</i> tempo (dias), observados no tratamento com Boscalida na concentração 10 µg mL-1	75
Gráfico 11 - Progresso da severidade de mancha-alvo causada pelos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em tomateiro <i>versus</i> tempo (dias), observados no tratamento com Carbendazim na concentração 10 µg/mL-1	76
Gráfico 12 - Progresso da severidade de mancha-alvo causada pelos isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> em tomateiro <i>versus</i> tempo (dias), observados no tratamento com Tebuconazol na concentração 5 µg/mL-1.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de primers usados no sequenciamento do DNA de <i>Corynespora cassiicola</i>	90
Quadro 2 - Sequências de referência utilizadas neste estudo para a construção das filogenias de isolados de <i>Corynespora cassiicola</i> do estado do Amazonas	91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 O FUNGO <i>CORYNESPORA CASSIICOLA</i>	18
2.2 PATOLOGIA, QUANTIFICAÇÃO DE DANOS E CONTROLE.....	21
2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGICIDAS.....	25
2.4 RESISTÊNCIA DE FUNGOS A FUNGICIDAS	27
2.5 DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>C. CASSIICOLA</i>	29
2.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE <i>C. CASSIICOLA</i>	32
REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>CORYNESPORA CASSIICOLA</i> AOS FUNGICIDAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS, AMAZONAS	49
1 INTRODUÇÃO	50
2 OBJETIVOS	52
2.1 OBJETIVO GERAL.....	52
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 COLETA E ISOLAMENTO DE <i>C. CASSIICOLA</i>	53
3.2 AVALIAÇÕES DE SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS <i>IN VITRO</i>	54
3.3 EFICIÊNCIA DOS FUNGICIDAS SOBRE ISOLADOS RESISTENTES EM TOMATEIRO.....	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1 AVALIAÇÕES DE RESISTÊNCIA AOS FUNGICIDAS <i>IN VITRO</i>	60
4.2 EFICIÊNCIA DOS FUNGICIDAS SOBRE ISOLADOS RESISTENTES EM TOMATEIROS	73
5 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
CAPÍTULO 2: DIVERSIDADE FILOGENÉTICA DE <i>Corynespora cassiicola</i> NA REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS AMAZONAS, BRASIL	84
1 INTRODUÇÃO	85
2 OBJETIVOS	87
2.1 OBJETIVO GERAL.....	87
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	87

3 MATERIAL E MÉTODOS	88
3.1 OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	88
3.2 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	88
3.3 PCR E SEQUENCIAMENTO	89
3.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	90
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
5 CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS.....	105
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107

1 INTRODUÇÃO GERAL

A atividade agrícola é altamente dependente dos recursos naturais e dos processos biológicos, tornando-se vulnerável às mudanças ambientais. As pragas que afetam cultivos economicamente importantes estão se tornando mais destrutivas. Estima-se que entre 20% e 40% da produção agrícola global seja perdida devido ao ataque de agentes fitopatogênicos, resultando em impactos sociais, perda de biodiversidade e um prejuízo anual de cerca de US\$220 bilhões. Entre as pragas, os fungos representam o maior grupo com mais de 10 mil espécies associadas às plantas (SECRETARIAT, 2021).

No contexto dos fungos fitopatogênicos, a ocorrência cada vez mais frequente e severa de *Corynespora cassiicola*, agente causador da mancha-alvo, representa uma ameaça às lavouras nas regiões intertropicais do mundo. Esta ameaça afeta cultivos como soja (*Glycine max* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris*), tomate (*Solanum lycopersicum*), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), pepino (*Cucumis sativus*) e outros (FARR; ROSSMAN, 2022). Condições favoráveis como alta umidade, temperatura amena e presença de molhamento foliar prolongado, contribuem para o desenvolvimento e disseminação da doença (MACKENZIE *et al.*, 2018).

A mancha-alvo pode causar perdas significativas na produção agrícola devido à redução da área fotossintética das plantas afetadas, impactando negativamente a produtividade. Os danos podem variar de acordo com a espécie vegetal afetada e as condições ambientais. No Brasil, há registros de epidemias em cultivares de soja (*Glycine max* L.) com perdas de produtividade estimadas em até 42% (EDWARDS MOLINA *et al.*, 2022).

O manejo da doença geralmente envolve a utilização de medidas integradas de práticas de manejo, incluindo o controle químico. No entanto, embora *C. cassiicola* tenha um amplo espectro de hospedeiros e afete centenas de espécies vegetais, os produtos registrados no Brasil para o controle da mancha-alvo são recomendados exclusivamente para soja (*Glycine max* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) (SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, 2023). Esta limitação expõe o uso irregular de agrotóxicos, principalmente em culturas frutícolas e olerícolas destinadas à alimentação humana, o que pode acarretar consequências negativas para o meio ambiente, a saúde pública e a economia agrícola (REIS *et al.*, 2019).

Dentre os principais produtos fitossanitários disponíveis no mercado brasileiro para o controle de *C. cassiicola*, destacam-se os fungicidas dos grupos químicos dos triazóis, benzimidazóis, estrobilurinas e carboxamidas (SECRETARIA DE DEFESA

AGROPECUÁRIA, 2023). Esses produtos são altamente seletivos para cada organismo-alvo, ou seja, enquanto controlam a doença eficazmente em determinada espécie de planta, podem ser completamente ineficazes para outras (AMORIM; BERGAMIN FILHO; REZENDE, 2018).

C. cassicola é classificado como um patógeno de alto risco para o desenvolvimento potencial de resistência a fungicidas (FRAC, 2019). A resistência aos fungicidas ocorre quando uma população de fungos é exposta repetidamente a um mesmo produto ou a produtos com mecanismos de ação semelhantes. Isto pode levar ao desenvolvimento de mutações genéticas ou seleção de cepas resistentes e capazes de sobreviver à ação do produto fungicida e se multiplicar dentro de uma população de fungos e entre diferentes áreas geográficas, tornando os fungicidas ineficazes no controle da doença (HAWKINS; FRAAIJE, 2018).

Os estudos de resistência aos fungicidas são essenciais para monitorar a sensibilidade dos fungos aos diferentes fungicidas e detectar a presença de populações resistentes. Estas pesquisas envolvem testes laboratoriais nos quais os fungos são expostos a concentrações conhecidas de fungicidas, a fim de determinar sua eficácia. Além disso, é importante avaliar a frequência e a distribuição da resistência em diferentes áreas geográficas e culturas (AGUIAR; VALLAD; REIS, 2016; TERRAMOTO *et al.*, 2017; XAVIER *et al.*, 2021).

A grande variedade de ambientes de ocorrência e espécies de plantas hospedeiras indica uma alta diversidade genética dentro da espécie *C. cassicola* (DIXON *et al.*, 2009). Ao analisar esta diversidade genética, é possível identificar características genômicas específicas associadas à virulência, patogenicidade e resistência aos fungicidas. Estas informações podem ser utilizadas para desenvolver estratégias de manejo mais eficazes e direcionadas, tais como a seleção de cultivares resistentes, o uso adequado de fungicidas e a implementação de práticas culturais para o controle da mancha-alvo (CUTRIM; SILVA, 2003; DIXON *et al.*, 2009).

A filogenia é um campo de estudo que se dedica à investigação da história evolutiva das espécies. Essa história é inferida por meio da análise de características moleculares do DNA, o que proporciona informações sobre as relações evolutivas dos organismos. Através dos estudos filogenéticos, é possível conhecer a história evolutiva de uma espécie e compreender como determinadas características surgiram nesses organismos. A abordagem filogenética é especialmente útil para compreender a diversidade genética das populações de *C. cassicola*, permitindo um melhor planejamento de estratégias de controle da mancha-alvo na agricultura e a identificação de possíveis pontos de intervenção (NARANJO-ORTIZ; GALBADÓN, 2019).

Os estudos filogenéticos de *C. cassiicola* aplicados à agricultura são úteis para investigar as características moleculares dos organismos fitopatogênicos. Estes ajudam a compreender se um organismo pode se tornar uma praga quando uma cultura agrônômica é introduzida em uma nova área, a decidir quais métodos podem controlar de forma mais eficaz as pragas já estabelecidas, a determinar se um grupo de vetores de doenças pode representar uma ameaça futura e a identificar os genes responsáveis pela virulência, resistência a antibióticos, compatibilidade vegetativa e outras informações de interesse específico (BANGUELA-CASTILLO *et al.*, 2020; DAL'SASSO *et al.*, 2021; DIXON *et al.*, 2009).

No Brasil, os estudos de resistência a fungicidas e filogenia de *C. cassiicola* estão concentrados nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (GODOY *et al.*, 2020; MELLO *et al.*, 2022; SOARES *et al.*, 2020), enquanto são escassos ou inexistentes no Norte do país, incluindo o estado do Amazonas, onde a ocorrência da mancha-alvo é observada desde a década de 1980 (ALVES; LOURD; NODA, 1985; GASPAROTTO; PEREIRA; LIM, 1985).

Embora a agricultura comercial seja praticada em menor escala no Amazonas em comparação a outras regiões do Brasil, destacam-se as áreas de plantação de grãos de milho (*Zea mays*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), arroz (*Oryza sativa*) e soja (*Glycine max*) no sul do estado, que ocupam 8.240,25 hectares de área plantada e produção de 26.301,94 toneladas por ano. Além disso, a produção de hortaliças tem maior concentração de cultivo na região metropolitana de Manaus, ocupando 10.691,63 hectares de área plantada e produzindo diversas culturas, tais como jerimum (*Cucurbita moschata*) com 22.402,17 toneladas por ano, mamão (*Carica papaya*) com 10.941,65 toneladas por ano, macaxeira (*Manihot esculenta*) com 83.323 toneladas por ano, maxixe (*Cucumis anguria*) com 2.640,69 toneladas por ano, melancia (*Citrullus lanatus*) com 1.459 toneladas por ano, pepino (*Cucumis sativus*) com 2.866,18 toneladas por ano, pimenta de cheiro (*Capsicum baccatum*) com 3.220,29 toneladas por ano, pimentão (*Capsicum annuum*) com 4.818,68 toneladas por ano e tomate (*Solanum lycopersicum*) com 1.333,43 toneladas por ano (IDAM, 2022).

O uso de agrotóxicos é comum no Amazonas, sendo constatado que na microrregião de Manaus mais de 70% da produção de hortaliças utiliza esses produtos, e mais de 50% dos produtores rurais não recebem orientação técnica, o que pode ter impactos significativos na saúde humana e no meio ambiente (FRAXE *et al.*, 2020; WAICHMAN *et al.*, 2002).

A partir da hipótese de que é possível que exista ocorrência de resistência a fungicidas e diversidade de linhagens de *C. cassiicola* no Amazonas, esta pesquisa propõe traçar o perfil de resistência a fungicidas utilizados na agricultura do estado e caracterizar o fungo por meio de filogenia baseada na avaliação de sequências multilocus de DNA.

Para isto, avaliou-se a ocorrência de resistência de isolados de *C. cassiicola* obtidos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), pepino (*Cucumis sativus*) e mamoeiro (*Carica papaya*) oriundos de lavouras nos municípios de Iranduba, Manaus, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, em relação aos fungicidas Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol, por meio de ensaios de sensibilidade *in vitro*, e a eficiência dos fungicidas sobre isolados resistentes, por meio de ensaios *in vivo* em tomateiros, como descrito no Capítulo 1.

Concomitantemente, foi estudado o perfil genético dos isolados de *C. cassiicola* por meio da construção de filogenias a partir do sequenciamento das regiões genômicas rDNA ITS, CAA5, GA4 e ACT1, conforme apresentado no Capítulo 2.

Até este estudo, não há informações na literatura sobre a ocorrência de resistência aos fungicidas em isolados de *C. cassiicola* no Amazonas, tampouco sobre filogenias que revelam quais linhagens do patógeno predominam em áreas destinadas à produção agrícola. Desta forma, os resultados obtidos poderão colaborar para o desenvolvimento de programas de manejo efetivos e sustentáveis da mancha-alvo na produção agrícola do estado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O FUNGO *CORYNESPORA CASSIICOLA*

O fungo *Corynespora cassiicola*, é um fitopatógeno descrito em 70 países e afeta cerca de 419 espécies vegetais (FARR; ROSSMAN, 2023). Além disso, esse fungo também foi relatado como um patógeno emergente em seres humanos (CHUNG; LEE; YOU, 2018; FENG *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2022).

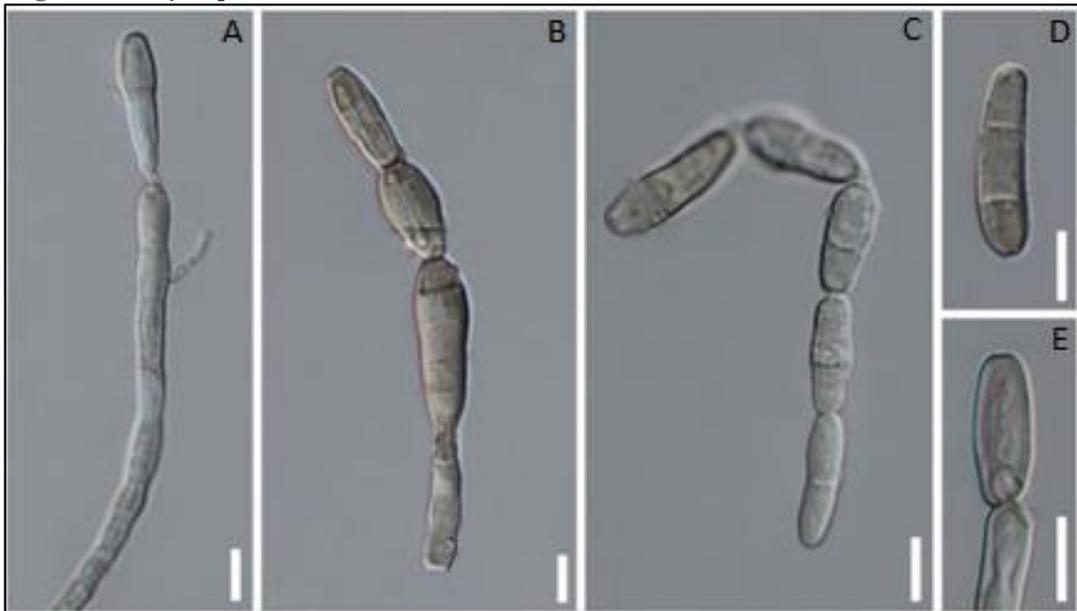
No início do século XX, há registros de infecção do feijão-caupi e da soja na China por um fungo que produzia conídios grandes e finos, de cor marrom oliváceo pálido (WEI, 1950). Na década de 1930, o fungo foi identificado como *Cercospora vignicola* Kawamura (TAI, 1936). Em 1944, uma espécie de *Helminthosporium* foi atribuída à desfolha do feijão-caupi no sudeste dos Estados Unidos (OLIVE; BAIN; LEFEBVRE, 1945). Desde a década de 1940, o agente causador da mancha alvo tem sido relatado como *Corynespora cassiicola* (Berk e M. A. Curtis) C.T. Wei. Em um estudo filogenético foi constatado que os indivíduos dos gêneros *Corynespora* e *Helminthosporium* são polifiléticos, ou seja, têm ancestrais diferentes (VOGLMAYR; JAKLITSCH, 2017).

Corynespora cassiicola pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Dothideomycetes*, ordem *Pleosporales*, família *Dematiaceae* e gênero *Corynespora* (CABI, c2023). É um fungo *haploide* que apresenta reprodução anamórfica, onde estruturas reprodutivas denominadas conídios (Figura 1) se desenvolvem a partir do ápice dos conidióforos, com um hábito de crescimento indeterminado que pode ramificar ou flexionar em pequena extensão (QI *et al.*, 2009).

Os conídios são de coloração parda, obclavados a subcilíndricos, retos a ligeiramente curvados, distoseptados (SOUZA *et al.*, 2009), com 4 a 20 pseudoseptos, medindo de 39 a 520 µm de comprimento por 7 a 22 µm de espessura (HARTMAN *et al.*, 1999). Os conidióforos (Figura 1) são distintamente obclavados a subcilíndricos, retos a ligeiramente curvados, com até vinte septos (SOUZA *et al.*, 2009), medindo de 44 µm a 350 µm de comprimento e de 4 µm a 11 µm de largura (HARTMAN *et al.*, 1999).

O micélio (Figura 2) é aéreo e cottonoso, e as colônias apresentam coloração variando entre hialina, cinza claro e cinza escuro. Em meio de cultura, a produção das estruturas reprodutivas é distinta das produzidas em condições naturais, sendo os conidióforos pouco distintos das hifas que os produzem. A produção de conídios ocorre frequentemente em cadeia, com bastante variação morfológica individual (REIS; BOITEAUX, 2007).

Figura 1 - *Corynespora cassiicola*



Fonte: Silva *et al.* (2021)

Nota: a), b) Conidióforos com conídios, c) Cadeia de conídios, d) e) Conídios. Escalas: c = 50 μ m, d-h = 10 μ m.

Figura 2 - Colônias de *Corynespora cassiicola* isolados de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) dez dias após o cultivo em meio de cultura batata dextrose-ágar



Fonte: De autoria própria (2022).

O fungo *C. cassiicola* é comum em diversas espécies de plantas em regiões de clima tropical e subtropical (DIXON *et al.*, 2009). Existem 2.854 registros de ocorrência deste fungo, dos quais 439 são georreferenciados (GBIF, 2023). A distribuição é predominantemente na zona intertropical do planeta (Figura 3).

Figura 3 - Ocorrência e distribuição geográfica global de populações de *Corynespora cassiicola*



Fonte: GBIF (2023).

A partir da década de 1980, começaram a ocorrer epidemias economicamente significativas da doença, como no caso do Sri Lanka em 1985. Na ocasião, aproximadamente 4.600 hectares de seringueira (*Hevea brasiliensis*) foram dizimados pela doença que afetou diretamente a produção de látex, que é de alta prioridade para a economia da Malásia (LIYANAGE *et al.*, 1986). Ainda após a epidemia, persistem surtos da doença (SAGAFF *et al.*, 2022).

O fungo *C. cassiicola* foi descrito inicialmente na cultura do tomate (*Solanum lycopersicum*) em Serra Leoa em 1936 (DEIGHTON, 1936), em 1972 nos Estados Unidos, no estado da Flórida (BLAZQUEZ, 1972), e em 1985 no Brasil, no estado do Amazonas (ALVES; LOURD; NODA, 1985).

Impactos na atividade agrícola decorrentes da mancha-alvo são recorrentes, como exemplificado na Flórida (EUA), onde *C. cassiicola* é o patógeno mais destrutivo de frutos e folhagens em plantios de tomateiro (DIXON *et al.*, 2009), devido a epidemias constantes. As áreas de cultivo na região ocupam aproximadamente 14 mil hectares e movimentam anualmente 437 milhões de dólares (MACKENZIE *et al.*, 2018).

No Brasil, *C. cassiicola* ocorre com frequência na cultura da soja (EDWARDS MOLINA *et al.*, 2022), constatado pela primeira vez na década de 1970 em plantações nas Regiões Sudeste e Sul (ALMEIDA *et al.*, 1976). Desde então, o fungo se disseminou para a região Centro-Norte do país (RIBEIRO *et al.*, 2017). No estado do Amazonas, a mancha-alvo foi registrada pela primeira vez na década de 1980 em mudas de seringueira no município de Manaus (GASPAROTTO *et al.*, 1985).

Corynespora cassiicola está relatado em dezenas de espécies de plantas hospedeiras no Brasil como acerola (CUTRIM; SILVA, 2003), algodoeiro (*Gossypium* L.) (GALBIERI *et al.*,

2014), cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) (DUARTE; ALBUQUERQUE; PRABHU, 1978), cafezeiro conilon (*Coffea canephora* L.) (SOUZA *et al.*, 2009), eucalipto benthamii (*Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage) (REIS *et al.*, 2014), eucalipto cidra (*Eucalyptus dunnii* Maiden) (REIS *et al.*, 2014), hortênsia (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) (TRINDADE *et al.*, 1999), mamoeiro (*Carica papaya* L.) (DUARTE; ASSANO; ALBUQUERQUE, 1983), maria preta (*Solanum americanum* Mill.) (PEREIRA; MAY-DE-MIO, 2019), mogno-africano (*Khaya ivorensis* A. Chev.) (VERZIGNASSI; POLTRONIERI; BENCHIMOL, 2009), pepino (*Cucumis sativus* L.) (VERZIGNASSI; VIDA; TESSMANN, 2003), puerária (*Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth.) (LISBOA *et al.*, 2016), tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (POLTRONIERI *et al.*, 1994), unha de gato (*Cryptostegia madagascariensis* Bojer) (SILVA *et al.*, 2018) e vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.) (POLTRONIERI *et al.*, 2012).

O fungo foi registrado em tomateiros no Amazonas na década de 1980 (ALVES; LOURD; NODA, 1985). Desde então, afeta várias espécies de solanáceas e cucurbitáceas no estado. No final da década de 1990, as áreas cultivadas com pepino, jerimum (*Cucurbita moschata* Poir.) e melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) eram expressivas, e os patógenos associados a estas espécies vegetais já causavam sérios problemas fitossanitários, resultando na redução de até 50% da área foliar no início da frutificação e perdas superiores a 70% na produção (CARDOSO; BOHER; GUIMARÃES, 2000).

A partir da década de 2000, foi relatada alta incidência e severidade de manchas foliares causadas por *C. cassiicola* em cultivos protegidos de pepino (*Cucumis sativus*) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*) nos municípios de Manaus, Iranduba e Silves, no Amazonas (REIS; MADEIRA, 2009).

A partir do início da década de 2010, foram descritas ocorrências de *C. cassiicola* afetando berinjela (*Solanum melongena* L.), pepino (*Cucumis sativus*), tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e mamoeiro (*Carica papaya*) cultivados nos municípios de Manaus, Presidente Figueiredo e Iranduba, no Amazonas, baseadas em amostras de folhas com sintomas típicos de mancha-alvo (BENTES *et al.*, 2018; FERREIRA; BENTES, 2017; SOUSA; BENTES, 2014).

2.2 PATOLOGIA, QUANTIFICAÇÃO DE DANOS E CONTROLE

Corynespora cassiicola é o agente etiológico da mancha-alvo, uma doença que afeta a parte aérea de diversas espécies de plantas de interesse econômico, incluindo hortaliças, frutíferas, ornamentais, florestais e plantas daninhas. O ciclo do patógeno é composto pelos

estádios primário e secundário. No estágio primário, o fungo se dissemina por meio de sementes e resíduos da colheita. No estágio secundário, a propagação ocorre por meio do vento e de sementes (MACKENZIE *et al.*, 2018; REIS; BOITEAUX, 2007).

O patógeno, transmitido pelas sementes, causa lesões primárias nos cotilédones e no hipocótilo das plântulas, onde são produzidos conídios que se dispersam pelo vento e infectam novas plantas. A disseminação também pode ocorrer por outros meios, como água da chuva e da irrigação. Os conídios, ao serem depositados na superfície de folhas, caules e frutos, germinam e fixam-se por meio de apressórios, emitindo tubos germinativos para iniciar a penetração direta através da superfície da epiderme, ocasionando na maioria das vezes lesões foliares circulares (MACKENZIE *et al.*, 2018).

A colonização bem-sucedida de tecidos vegetais requer o uso do repertório efetor pelo patógeno para modular a fisiologia da célula hospedeira e facilitar o processo de infecção. No genoma de *C. cassiicola*, estão presentes mais de 371 tipos de enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) da classe glicosídeo hidrolase (GH), responsáveis pela degradação da parede celular. Além disso, foram identificadas 6 cutinases e 56 lipases putativas que desempenham um papel na hidrólise de ácidos graxos e permitem a penetração na célula hospedeira. O patógeno também apresenta 652 proteases preditas com peptídeo sinal, envolvidas nos processos regulatórios de vários fatores de virulência. Estas proteases atuam na prevenção do reconhecimento pelo sistema imune e na desativação das respostas de defesa da planta hospedeira (DAL'SASSO *et al.*, 2021).

As condições ideais para o desenvolvimento do fungo são uma umidade relativa do ar superior a 80% e uma temperatura entre 20 °C e 30 °C (REIS; BOITEAUX, 2007). *C. cassiicola* é um parasita necrotrófico, ou seja, se alimenta de tecidos já mortos. Quando os tecidos do hospedeiro se esgotam, o fungo pode sobreviver na forma de clamidósporos por mais de uma safra, tanto no solo quanto em restos culturais (REIS; BOITEAUX, 2007).

Corynespora cassiicola possui populações com ampla diversidade genética que resulta em especificidade por diferentes hospedeiros (OLIVEIRA *et al.*, 2007; QI *et al.*, 2011; FERREIRA; BENTES, 2017). Essas populações variam em morfologia e grau de virulência. Ao longo do tempo podem evoluir para cepas mais agressivas (BANGUELA-CASTILLO *et al.*, 2020; DIXON *et al.*, 2009; SHIMOMOTO *et al.*, 2011; SUMABAT *et al.*, 2018a; SUMABAT *et al.*, 2018b).

Os sintomas da mancha-alvo podem variar entre os hospedeiros. No tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (Figura 4), observam-se pequenas manchas aquosas na superfície das folhas, que aumentam de tamanho e se tornam circulares, adquirindo uma coloração marrom clara, com

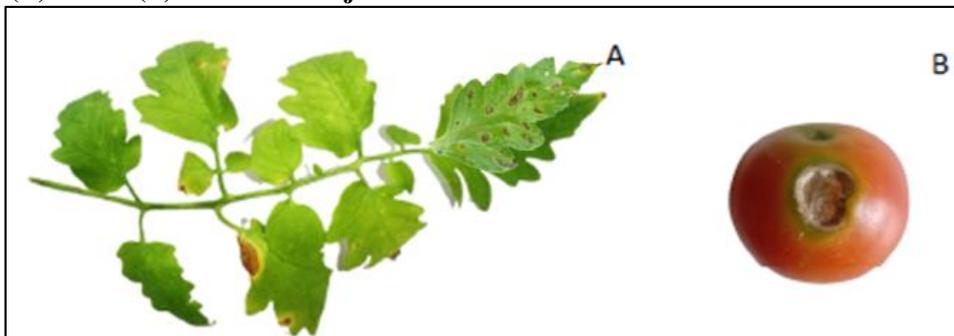
um halo clorótico ao redor, sem a formação de anéis concêntricos. Nos ramos e pecíolos, ocorrem manchas alongadas e amarronzadas. Nos frutos, podem surgir pontuações circulares e escuras, que aumentam de tamanho e se tornam marrons, com o centro mais claro, podendo causar rachaduras (REIS *et al.*, 2019).

O desenvolvimento da doença é rápido. No tomateiro, os primeiros sintomas podem surgir entre cinco e sete dias após a penetração do fungo (REIS; BOITEAUX, 2007). Em condições climáticas quentes e úmidas, como no caso do Amazonas, o problema da doença se agrava. Cerca de 15 dias após a infecção, a parte aérea da planta pode ser completamente destruída (REIS *et al.*, 2019).

No caso do pepino (*Cucumis sativus*), os sintomas da doença começam como pequenas manchas foliares angulares de cor clara que progridem para manchas redondas com um centro palha e um pequeno halo amarelado. À medida que a doença avança, as manchas se tornam maiores e arredondadas com o centro marrom claro e a borda verde-oliva encharcada (TERAMOTO *et al.*, 2011).

No mamoeiro (*Carica papaya*), o patógeno afeta principalmente as folhas e os pecíolos. As folhas mais velhas localizadas na parte inferior da copa são mais suscetíveis, as lesões se manifestam como manchas escuras e deprimidas nas hastes. Em estágios mais avançados da doença pode ocorrer o tombamento das plantas (VENTURINI *et al.*, 2014).

Figura 4 - Sintomas da mancha-alvo causada por *Corynespora cassicola* em folhas (A) e fruto (B) de tomate cereja



Fonte: De autoria própria (2022).

A quantificação dos danos é um aspecto fundamental na definição de estratégias de controle de doenças. Diferentes modelos são descritos na literatura, a maioria baseada na relação entre injúria e dano. Um dos parâmetros mais adequados para quantificar doenças foliares, como a mancha-alvo, é a severidade dos sintomas, estimada pela porcentagem de área foliar ou volume de tecido afetado pelos sintomas (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995).

Existem várias propostas para avaliar a severidade das doenças, como chaves descritivas e escalas diagramáticas. Essas ferramentas consistem em representações ilustradas de uma série de plantas, folhas ou partes de plantas com sintomas em diferentes níveis de severidade. Além disso, a contagem de lesões, seguida da medição do comprimento e largura das lesões para determinar a área afetada, é outro método amplamente utilizado (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996).

A representação da epidemia pode ser feita por meio da curva de progresso da doença, que consiste na plotagem gráfica da proporção da doença em relação ao tempo. A partir desta curva, é possível caracterizar as interações entre patógeno, hospedeiro e ambiente, e prever os níveis futuros da doença (CAMPBELL *et al.*, 1990).

A Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) é um parâmetro quantitativo derivado da curva de progresso da doença, que permite a comparação de epidemias por meio de um valor numérico absoluto, calculado por meio da área trapezoidal. Esta medida é importante para avaliar as perdas na produção e a epidemiologia de doenças cíclicas (CAMPBELL *et al.*, 1990).

As estratégias de controle fitossanitário de *C. cassiicola* envolvem o uso de variedades resistentes, tratamento de sementes, rotação e sucessão de culturas e o controle químico. O controle químico é uma das principais abordagens porque é importante conhecer o modo e mecanismo de ação dos fungicidas aplicados, bem como a tecnologia de aplicação, o momento e o intervalo entre as aplicações, a fim de aumentar a eficiência no controle do fungo (REIS *et al.*, 2019).

Diversos estudos demonstram a eficácia de diferentes classes de fungicidas no controle de *C. cassiicola*. Isto inclui os inibidores da biossíntese de esteróis (SBI's), inibidores externos de quinona (QoI's), inibidores de succinato desidrogenase (SDHI's), metil benzimidazol carbamatos (MBC), fenilpirróis, dicarboxamidas e benzotiadiazol (BTH) (JI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2020; PERNEZNY *et al.*, 2003; QI *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2008; TERAMOTO *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2000).

Existem registros de fungicidas para o controle de *C. cassiicola* exclusivamente nas culturas de soja (124 fungicidas), algodão (12 fungicidas) e acerola (2 fungicidas) (SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, 2023). Portanto, em alguns casos, o controle químico da doença em outras culturas afetadas pelo fungo é realizado com o uso de fungicidas disponíveis no mercado, que podem não estar entre as opções recomendadas (RIBEIRO *et al.*, 2017). Algumas práticas culturais podem ser usadas para o controle de *C. cassiicola* em cultivos em ambiente tropical, como podas, plantio de cultivares resistentes e

manejo da iluminação (BEZERRA; BENTES, 2015; COELHO NETTO *et al.*, 2012; FERREIRA; BENTES, 2017; PAIXÃO; MACEDO; COELHO NETTO, 2018). Desta forma, as estratégias devem ser utilizadas de forma organizada, com viabilidade econômica, e inseridas nas bases do Manejo Integrado de Doenças.

Entre as opções de controle alternativo para *C. cassicola*, estão o uso de microrganismos antagonistas e substâncias naturais derivadas da biodiversidade. As opções incluem extratos proteicos de sementes de leguminosas, fungos antagonistas, bactérias antagonistas, íons de prata e inativação fotodinâmica. Estas abordagens são exploradas como alternativas viáveis ao controle químico convencional (AMARAL; FERREIRA; BENTES, 2022; ALMEIDA *et al.*, 2021; BARIANI *et al.*, 2012; CANIATO *et al.*, 2020; FENG *et al.*, 2023; GWINNER *et al.*, 2022; MONTEIRO *et al.*, 2023; RAI; SOLANKI, 2023; SAULLE *et al.*, 2023).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGICIDAS

O controle químico de pragas é amplamente empregado na agricultura moderna, predominante no modelo de produção adotado no Brasil, que abrange uma extensa área de 351 milhões de hectares de estabelecimentos agropecuários (IBGE, 2017). Neste contexto, o uso de agrotóxicos apresenta um aumento significativo devido à demanda crescente. Os agrotóxicos são produtos químicos utilizados para combater uma variedade de agentes nocivos às plantas e animais, como insetos, ácaros, fungos, carrapatos, ervas daninhas, entre outros. Seguindo a classificação quanto ao alvo de ação, estes produtos são categorizados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, acaricidas, desfolhantes, entre outras categorias (SAVARY *et al.*, 2019).

O consumo destes produtos totaliza aproximadamente 4 milhões de toneladas no mundo, com 53% destinados à Ásia, 30% à América, 14% à Europa, 2% à África e 1% à Oceania (FAO, 2022). O Brasil concentra 86% do consumo total do continente americano, correspondendo a 899 milhões de litros anualmente nas lavouras (PIGNATI *et al.*, 2017).

A classificação dos fungicidas se baseia em fatores como grupo químico, princípio de controle e mobilidade na planta. Quanto ao grupo químico, os fungicidas podem ser classificados como inorgânicos e orgânicos. Os primeiros foram desenvolvidos utilizando componentes como enxofre, cobre, estanho, cádmio e mercúrio. Já os fungicidas orgânicos podem ser divididos em cerca de 50 grupos químicos, como estrobirulinas, benzimidazóis,

triazóis, entre outros. Cada grupo pode conter um ou mais ingredientes ativos (STEVENSON; MCGRATH; WYENANDT, 2019).

A classificação dos fungicidas baseada no princípio de controle é dividida em três principais categorias: protetores, curativos e erradicantes (ISHII; HOLLLOMAN, 2015). Os fungicidas protetores formam uma barreira química na superfície da planta, agindo antes da penetração do fungo, visam prevenir a infecção e a disseminação do patógeno. Entretanto, os fungicidas curativos penetram na planta e atenuam os danos causados pelo patógeno. São aplicados após a infecção, buscando controlar o avanço da doença. Todavia, os fungicidas erradicantes atuam diretamente sobre o patógeno em sua fonte de inóculo, eliminando-o.

A classificação dos fungicidas de acordo com sua mobilidade na planta possui três categorias principais: não sistêmicos ou de contato, sistêmicos ou móveis, e mesossistêmicos ou translaminar. Os fungicidas não sistêmicos, também conhecidos como de contato, formam uma barreira química na parte externa do tecido vegetal, proporcionando proteção contra a infecção, mas não se movem internamente na planta. Os fungicidas sistêmicos ou móveis possuem a capacidade de se translocar por meio do sistema vascular da planta, permitindo que se desloquem para outras partes não diretamente tratadas, oferecendo proteção sistêmica contra os fungos. Os fungicidas mesossistêmicos ou translaminar se translocam internamente no limbo foliar da planta, sem atingir o sistema vascular, possibilitando sua movimentação entre as camadas de tecido foliar e alcançando áreas onde a aplicação direta pode ser desafiadora (ISHII; HOLLLOMAN, 2015).

Conforme o Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas (FRAC), os fungicidas são classificados em grupos químicos com base no seu modo de ação no metabolismo do fungo alvo. Estes modos de ação podem envolver a interferência na respiração celular, síntese de substâncias, inibição de enzimas, entre outros processos (FRAC, 2021). A seguir, são descritas as características de alguns dos principais fungicidas sistêmicos utilizados no controle da mancha-alvo.

A Azoxistrobina, do grupo químico das estrobilurinas, atua inibindo a respiração mitocondrial nos fungos. Esta se liga à proteína citocromo bc1 e bloqueia a transferência de elétrons no complexo III da cadeia respiratória, prejudicando a produção de ATP, que é a principal fonte de energia para as células fúngicas (FRAC, 2021).

A Boscalida, pertencente ao grupo químico das carboxamidas, atua inibindo a síntese da enzima succinato desidrogenase (SDH) nas mitocôndrias dos fungos. A SDH é essencial para a produção de energia nas células fúngicas, a inibição resulta na interrupção do metabolismo energético, comprometendo a sobrevivência do fungo (FRAC, 2021).

O Carbendazim, do grupo químico dos benzimidazóis, age inibindo a divisão celular dos fungos. Interfere na formação do fuso mitótico durante a mitose, impedindo a separação dos cromossomos e consequente divisão celular (FRAC, 2021).

O Tebuconazol é um fungicida sistêmico, pertencente ao grupo químico dos triazóis. Este atua inibindo a biossíntese do ergosterol, componente essencial da membrana celular dos fungos. Esta inibição leva à desestabilização da membrana celular, resultando na morte do fungo (FRAC, 2021).

As características desejáveis de um fungicida são: não ser tóxico aos humanos, animais, plantas, microrganismos e benéficos ao meio ambiente; capacidade de aderir ao tecido vegetal; resistência às intempéries; efetividade mesmo em regiões da planta em que não foi aplicado diretamente; compatibilidade para aplicação simultânea com outras moléculas químicas; atividade por um período prolongado; facilidade de preparo e aplicação sem ocorrência de precipitação e sedimentação; não corrosivo aos equipamentos de aplicação; especificidade para o organismo-alvo; e letalidade em baixas concentrações (RIBEIRO *et al.*, 2008).

A propriedade do fungicida ser letal ao patógeno em baixas concentrações é denominada fungitoxidade. O parâmetro $EC_{50\%}$ (concentração efetiva que promove a inibição de 50% do desenvolvimento dos microrganismos), proposto por Edgington, Khew e Barron (1971), define a fungitoxidade de uma substância química, e considera que os fungicidas que apresentam $EC_{50\%}$ menor que $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ são altamente fungitóxicos, entre $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ são moderadamente fungitóxicos, e maior que $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ são não fungitóxicos.

2.4 RESISTÊNCIA DE FUNGOS A FUNGICIDAS

A resistência é uma adaptação estável e hereditária do fungo a um determinado fungicida, com um modo de ação específico, em uma concentração que anteriormente era eficaz, mas devido à perda de sensibilidade do fungo ao princípio ativo, torna-se ineficaz no controle das doenças. Todas as populações de fungos contêm indivíduos naturalmente capazes de sobreviver à aplicação de um fungicida, mas ao longo do tempo e de sucessivas aplicações do mesmo produto, ocorre uma pressão de seleção dos indivíduos resistentes que se tornam a maioria na população (CORKLEY; FRAAIJE; HAWKINS, 2022).

A resistência depende de três fatores principais. O primeiro fator está relacionado aos fungos e a capacidade reprodutiva e variabilidade genética que os torna mais propensos a se adaptarem a novos fungicidas por meio de mutações no genoma. O segundo fator está relacionado ao fungicida e seu modo de ação específico. Quanto mais específica for a afinidade

entre o fungicida e o fungo, maior será o favorecimento de determinados genes em relação a outros, resultando no fenômeno chamado de pressão de seleção. O terceiro fator é influenciado pelas variações das condições ambientais, como umidade e temperatura, e pelo manejo incorreto dos fungicidas, incluindo práticas de aplicação, dosagem, intervalo e número de aplicações irregulares (DALLAGNOL *et al.*, 2018).

Existem diferentes tipos de resistência dos fungos a fungicidas, incluindo a resistência cruzada, múltipla, qualitativa e quantitativa. Na resistência cruzada, o patógeno adquire resistência a dois ou mais fungicidas com o mesmo mecanismo de ação ou similaridade química, conferida pelo mesmo fator genético. Na resistência múltipla, o patógeno apresenta mecanismos de resistência separados para dois ou mais fungicidas de grupos químicos diferentes. Na resistência qualitativa, ocorre uma perda repentina, marcante e irreversível da efetividade do fungicida. Já na resistência quantitativa, a resistência é passível de reversão (REIS *et al.*, 2019).

Os mecanismos de resistência estão relacionados à capacidade de seleção de linhagens resistentes do patógeno. Isso pode ser aumentado nos casos de aplicação repetida de fungicidas quimicamente relacionados, aplicação contínua do mesmo produto em concentrações subletais e aplicação em áreas isoladas em que não há competição entre diferentes linhagens dos organismos. Os mecanismos responsáveis pela resistência estão relacionados aos processos metabólicos do fungo (CARMONA *et al.*, 2017).

Entre os mecanismos de resistência, estão a redução da permeabilidade da membrana celular do fungo que impede que o fungicida atinja seu sítio de ação; a desintoxicação que ocorre por modificações na molécula do fungicida, resultando na perda da sua ação após a entrada na célula-alvo; a alteração bioquímica do sítio-alvo em que o fungicida atinge o local de ação, mas não é metabolizado pelo organismo; e a utilização de vias metabólicas alternativas quando o fungo altera seu metabolismo para contornar o bloqueio causado pelo fungicida em uma via metabólica específica (LEITE; LOPES, 2018; SHAO; ZHAO; MA, 2021).

O monitoramento da sensibilidade aos fungicidas é essencial para determinar a presença de populações de fungos resistentes no campo e avaliar a eficácia dos regimes de tratamento antimicrobiano, garantindo o controle eficaz das doenças (SIAH *et al.*, 2014). Para a indústria de fungicidas, é importante avaliar o risco de resistência, pois pode levar a uma falha ou declínio significativo no controle das doenças no setor comercial. Isto afetará a seleção e o lançamento de novos produtos no mercado e o uso de estratégias que garantam a eficiência a longo prazo (GHINI; KIMATI, 2000).

O nível de resistência aos fungicidas pode ser determinado por meio de ensaios de laboratório e campo, em que um grupo de fungos é exposto ao fungicida e os efeitos biológicos resultantes da exposição são avaliados. Esta resposta é medida por meio da inibição do crescimento micelial *in vitro* ou pela gravidade da doença em plantas *in vivo* (DAMICONE; SMITH, 2019).

A resistência aos fungicidas em populações de *C. cassiicola* é relatada no Brasil e em diversos países, com perda de eficiência em campo de produtos com diferentes princípios ativos contra patógenos fúngicos. Foram relatadas grandes possibilidades de desenvolvimento de resistência aos fungicidas Carbendazim, pyrimethanil e Azoxistrobina em isolados de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e pepino (*Cucumis sativus*) no Brasil (AGUIAR; VALLAD; REIS, 2016). Estudos mostraram sensibilidade diferenciada de *C. cassiicola* aos fungicidas dos grupos benzimidazol, carboxamidas, triazol e estrobirulina, além de alto risco de seleção para resistência em avaliações *in vitro* de fungos isolados de cultivares de soja (*Glycine max*) (TERAMOTO *et al.*, 2017). Foi constatada uma alta frequência de isolados de *C. cassiicola* em soja (*Glycine max*) resistentes ao Carbendazim e prothioconazol (XAVIER *et al.*, 2021).

O mecanismo molecular da resistência de *C. cassiicola* foi estudado em diversas pesquisas. No caso do fungicida Azoxistrobina, foram detectadas mutações no gene do citocromo b, que codifica a proteína alvo do fungicida, como a mutação G143A, encontrada em isolados do fungo provenientes do fruto do pepino (*Cucumis sativus*) e da folha da berinjela (*Solanum melongena*) (ISHII *et al.*, 2007). Resistência à Boscalida foi detectada em isolados de *C. cassiicola* oriundos de frutos de pepino (*Cucumis sativus*) conservados em geladeiras de estabelecimentos comerciais no Japão. Estes isolados apresentaram uma mutação no gene SdhB, que codifica uma subunidade da enzima da succinato desidrogenase (SDH), resultando na substituição de histidina por tirosina na posição do aminoácido B-H278Y (MIYAMOTO *et al.*, 2009).

Em populações de fungos de *C. cassiicola* encontrados na soja brasileira, foram identificadas mutações nos genes da β -tubulina, conferindo resistência aos fungicidas do grupo das estrobirulinas, e mutações nos genes *sdhB* e *sdhC*, proporcionando menor sensibilidade do fungo a carboxamidas (GODOY *et al.*, 2020).

2.5 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *C. CASSIICOLA*

O potencial evolutivo dos seres vivos está intimamente relacionado ao grau de recombinação gênica. Os organismos de reprodução sexuada rapidamente adquirem novas

combinações de alelos, resultando em muitos genótipos diferentes na população. Em contraste, organismos com reprodução assexuada tendem a manter a combinação de genes existente, resultando em uma diversidade genotípica na população mais limitada (TACK *et al.*, 2012).

Entretanto, a reprodução assexuada apresenta vantagens para os fungos fitopatogênicos, pois estes tendem a produzir linhagens clonais nas quais blocos de alelos conectados formam um complexo de genes coadaptados que permanecem conectados e podem ser amplamente disseminados (MCDONALD; LINDE, 2002).

De qualquer forma, alta diversidade genética do fungo *C. cassiicola* é verificada em diversos estudos, que pode estar relacionado com a variação oriunda principalmente da acumulação de mutações espontâneas favorecidas por diversos ambientes de cultivo, predominância de cultivares suscetíveis, e elevada exposição a determinados grupos químicos de fungicidas (SOARES *et al.*, 2012; TAYLOR; JACOBSON; FISHER, 1999).

C. cassiicola apresenta diferentes manifestações em diferentes plantas hospedeiras, resultantes de uma interação complexa entre fatores ambientais e genéticos, tanto do hospedeiro quanto do patógeno. É possível que a diversidade genética entre populações de *C. cassiicola* possa afetar a eficácia de controle com utilização de agrotóxicos e de cultivares resistentes. Portanto, torna-se necessário identificar informações sobre a estrutura genética e os mecanismos de especiação das populações deste fungo (SOARES; ARIAS, 2020).

Os fungos diferem quanto à capacidade de se desenvolver em diferentes condições ecológicas, resultando em mudanças na amplitude genética que representam as estratégias adaptativas desses organismos, que podem variar de acordo com as condições ambientais, o tipo de hospedeiro e os padrões de distribuição geográfica (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019).

Neste sentido, a identificação molecular das espécies fúngicas é essencial para compreender as relações patógeno-hospedeiro, realizar o correto diagnóstico e desenvolver estratégias de controle de doenças eficazes em várias espécies de plantas, incluindo culturas economicamente importantes. Isto ocorre porque a classificação taxonômica baseada estritamente em aspectos morfológicos pode ser avaliada de forma subjetiva e sofrer influências ambientais, impossibilitando a detecção confiável de polimorfismos entre os organismos (BHANDARI *et al.*, 2017; DEMARTELAERE *et al.*, 2020).

O estudo molecular baseado no sequenciamento de informações do DNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é aplicado desde a década de 1990 em populações de *C. cassiicola* (BANGUELA-CASTILO *et al.*, 2020; BENTES *et al.*, 2018; DIXON *et al.*, 2009; KURT, 2005; NGHIA *et al.*, 2008; QI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 1995; SILVA; DEVERALL;

LYON, 1998; SILVA *et al.*, 2003; SHIMOMOTO *et al.*, 2011; SHRESTHA; LAMOUR; YOUNG-KELLY, 2017; WU *et al.*, 2018).

Uma das grandes vantagens da PCR é permitir o estudo de regiões genômicas específicas do DNA, em vez de analisar todo o genoma do organismo, o que seria mais oneroso e demorado. Os genes estão localizados nos cromossomos e ocupam uma posição bem definida nesta estrutura, sendo chamada "*locus*" a posição fixa e específica em um cromossomo onde determinado gene ou marcador genético está localizado. Cada cromossomo contém muitos genes e cada gene ocupa um *locus* diferente (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016).

As diferentes sequências de nucleotídeos que podem ser encontradas no mesmo *locus* são chamadas de formas alélicas. Mediante estudos em populações, demonstra-se que raramente existe uma única forma alélica para cada *locus*, sendo esperados polimorfismos, ou seja, várias formas alélicas estão presentes quando se analisa a sequência de nucleotídeos que caracteriza um determinado gene. O genótipo é a composição genética formada pelo conjunto de alelos herdados que determinam uma característica de um organismo. Quando um genótipo possui duas ou mais variações, conclui-se que o respectivo *locus* gênico pode ser ocupado por diferentes alelos (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016).

Um dos *loci* genômicos mais estudados em fungos é a região rDNA ITS, que está localizada nas posições 18S e 5.8S (ITS1) e 5.8S e 28S (ITS2). Enquanto as regiões dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro da espécie, a região rDNA ITS evolui mais rapidamente e pode variar na sequência de bases e no comprimento entre espécies, sendo frequentemente usada na classificação taxonômica de espécies e gêneros de fungos (MENEZES *et al.*, 2010).

A região rDNA ITS possui características interessantes para a identificação molecular. Uma destas é que, nos fungos, a região compreende entre 600 e 800 pares de bases (pb) que, quando amplificadas, são complementares às sequências altamente conservadas dos genes que codificam o rRNA. Outra característica importante se deve à natureza repetitiva do rDNA, o que torna esta região fácil de amplificar a partir de amostras pequenas, diluídas e altamente degradadas (GARDES; BRUNS, 1993). Os *primers* universais ITS1 e ITS4 são os mais comumente utilizados na amplificação desta região (WHITE *et al.*, 1990).

Apesar da região rDNA ITS ser amplamente empregada para a identificação molecular de fungos, sugere-se o sequenciamento de outros *loci* mais variáveis que permitam a visualização de relações filogenéticas mais profundas, possibilitando o agrupamento de variedades de diferentes genótipos dentro da espécie (DIXON *et al.*, 2009).

As análises moleculares do fungo *C. cassiicola* estão descritas na literatura a partir da combinação de *loci* genômicos que possuem polimorfismos de restrição de nucleotídeos preservados entre as mesmas linhagens genéticas. Isto inclui o espaçador transcrito interno do DNA ribossômico (rDNA ITS), dois *loci* aleatórios hipervariáveis (CAA5 e GA4), um *locus* codificador de actina-1 (ACT1), além das regiões parciais do gene β -tubulina e do fator de alongamento 1- α (EF-1 α) (AGUIAR *et al.*, 2022; BANGUELA-CASTILLO *et al.*, 2020; DÉON *et al.*, 2014; DIXON *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2022; RONDON; LAWRENCE, 2019; SHIMOMOTO *et al.*, 2011; SHUIB *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2022).

2.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *C. CASSIICOLA*

A diversidade inferida, a partir de análise filogenética, é um modelo de medida que incorpora as relações das espécies pelo princípio de que há maior diversidade em uma comunidade em que as espécies são filogeneticamente diferentes, com relação direta entre a proximidade filogenética, história evolutiva e similaridade ecológica (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019).

A primeira proposta para medir a diversidade filogenética é o Índice de Diversidade Filogenética (FAITH, 1992), expresso pela razão do número de espécies e as diferenças filogenéticas. Esta permite definir agrupamentos de táxons distintos por meio da amplitude filogenética das associações obtidas em representações gráficas denominadas árvores filogenéticas.

Filogenias traçam padrões de ancestralidade compartilhados entre linhagens filogenéticas (LFs). Cada LF carrega uma parte da história evolutiva única determinante nas características genotípicas do agrupamento de organismos que compõem as distintas linhagens de uma filogenia. Existe diferença significativa na patogenicidade e agressividade de *C. cassiicola* entre as populações ou linhagens de diferentes hospedeiros, dando suporte às diferenças nas populações emergentes com base no hospedeiro de origem (JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

Dixon *et al.* (2009) apresentaram a primeira filogenia robusta de *C. cassiicola* usando 143 isolados do fungo oriundos de diferentes locais no planeta. Com base nos polimorfismos de nucleotídeos nos *loci* rDNA ITS, GA4, CAA5 e ACT1, definiram seis linhagens filogenéticas (LFs) para o fungo e três haplótipos distintos conforme duas mutações nos pares de bases 158 e 278 da região ITS do rDNA, sendo: LF1 com mutações T e G; LF4 com mutações C e A; e LFs 2, 3, 5 e 6 com mutações C e G nos respectivos pares de bases,

correlacionadas com o hospedeiro de origem, patogenicidade e taxa de crescimento, mas não com a localização geográfica, indicando alta dispersão do fungo e diferentes perfis genéticos de patogenicidade.

Mais esforços baseados em análises filogenéticas definiram, seis variações de classes da toxina cassicolina (cas1-cas6), uma glicoproteína que atua como um efector fitotóxico e medeia os perfis de patogenicidade do fungo, com base nas regiões rDNA ITS, GA4, CAA5 e ACT1 e relacionadas às seis linhagens filogenéticas de *C. cassicola*, sendo a classe cas1 exclusivamente composta por fungos isolados de seringueira. Neste caso, o estudo contribuiu para compreender o mecanismo de ação acerca da fitotoxicidade de *C. cassicola* (DÉON *et al.*, 2014).

Outra análise filogenética de *C. cassicola*, baseada em dados de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), propôs a existência de oito genótipos do fungo e indicou a prevalência de um único genótipo virulento para algodão (SHRESTHA; LAMOUR; YOUNG-KELLY, 2017). Confirmou, também, em uma pesquisa posterior que realizou a genotipagem de isolados de *C. cassicola* através de marcadores microssatélites (SUMABAT *et al.*, 2018a).

Bentes *et al.* (2018), ao analisar a variabilidade genética de isolados de *C. cassicola* isolados de tomateiro, pepino e mamoeiro oriundos de lavouras dos municípios amazonenses de Iranduba, Manaus, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, usando marcadores moleculares AFLP, identificaram sete genótipos do fungo, sendo que os isolados de mamoeiro, pepino e do tomateiro foram agrupados em clados distintos na árvore filogenética, indicando que há variação significativa de genótipos do fungo relacionados à especificidade do hospedeiro (BENTES *et al.*, 2018).

Banguela-Castillo *et al.* (2020) publicaram uma atualização da classificação de *C. cassicola* com base nas regiões genômicas GA4 e CAA5 e delinearam oito linhagens filogenéticas do fungo relacionadas às LF's descritas por Dixon *et al.* (2009). Ao considerar a origem do hospedeiro dos isolados, verificaram que os isolados de *C. cassicola* agrupados em LF1 e LF2 são virulentos em mamoeiro (*Carica papaya*), pepino (*Cucumis sativus*), algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) e soja (*Glycine max*); os isolados distribuídos em LF3 e LF4 são virulentos em tomateiro (*Solanum lycopersicum*); e os isolados distribuídos em LF7 e LF8 são virulentos em seringueira (*Hevea brasiliensis*), sugerindo uma correspondência clara entre polimorfismos de restrição nos genes GA4 e CAA5 e as linhagens filogenéticas nas quais podem ser classificadas as diversidades genotípicas de *C. cassicola*.

Outro estudo revelou três LFs baseadas nas informações das regiões rDNA ITS, fator de alongação 1-alpha (*tef-1 α*) e β -tubulina (*tub2*). Deste modo, LF1 é composta

predominantemente por fungos isolados de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), pervinca rosa (*Catharanthus roseus* L. G Don.) e acerola (*Malpighia glabra* L.) da Flórida e Brasil; LF2 é o maior grupo composto predominantemente por fungos isolados de zinnia (*Zinnia elegans* L.), soja (*Glycine max*), pepino (*Cucumis sativus*), abóbora (*Curcubita máxima* L.), repolho (*Brassica oleracea* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), gergelim (*Sesamum indicum* L.) e melão (*Cucumis melo* L.) do Brasil; e LF3 é composto por fungos isolados de diversas plantas daninhas tropicais do Brasil (AGUIAR *et al.*, 2022).

A correlação filogenética entre os isolados de *C. cassicola* nos estudos de Dixon *et al.* (2009), e outros estudos posteriores, indica uma rede de correlação global entre diferentes populações. No entanto, são necessárias mais pesquisas para compreender completamente esta rede e suas implicações para o manejo de doenças em plantas hospedeiras.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F. M. *et al.* Phylogenetic network analysis of South and North American *Corynespora cassiicola* isolates from tomato, cucumber, and novel hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 163, n. 3, p. 657-671, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02505-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-022-02505-x>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- AGUIAR, F. M.; VALLAD, G. E.; REIS, A. In vitro sensitivity to fungicides of *Corynespora cassiicola* isolates from different hosts and geographic regions from Brazil. *In: International Symposium on Tomato Diseases: Perspectives and Future Directions in Tomato Protection* 1207. 5. p. 233-240. 2016. Doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1207.32. Disponível em: https://www.actahort.org/books/1207/1207_32.htm. Acesso em: 17 ago. 2023.
- ALMEIDA, A. F. de *et al.* Síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por *Fusarium concolor* e a inibição de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 47, n. 1, p. 9-15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/235097> .Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/6LPsBrNdNHRBNqYB6FWqLYR/>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- ALMEIDA, A. M. R. *et al.* Ocorrência de *Corynespora cassiicola* (Berk. e Curt.) Wei no Estado de Sao Paulo [fungo, *Glycine max*, Brasil]. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 111-112, jun. 1976.
- ALVES, M. L. B.; LOURD, M.; NODA, H. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* em caráter epidêmico em tomates de Manaus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 229, 1985.
- AMARAL, A. de O.; FERREIRA, A. F. T. A. F.; BENTES, J. L. da S. Fungal endophytic community associated with *Hevea* spp.: diversity, enzymatic activity, and biocontrol potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 857-872, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-022-00709-1>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., REZENDE, J. A. M (edit.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. v. 1, ed. 5. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018.
- BANGUELA-CASTILLO, A. *et al.* An updated phylogenetic classification of *Corynespora cassiicola* isolates and a practical approach to their identification based on the nucleotide polymorphisms at the *ga4* and *caa5* loci. **Mycologia**, v. 112, n. 1, p. 24-38, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1670018>. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/211338/1/Castillo-An-Updated.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- BARIANI, A. *et al.* Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v. 38, p. 131-138, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052012000200004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/cHgLmdjrCcFkyFZsYmfPzNs/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- BENTES, J. L. da S. *et al.* Variabilidade genética de *Corynespora cassiicola* isolados do Amazonas, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1590/1808-1657000992017>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/aib/a/WCTbLB7CZwn6jwTfkPpLRM/abstract/?lang=pt>. Acesso em:
 17 ago. 2023.

BERGAMIN FILHO, A. *et al.* Avaliação de danos causados por doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 3, p. 133-84, 1995.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres, 1996.

BEZERRA, E. de J. da S.; BENTES, J. L. da S. Reação de híbridos de pepino a *Corynespora cassiicola* no Amazonas. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 71-72, 2015. DOI:
<https://doi.org/10.1590/0100-5405/2016>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/sp/a/JV65jWGtbrCmzTfP5jKQghF/?lang=pt#>. Acesso em: 17 ago. 2023.

BHANDARI, H. R. *et al.* Assessment of genetic diversity in crop plants-an overview. **Adv. Plants Agric. Res**, v. 7, n. 3, p. 276-286, 2017. DOI: 10.15406/apar.2017.07.00255.
 Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Arbind-Choudhary-3/post/Can_we_use_morphological_markers_to_visualise_population_structure_in_palnts/attachment/6092c6683164270001d8921a/AS%3A1020140195950610%401620231784613/download/APAR-07-00255.pdf. Acesso em: 17 ago. 2023.

BLAZQUEZ, C. H. **Target sport of tomato**. [S. l]: [s. n.], 1972.

CAMPBELL, C. L. *et al.* **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley e Sons, 1990.

CANIATO, M. M. *et al.* Diversity of bacterial strains in biochar-enhanced Amazon soil and their potential for growth promotion and biological disease control in tomato. **Acta Amazonica**, v. 50, p. 278-288, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201901072>.
 Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aa/a/6NpSSk34kYT3rpHQNcxBGZM/#>. Acesso em: 17 ago. 2023.

CARDOSO, M. O.; BOHER, B.; GUIMARÃES, L. A. Patógenos associados as cucurbitáceas cultivadas no Estado do Amazonas. **Hortic. bras.**, v. 18, 2000, Suplemento Julho. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1139020/1/CBO40p428.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

CARMONA, M. *et al.* In vitro sensitivity assessment of late season soybean pathogens to fungicide mixtures. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0244-7>. Disponível:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s13314-017-0244-7>. Acesso em: 17 ago. 2023.

CENTRE FOR AGRICULTURE AND BIOSCIENCE INTERNATIONAL (CABI). Invasive species compendium: detailed coverage of invasive species threatening livelihoods and the environment worldwide. **CABI Compendium**, c2023. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/product/qi>. Acesso em: 17 ago. 2023

CHUNG, S.; LEE, H; YOU, I. Fungal keratitis caused by *Corynespora cassiicola*, a plant pathogen. **Journal of Mycology and Infection**, v. 23, n. 1, p. 24-26, 2018. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/wpr-917907>. Acesso em: 17 ago. 2023.

COELHO NETTO, R. A. *et al.* Avaliação de práticas de manejo da mancha-de-Corynespora na cultura do tomate. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 185-190, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000300004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/tpp/a/PRCHQKry3cdLtsGMJVjw5pP/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 13 abr. 2023.

CORKLEY, I.; FRAAIJE, B.; HAWKINS, N. Fungicide resistance management: maximizing the effective life of plant protection products. **Plant Pathology**, v. 71, n. 1, p. 150-169, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13467>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.13467>. Acesso em: 17 ago. 2023.

CUTRIM, F. A.; SILVA, G. S. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 193-194, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000200014>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/fb/a/drBD5mGJXdCZ7k5p6QrHYrC/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2023.

DAL'SASSO, T. C. da S. *et al.* Genome sequences and in silico effector mining of *Corynespora cassiicola* CC_29 and *Corynespora olivacea* CBS 114450. **Archives of Microbiology**, p. 1-9, 2021. DOI: 10.1007/s00203-021-02456-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34213598/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

DALLAGNOL, L. J. *et al.* **Resistência genética: de plantas a patógenos**. 1. ed. Pelotas: Editora UFPel, 2018. 437 p. v. 1.

DEIGHTON, F. C. Preliminary list of fungi and diseases of plants in Sierra Leone. **Bulletin of Miscellaneous Information**. Royal Botanic Gardens, Kew, v. 1936, n. 7, p. 397-424, 1936. DOI: <https://doi.org/10.2307/4111838>. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/4111838>. Acesso em: 17 ago. 2023.

DEMARTELAERE, A. C. F. *et al.* Aspectos morfofisiológicos, variabilidade genética e controle alternativo da *Alternaria alternata* f. sp. citri em tangerineira 'Dancy'. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 90621-90646, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n11-465>. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/20269>. Acesso em: 17 ago. 2023.

DÉON, M. *et al.* Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. *Fungal biology*, v. 118, n. 1, p. 32-47, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.10.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878614613001530>. Acesso em: 17 ago. 2023.

DIXON, L. J. *et al.* Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1015-1027, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-9->

1015. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-99-9-1015>. Acesso em: 17 ago. 2023.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; PRABHU, A. S. Uma nova enfermidade foliar do cacau (Theobroma cacao L.) causada pelo fungo *Corynespora cassicola* (Berk e Curt Wei). **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 259-265, 1978. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/222683/1/Uma-nova-enfermidade-foliar.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

DUARTE, M. L. R.; ASANO, S.; ALBUQUERQUE, F. C. Estudo comparativo das características morfológicas e fisiológicas de dois isolamentos de *Corynespora cassicola*. **Fitopatologia brasileira**, v. 8, p. 206-214, 1983. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/222596/1/Estudo-comparativo-das-caracteristicas.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

EDGINGTON, L.Y.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42-44, jan. 1971. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1971Articles/Phyto61n01_42.pdf. Acesso em: 17 ago. 2023.

EDWARDS MOLINA, J. P. *et al.* Effect of target spot on soybean yield and factors affecting this relationship. **Plant Pathology**, v. 68, n. 1, p. 107-115, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12944>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12944>. Acesso em: 17 ago. 2023.

FAITH, D. P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological conservation**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(92\)91201-3](https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91201-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0006320792912013>. Acesso em: 17 ago. 2023.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. Fungal databases, U.S. **National Fungus Collections**, ARS, USDA, 7 set. 2022. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em: 26 jan. 2023.

FENG, Y. *et al.* Successful application of photodynamic therapy for skin infection caused by *Corynespora cassicola* in an immunosuppressed patient and literature review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 103279, 2023. DOI: [10.1016/j.pdpdt.2023.103279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36632874/). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36632874/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

FERREIRA, A. F. T. A. F.; BENTES, J. L. da S. Patogenicidade de *Corynespora cassicola* em diferentes hospedeiros no Estado do Amazonas. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 1, p. 63-65, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2220>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/C75znhfvPJpGsSvbyg3qWYp/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2023.

FRAXE, T. de J. P. *et al.* Uso de agrotóxicos e seus impactos socioambientais nos municípios de Rio Preto da Eva e Careiro da Várzea, Amazonas-Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 31429-31451, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-558>.

Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/10714>. Acesso em: 17 ago. 2023.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators – Global, regional and country trends, 1990–2020. **FAOSTAT Analytical Briefs**, n. 46, Rome, 2022. DOI: <https://doi.org/10.4060/cc0918en> Acesso em: 17 ago. 2023.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). Pathogen risk list. **FRAC**, 2019. Disponível em: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). FRAC list of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents. **FRAC**, 2021. Disponível em: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2. Acesso em: 4 nov. 2021.

GALBIERI, R. *et al.* *Corynespora* leaf blight of cotton in Brazil and its management. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 26, p. 3805, 2014. DOI: 10.4236/ajps.2014.526398. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/10714>. Acesso em: 17 ago. 2023.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rust. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 113-118, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>. Acesso em: 17 ago. 2023.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, E. B. C.; LIM, T. M. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* em seringueira no Estado do Amazonas. **Comunicado técnico**, n. 39, 1-2 p., mar./1985. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/665214>. Acesso em: 25 jan 2023.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY (GBIF). *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A.Curtis) C.T.Wei. **GBIF**, 2023. Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/search?q=corynespora%20cassiicola>. Acesso em: 17 ago. 2023.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GODOY, C. V. *et al.* Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na cultura da soja, na safra 2019/2020: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica**, Embrapa Soja, n. 159, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1123555/eficiencia-de-fungicidas-para-o-controle-da-mancha-alvo-corynespora-cassiicola-na-cultura-da-soja-na-safra-20192020-resultados-sumarizados-dos-ensaios-cooperativos>. Acesso em: 17 ago. 2023.

GWINNER, R. et al. *Trichoderma juruarensis* sp. nov. (Hypocreaceae) a new fungal species from sediments of the Amazonian Juruá River with agricultural potential. 2022. [preprint]. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1214667/v1>. Disponível em: <https://assets.researchsquare.com/files/rs-1214667/v1/8a0bbf98-51a5-4cb6-bc33-54f0d3ace34d.pdf?c=1641852555>. Acesso em: 25 jan 2023.

HARTMAN, G. *et al.* Target spot. *In*: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**. 4th ed. St. Paul: APS Press, 1999.

HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 56, p. 339-360, 2018. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080516-035454.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Agropecuário 2017. **CensoAgro 2017**, c2017. Disponível em: <https://censoagro2017.ibge.gov.br/>. Acesso em: 13 abr. 2023.

INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO AGROPECUÁRIO E FLORESTAL SUSTENTÁVEL DO ESTADO DO AMAZONAS (IDAM). Plano Operativo 2022: gerência estadual de apoio à produção vegetal – GPV. Manaus, AM: IDAM, jan. 2022. Disponível em: http://www.idam.am.gov.br/wp-content/uploads/2022/03/PLANO-OPERATIVO_GPV_2022.pdf. Acesso em: 23 maio 2023.

ISHII, H., *et al.* Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. **Phytopathology**, v. 97, n. 11, p. 1458-1466, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-11-1458>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-97-11-1458>. Acesso em: 17 ago. 2023.

ISHII, H.; HOLLOMAN, D. W. **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer, 2015.

JI, M. S. *et al.* Sensitivity detection of *Corynespora cassiicola* to prochloraz in Liaoning province. **Jiangsu Agric. Sci.**, v. 2, p. 127-128, 2010.

KURT, S. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*, the target leaf spot pathogen. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 618-621, 2005. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Sener-Kurt/publication/26565005_Genetic_Variation_in_Corynespora_cassiicola_the_Target_Leaf_Spot_Pathogen/links/5a1329b8aca27217b5a04824/Genetic-Variation-in-Corynespora-cassiicola-the-Target-Leaf-Spot-Pathogen.pdf. Acesso em: 17 ago. 2023.

LEITE, I. C. H. L.; LOPES, U. P. Controle químico de patógenos radiculares. *In*: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (ed.). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife: EDUFRPE, 2018. p. 179-192. Disponível em: <https://repository.ufrpe.br/handle/123456789/2341>. Acesso em: 17 ago. 2023.

LI, C. S. *et al.* Identification of cucumber target leaf spot (brown spot) pathogen and its control. **China Vegetables**, v. 1, i. 18, p. 29-33, 2009.

LI, T. et al. Pharmacological characteristics and efficacy of fluazinam against *Corynespora cassiicola*, causing cucumber target spot in greenhouses. **Plant Disease**, v. 104, n. 9, p. 2449-2454, 2020.

LISBOA, W. S. et al. First report of *Corynespora cassiicola* on *Pueraria phaseoloides* (tropical kudzu). **Australasian Plant Disease Notes**, v. 11, n. 1, p. 17, 2016.

LIYANAGE, A. de S. et al. *Corynespora* leaf spot disease of rubber (*Hevea brasiliensis*) - a new record. **Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka** (Sri Lanka), 1986.

MACKENZIE, K. J. et al. A review of *Corynespora cassiicola* and its increasing relevance to tomato in Florida. **Plant Health Progress**, v. 19, n. 4, p. 303-309, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHP-05-18-0023-RV>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHP-05-18-0023-RV>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 349-379, 2002. DOI: 10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12147764/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MELLO, F. E. de et al. Resistance of *Corynespora cassiicola* from soybean to QoI and MBC fungicides in Brazil. **Plant Pathology**, v. 71, n. 2, p. 373-385, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13474>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.13474>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MENEZES, J. P. et al. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 132-139, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000100017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/HjR9qvpt4zCnxFnmbQNQGcg/#>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MIYAMOTO, T. et al. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. **Plant Pathology**, v. 58, n. 6, p. 1144-1151, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MONTEIRO, G. P. et al. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Microbacterium Resistens* e *Stenotrophomonas Maltophilia* no biocontrole de *Corynespora cassiicola* na cultura do tomate. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 1, p. 4677-4697, 2023. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv9n1-324>. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/56658>. Acesso em: 17 ago. 2023.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biological Reviews**, v. 94, n. 6, p. 2101-2137, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/brv.12550>. Acesso em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/brv.12550>. Acesso em: 17 ago. 2023.

NGHIA, N. A. *et al.* Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. **Mycopathologia**, v. 166, n. 4, p. 189-201, 2008. DOI: 10.1007/s11046-008-9138-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18568417/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson e Thompson genética médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2016. 2289 p.

OLIVE, L. S.; BAIN, D. C.; LEFEBVRE, C. L. A leaf spot of Cowpea and Soybean caused by an undescribed species of *Helminthosporium*. **Phytopathology**, v. 35, n. 10, p. 822-831, 1945.

OLIVEIRA, R. R. *et al.* Patogenicidade de isolados de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 297-299, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052007000300016>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/3v4khLcRWqZnLMXXHwkZfTQ/?lang=pt#>. Acesso em: 17 ago. 2023.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). Frear as pragas e as doenças das plantas: especialistas planejam medidas a nível global. **FAO**, 16 mar. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/293049/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

PAIXÃO, A. C. C.; MACEDO, G. L.; COELHO NETTO, R. A. Luz através de coberturas coloridas transparentes sobre *Corynespora cassiicola* causador da mancha-alvo no tomateiro. **Acta Biológica Paranaense**, v. 47, 2018. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/acta/article/download/61563/36096>. Acesso em: 17 ago. 2023.

PATEL, S. J. *et al.* Evaluating target spot (*Corynespora cassiicola*) resistance in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) in a controlled environment. **Crop Protection**, v. 159, p. 106018, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.106018>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219422001144>. Acesso em: 17 ago. 2023.

PEREIRA, W. V.; MAY-DE-MIO, L. L. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf spot on *Solanum americanum* in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 3, p. 755-755, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-018-00216-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42161-018-00216-z>. Acesso em: 17 ago. 2023.

PERNEZNY, K. *et al.* Control of target spot of tomato with fungicides, systemic acquired resistance activators, and a biocontrol agent. **Plant Prot. Sci.** v. 38, n. 3, p. 81-88, 2003. DOI: <https://doi.org/10.17221/4855-PPS>. Disponível em: http://pps.agriculturejournals.cz/artkey/pps-200203-0001_control-of-target-spot-of-tomato-with-fungicides-systemic-acquired-resistance-activators-and-a-biocontrol-age.php. Acesso em: 17 ago. 2023.

PIGNATI, W. A. *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/grrnnBRDjmtcBhm6CLprQvN/#>. Acesso em: 17 ago. 2023.

POLTRONIERI, L. S. *et al.* Ocorrência de *Corynespora cassiicola* em tomateiro no Estado do Pará. Embrapa Amazônia Oriental. **Comunicado Técnico**, Embrapa Hortaliças, n. 75, p. 1-3, set./1994. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/379056/ocorrencia-de-corynespora-cassiicola-em-tomateiro-no-estado-do-para>. Acesso em: 17 ago. 2023.

POLTRONIERI, T. P. de S. *et al.* Vinagreira: novo hospedeiro de *Corynespora cassiicola* no Pará. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 2, p. 167-167, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052012000200013>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/jgLkwfvNtVzyHgQNSqCzZZz/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2023.

QI, Y. *et al.* Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola*. **Molecular biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 145-151, 2009. DOI: 10.1007/s12033-008-9109-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18841502/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

QI, Y. *et al.* Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, n. 1, p. 83-95, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9734-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-010-9734-6>. Acesso em: 13 abr. 2023.

RAI, S.; SOLANKI, K. M. Beneficial endophytic Trichoderma functions in plant health management. In: SOLANKI, M. K. *et al.* (edit.). **Microbial Endophytes and Plant Growth**, [S. l.]: Academic Press, 2023. p. 233-244. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90620-3.00006-4>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323906203000064>. Acesso em: 17 ago. 2023.

REIS, A. *et al.* Principais doenças do tomateiro no Amazonas. **Circular Técnica**, Embrapa Hortaliças, n. 75, dez/2019. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1118558>. Acesso em: 17 ago. 2023.

REIS, A.; BOITEUX, L. S. Mancha-de-corinéspora do tomateiro. **Comunicado Técnico**, Embrapa Hortaliças, n. 41, 2007. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/779955>. Acesso em: 17 ago. 2023.

REIS, A.; MADEIRA, N. R. Diagnóstico dos principais problemas no cultivo de hortaliças no Estado do Amazonas. **Circular Técnica**, Embrapa Hortaliças, n. 82, 2009. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/783039>. Acesso em: 17 ago. 2023.

REIS, B. P. *et al.* First report of *Corynespora cassiicola* causing severe leaf blight on Eucalyptus in Brazil. **New Disease Reports**, v. 29, n. 1, p. 7-7, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.007>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.5197/j.2044-0588.2014.029.007>. Acesso em: 17 ago. 2023.

RIBEIRO, F. C. *et al.* Chemical control of the soybean target spot (*Corynespora cassiicola*), in the cerrado of Tocantins, Brazil. *Journal of bioenergy and food science*, v. 4, n. 1, p. 26-36, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.18067/jbfs.v4i1.118>. Disponível em: <http://periodicos.ifap.edu.br/index.php/JBFS/article/view/118>. Acesso em: 17 ago. 2023.

RIBEIRO, M. L. *et al.* Pesticidas: usos e riscos para o meio ambiente. **HOLOS environment**, v. 8, n. 1, p. 53-71, 2008. DOI: <https://doi.org/10.14295/holos.v8i1.2539>. Disponível em: <https://www.cea-unesp.org.br/holos/article/view/2539>. Acesso em: 17 ago. 2023.

RONDON, M. N.; LAWRENCE, K. S. *Corynespora cassiicola* isolates from soybean in Alabama detected with G143A mutation in the cytochrome b gene. **Plant Health Progress**, v. 20, n. 4, p. 247-249, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHP-07-19-0046-BR>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHP-07-19-0046-BR>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SAGAFF, S. A. S. *et al.* Emerging and existing major leaf diseases of hevea brasiliensis in malaysia. *journal of current opinion*. **Crop Science**, v. 3, n. 1, p. 34-47, 2022. Disponível em: <https://www.jcocs.com/index.php/ej/article/view/129>. Acesso em: 13 abr. 2023.

SAULLE, C. C. *et al.* Photoinactivation of *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani* in soybean seeds by cationic porphyrins. **Plant Pathology**, v. 72, n. 1, p. 67-75, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13640>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.13640>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SAVARY, S. *et al.* The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430-439, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41559-018-0793-y>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Agrofit: sistema de agrotóxicos fitossanitários. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, 2023. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SECRETARIAT, I. P. P. C. *et al.* Scientific review of the impact of climate change on plant pests. **FAO on behalf of the IPPC Secretariat**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.4060/cb4769en>. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cb4769en>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SHAO, W.; ZHAO, Y.; MA, Z. Advances in understanding fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in China. **Phytopathology**, v. 111, n. 3, p. 455-463, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SHIMOMOTO, Y. *et al.* Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. **Plant pathology**, v. 60, n. 2, p. 253-260, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02374.x>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2010.02374.x>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SHRESTHA, S. K.; LAMOUR, K.; YOUNG-KELLY, H. Genome sequences and SNP analyses of *Corynespora cassiicola* from cotton and soybean in the southeastern United States reveal limited diversity. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0184908, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184908>. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184908>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SHUIB, S. S. *et al.* Cassiicolin genes among *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. **J. Rubber Res.**, v. 18, p. 6241-6246, 2015. Disponível em:

https://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=577096. Acesso em: 17 ago. 2023.

SIAH, A. *et al.* QoI Resistance and Mitochondrial Genetic Structure of *Zymoseptoria tritici* in Morocco. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 8, aug./2014. DOI:

<https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1057-RE>. Disponível em:

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-13-1057-RE>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SILVA, A. L. *et al.* First Report of *Corynespora cassiicola* Causing Leaf Spots on the Invasive Weed *Cryptostegia madagascariensis* (Rubbervine) in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 3, p. 681-681, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1488-PDN>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-09-17-1488-PDN>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SILVA, N. I. de *et al.* Morpho-molecular taxonomic studies reveal a high number of endophytic fungi from *Magnolia candolli* and *M. garrettii*. **China and Thailand. Mycosphere**, v. 12, n. 1, p. 163-237, 2021. DOI: 10.5943/mycosphere/12/1/3. Disponível em:

https://www.mycosphere.org/pdf/MYCOSPHERE_12_1_3.pdf. Acesso em: 17 ago. 2023.

SILVA, W. P. K. *et al.* RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. **Australian Journal of Botany**, v. 43, n. 6, p. 609-618, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1071/BT9950609>. Disponível em:

<https://www.publish.csiro.au/BT/BT9950609>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SILVA, W. P. K.; DEVERALL, B. J.; LYON, B. R. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. **Plant pathology**, v. 47, n. 3, p. 267-277, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00245.x>. Disponível em:

<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-3059.1998.00245.x>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SILVA, W.P.K. *et al.* Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relationship between host origin and virulence. **Mycological research**, v. 107, n. 5, p. 567-571, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0953756203007755>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756208612290>. Acesso em: 17 ago. 2023.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756208612290>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SOARES, R. M. *et al.* Comparação da virulência de isolados de *Corynespora cassiicola* obtidos em soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. **Anais eletrônicos...** Brasília, DF: Embrapa, 2012. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/66571/1/Comparacao-da-virulencia-de-isolados-de-Corynespora-cassiicola-obtidos-em-soja.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2023.

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/66571/1/Comparacao-da-virulencia-de-isolados-de-Corynespora-cassiicola-obtidos-em-soja.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2023.

SOARES, R. M.; ARIAS, C. A. A. Inheritance of soybean resistance to *Corynespora cassiicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 46, p. 85-91, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/232903>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/Lhp7V3K8J5dFnhgtx5wHXDp/?lang=en>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SOUSA, F. M. G.; BENTES, J. L. da S. Variabilidade de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. e Curt.) Wei procedentes do Amazonas, em meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 84-87, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052014000100014>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/xStCWfWrPnkfBTybbJtKTbb/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SOUZA, A. F. *et al.* First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and berry spots on *Coffea canephora* in Brazil. **Australasian Plant Disease**. Notes, v. 4, n. 1, p. 72-74, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1071/DN09031>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1071/DN09031>. Acesso em: 17 ago. 2023.

STEVENSON, K. L.; MCGRATH, M. T.; WYENANDT, C. A. Fungicide Resistance in North America. **American Phytopathological Society**, p. i-vii, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/9780890546222.fm>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/book/10.1094/9780890546222>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SUMABAT, L. G. *et al.* Clonality and geographic structure of host-specialized populations of *Corynespora cassiicola* causing emerging target spot epidemics in the southeastern United States. **Plos one**, v. 13, n. 10, p. e0205849, 2018a. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205849>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0205849>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SUMABAT, L. G. *et al.* Phylogenetic diversity and host specialization of *Corynespora cassiicola* responsible for emerging target spot disease of cotton and other crops in the southeastern United States. **Phytopathology**, v. 108, n. 7, p. 892-901, 2018b. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0407-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-12-17-0407-R>. Acesso em: 17 ago. 2023.

TACK, A. J. M. *et al.* Variation in infectivity and aggressiveness in space and time in wild host-pathogen systems: causes and consequences. **Journal of evolutionary biology**, v. 25, n. 10, p. 1918-1936, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02588.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1420-9101.2012.02588.x>. Acesso em: 17 ago. 2023.

TAI, F. L. Notes on Fungi. **Bulletin of the Chinese Botanical Society**, 7., n. 2, p. 45-66, 1936.

TANG, P. *et al.* Efficacy of 25% azoxystrobin suspension on *Corynespora* blight in cucumber. **Liaoning Agric. Sci.**, v. 3, p. 69-70, 2008.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; FISHER, M. C. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. **Annual review of phytopathology**, v. 37, n. 1, p.

197-246, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.197>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.37.1.197>. Acesso em: 17 ago. 2023.

TERAMOTO, A. *et al.* Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo em folhas de pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, p. 439-445, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5216/pat.v41i3.12017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pat/a/ZvkCNjLmxJPwSYRn7GZ5SMg/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2023.

TERAMOTO, A. *et al.* In vitro sensitivity of *Corynespora cassiicola* isolated from soybean to fungicides and field chemical control of target spot. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 281-289, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2195>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/gdkF9hKBY7Yr5n4BpWLAN8n/?lang=en#>. Acesso em: 17 ago. 2023.

TRINDADE, D. R. *et al.* Hortênsia, um novo hospedeiro de *Corynespora cassiicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 338-339, ago. 1999. Suplemento. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98486/1/338.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

VENTURINI, M. T. *et al.* Natural infection by *Corynespora cassiicola* in papaya accessions. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 284-287, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1914>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/DKxDqB83tfPMVkJFzxSD475h/abstract/?lang=en>. Acesso em: 17 ago. 2023.

VERZIGNASSI, J. R.; POLTRONIERI, L. S.; BENCHIMOL, R. L. Mancha-alvo em mogno-africano no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 1, p. 70-71, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000100015>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/xMVkwjFWxpQDTZPFG8XpFjP/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2023.

VERZIGNASSI, J. R.; VIDA, J. B.; TESSMANN, D. J. Epidemias de mancha de corinespora em pepino tipo japonês sob cultivo protegido na Região Norte do Estado do Paraná. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 5, p. 570-570, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000500023>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/fb/a/nB6xFjqjFjkvplLHBkd35Rd/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2023.

VOGLMAYR, H.; JAKLITSCH, W. M. *Corynespora*, *Exosporium* and *Helminthosporium* revisited-new species and generic reclassification. **Studies in Mycology**, v. 87, n. 1, p. 43-76, 2017. DOI: [10.1016/j.simyco.2017.05.001](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.05.001). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5473648/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

WAICHMAN, A. V. *et al.* Usen and fate in the Amazon State, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 9, n. 6. p. 423-428. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02987596>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02987596>. Acesso em: 17 ago. 2023.

WANG, W.Y. *et al.* Pulmonary Cladosporium infection coexisting with subcutaneous *Corynespora cassiicola* infection in a patient: a case report. **World Journal of Clinical Cases**, v. 10, n. 11, p. 3490, 2022. DOI: 10.12998/wjcc.v10.i11.3490. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9048548/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

WEI, C. T. *Corynespora cassiicola* (Berk. e M. A. Curtis). **Mycol. Pap.**, v. 34, n. 5, 1950. Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/species/2617824>. Acesso em: 25 jan 2023.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262687766_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_RNA_Genes_for_Phylogenetics. Acesso em: 17 ago. 2023.

WU, J. *et al.* Variation of cassiicolin genes among Chinese isolates of *Corynespora cassiicola*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 4, p. 634-647, 2018. DOI: 10.1007/s12275-018-7497-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30054815/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

XAVIER, S. A. *et al.* Microtiter method to monitor *Corynespora cassiicola* and sensitivity of the pathogen to Carbendazim, prothioconazole and pyraclostrobin. **Crop Protection**, 144, 105554, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105554>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219421000247?via%3Dihub>. Acesso em: 17 ago. 2023.

XU, J. *et al.* Comparison and correlation of *Corynespora cassiicola* populations from kiwifruit and other hosts based on morphology, phylogeny and pathogenicity. **Plant Disease**, v. 106, n. 1, 128-135, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0937-RE>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-04-22-0937-RE>. Acesso em: 17 ago. 2023.

XU, Y. *et al.* Study on fungicides controlling *Corynespora* blight on cucumber. **Liaoning Agric. Sci.**, v. 6, p. 47-48, 2000.

CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *CORYNESPORA CASSIICOLA* A FUNGICIDAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS, AMAZONAS

RESUMO

A resistência a fungicidas, um fenômeno em que fungos desenvolvem a capacidade de sobreviver e se reproduzir mesmo quando expostos a doses anteriormente letais de fungicidas ou antifúngicos, é um problema significativo na agricultura tornando mais difícil o controle de doenças em plantações. Para assegurar a eficácia no controle da doença, é essencial monitorar constantemente a eficácia dos fungicidas. Este estudo envolveu ensaios de inibição do crescimento *in vitro* de colônias de *C. cassiicola* coletadas na região metropolitana de Manaus, utilizando diferentes concentrações de Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol, além da avaliação da eficiência desses produtos em mudas de tomate cereja em condições de viveiro. Os resultados demonstraram que a aplicação de todos os fungicidas reduziu a severidade da mancha-alvo nas plantas de tomate, validando um efeito positivo desses agentes no controle da doença, no entanto, foi observada uma considerável resistência *in vitro* dos isolados de *C. cassiicola* a todos os fungicidas testados, evidenciando que diferentes cepas do fungo podem exibir níveis variados de resposta aos fungicidas. Portanto, ao lidar com doenças fúngicas em culturas ou ambientes onde diferentes cepas do fungo estão presentes, é importante considerar a diversidade genética e a possibilidade de variações na resposta aos fungicidas.

Palavras-chave: Mancha-alvo, Controle químico, Resistência a fungicidas, Severidade da doença, Agricultura tropical.

1 INTRODUÇÃO

O controle químico é amplamente utilizado na agricultura para o manejo de pragas (IBGE, 2017) e, muitas vezes, é a única medida eficiente para garantir níveis economicamente viáveis de produtividade e qualidade de produção. No entanto, a resistência dos fungos aos fungicidas está se tornando um problema crescente na produção agrícola em todo o mundo (CORKLEY; FRAAIJE; HAWKINS, 2022).

A resistência ocorre quando os fungos sobrevivem à exposição repetida a um determinado fungicida. Estudos relatam a existência de isolados de *C. cassiicola* resistentes a diferentes classes de fungicidas, como benzimidazóis, estrobilurinas, triazóis e carboxamidas (MAO *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2022a; WANG *et al.*, 2023; ZHU *et al.*, 2022). A resistência às múltiplas classes de fungicidas pode ser especialmente preocupante, pois pode limitar as opções disponíveis para o controle efetivo dessa doença em lavouras agrícolas. A compreensão dos mecanismos responsáveis pela resistência é fundamental para desenvolver estratégias de manejo que possam minimizar o desenvolvimento e a disseminação da resistência em populações de *C. cassiicola*.

A resistência de patógenos a fungicidas pode surgir devido a mutações naturais em uma população. Quando as mutações proporcionam resistência a um determinado fungicida, os indivíduos que carregam estas alterações genéticas têm uma vantagem competitiva sobre os sensíveis ao fungicida, o que leva ao aumento da frequência das mutações na população (GOMES *et al.*, 2019).

Além disso, a aplicação excessiva ou inadequada de fungicidas exerce uma pressão seletiva sobre os fungos, favorecendo o desenvolvimento de resistência. O uso de fungicidas com baixa eficácia ou modos de ação semelhantes também contribui para a resistência, uma vez que os fungos podem se adaptar facilmente a esses produtos. A seleção de mutações pré-existentes na população de fungos e a falta de diversidade genética nas áreas cultivadas também desempenham um papel importante no desenvolvimento da resistência. Estes fatores podem agir de forma combinada, tornando a resistência a fungicidas um desafio significativo para o manejo de doenças em culturas agrícolas (FRAC, 2019).

Para minimizar o surgimento da resistência a fungicidas em *C. cassiicola*, é necessário adotar estratégias de manejo integrado de doenças que incluam medidas preventivas, como o plantio de cultivares resistentes, a rotação de culturas e a adoção de práticas culturais adequadas. Além disso, é fundamental utilizar fungicidas de forma consciente, seguindo as recomendações de dosagem e aplicação, bem como evitar a aplicação repetitiva de produtos com modo de ação

semelhante (CARMONA; SAUTUA, 2017). O monitoramento constante da eficácia dos fungicidas é essencial para detectar o surgimento de resistência e tomar medidas imediatas para prevenir ou adotar ações oportunas para garantir a eficácia do controle da doença em campo (DAL'SASSO *et al.*, 2021).

A resistência aos fungicidas pode ser quantificada *in vitro* mediante a avaliação do desenvolvimento de colônias do fungo cultivadas em placas de Petri com meio de cultura incorporado com o produto fungicida na dose letal descrita pelo fabricante. A constatação de resistência *in vitro* pode indicar a existência inicial de indivíduos resistentes em uma população, e, além disso, observações sobre o desenvolvimento dos sintomas da doença em plantas tratadas com fungicidas devem ser realizadas para avaliar a eficiência da ação destes produtos nas culturas agrícolas (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2021).

Nesse sentido, este capítulo apresenta o perfil de sensibilidade de isolados de *C. cassicola* aos fungicidas Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol por meio de ensaios de resistência *in vitro*, bem como a eficiência desses fungicidas sobre isolados resistentes em ensaios *in vivo* com mudas de tomate cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) em condições de viveiro.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar variantes do fungo *C. casicola* resistentes a fungicidas na região metropolitana de Manaus – AM.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar a sensibilidade *in vitro* de isolados do fungo aos fungicidas Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol.

Avaliar a eficiência dos fungicidas sobre isolados resistentes em tomateiros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E ISOLAMENTO DE *C. CASSIICOLA*

As coletas de amostras de *C. cassiicola* foram realizadas em propriedades rurais nos municípios de Manaus, Iranduba, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo, localizados no estado do Amazonas. Os isolados foram obtidos a partir de folhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), pepineiro (*Cucumis sativus*) e mamoeiro (*Carica papaya*) que apresentavam sintomas de mancha-alvo. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (FCA/UFAM).

O processo de obtenção de colônias dos fungos foi realizado por meio de isolamento indireto, seguindo o método descrito por Alfnas *et al.* (2016). Inicialmente, as folhas coletadas foram lavadas em água corrente para reduzir a presença de microrganismos saprofíticos. Em seguida, um fragmento de 5 mm da área de transição entre a área lesionada e a área saudável de cada lesão foi retirado e submetido a uma desinfestação superficial. Este processo envolveu a imersão dos fragmentos em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% por 30 segundos e em tríplice lavagem com água destilada.

Os fragmentos foliares desinfestados foram depositados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-ágar e incubados em uma câmara de crescimento tipo BOD a 26 °C, com um fotoperíodo de 12 horas, até o surgimento de estruturas do fungo. As hifas que cresceram a partir dos fragmentos foram repicadas para novas placas contendo meio de cultura V8, mantidas em temperatura ambiente (aproximadamente 26 °C) e fotoperíodo de 12 horas durante 7 dias, a fim de promover a produção de esporos do fungo (MELO; REIS, 2010).

Para obter culturas monospóricas de *C. cassiicola*, utilizou-se a técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento (AZEVEDO; COSTA, 1983). Inicialmente, preparou-se uma suspensão estéril contendo uma concentração de 10^{-4} conídios/mL. Em seguida, 50 µL desta suspensão foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Após a inoculação, as placas foram mantidas em temperatura ambiente, em torno de 26 °C, com um fotoperíodo de 12 horas ao longo de 10 dias.

A partir dos isolados obtidos, foram preparadas lâminas de microscopia e observadas em um microscópio ótico com ocular de 40x, com o objetivo de confirmar a identificação do fungo *C. cassiicola* com base na morfologia dos conídios, bem como verificar a ausência de

outros microrganismos no material. No total, foram obtidos 110 isolados de *C. cassiicola*, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Coleção de isolados de *Corynespora cassiicola* obtidos no Amazonas

Isolados	Origem*	Hospedeiras
1, 2, 3, 4, 5, 6	MAO	tomate yashi
7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	MAO	tomate caraiba
18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54	IRD	tomate cereja
55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71	RPE	mamão
72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82	MAO	mamão
83, 84, 85, 86, 87	RPE	mamão
88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103	PF	pepino
104, 105, 106, 107, 108, 109, 110	MAO	mamão

* IRD: Iranduba, MAO: Manaus; PF: Presidente Figueiredo, RPE: Rio Preto da Eva

Fonte: De autoria própria (2023).

A preservação dos isolados foi realizada usando o método de Castellani (CASTELLANI, 1939). Foram cortados 5 discos de 5 mm da parte marginal das colônias e armazenados em microtubos de 2,0 mL contendo água destilada esterilizada. Além disso, utilizou-se o método de curto prazo de repique contínuo em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA para manter a viabilidade das culturas dos isolados.

3.2 AVALIAÇÕES DE SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS *IN VITRO*

Foram realizados testes para avaliar a resistência dos isolados de *C. cassiicola* aos fungicidas Azoxistrobina, Carbendazim, Tebuconazol e Boscalida, com o objetivo de detectar possíveis perfis de sensibilidade aos compostos testados.

Para avaliar a sensibilidade dos isolados *in vitro*, determinou-se inicialmente a concentração de fungicida incorporada ao meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) que inibe 50% do crescimento micelial da colônia, comparado à testemunha cultivada em meio de cultura BDA sem fungicida (EC50%), seguindo as recomendações do Comitê de Ação contra a Resistência aos Fungicidas (RUSSELL, 2002).

Para a preparação das soluções, os fungicidas foram diluídos em água destilada esterilizada para obter uma solução estoque com concentração inicial de 10.000 µg/mL⁻¹. Esta solução estoque foi utilizada como referência para realizar as diluições, abrangendo uma faixa de concentrações que variaram de 0% a 100% da concentração comercial recomendada de fungicidas para o controle de mancha-alvo na cultura da soja (SECRETARIA DE DEFESA

AGROPECUÁRIA, 2023). Foram ajustadas as seguintes concentrações para cada fungicida: Azoxistrobina: 0,05 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Boscalida: 1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 30 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Carbendazim: 1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Tebuconazol: 0,05 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g/mL}^{-1}$.

Os fungicidas foram ajustados em diferentes concentrações e adicionados ao meio de cultura BDA (KASVI®) fundido a 47° C. Após a incorporação dos fungicidas, aproximadamente 10 ml de meio de cultura foi vertido em placa de Petri de 60 mm de diâmetro. O procedimento foi realizado na câmara de fluxo laminar no escuro, a fim de evitar a degradação dos fungicidas pela exposição à luz. Em seguida, discos de micélio com 5 mm de diâmetro, retirados das colônias de *C. cassicola* foram depositados no centro das placas.

Os ensaios foram conduzidos separadamente para cada fungicida. No caso do tratamento Boscalida, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial de 10 isolados x 5 concentrações dos fungicidas, com três repetições. Cada placa de Petri contendo um disco de micélio foi considerada como uma repetição. Nos tratamentos com os fungicidas Azoxistrobina, Carbendazim e Tebuconazol, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial de 12 isolados x 6 concentrações dos fungicidas, com três repetições. Cada placa de Petri contendo três discos de micélio equidistantes foi considerada como uma repetição. O tratamento controle consistiu em placas de Petri com meio de cultura BDA sem fungicida.

As placas foram posicionadas em câmara de crescimento BOD em 26°C no escuro. A cada 48 horas, o diâmetro médio das colônias (DMC) foi medido com um paquímetro digital. A medição foi realizada em duas direções perpendiculares da colônia até que um dos tratamentos atingisse a borda da placa. Para obter o DMC, o diâmetro inicial de 5 mm, correspondente ao disco de micélio depositado nas placas, foi subtraído dos valores obtidos para o diâmetro das colônias.

A EC50% de cada isolado foi determinada por meio de interpolação linear dos dados das concentrações de fungicida e da resposta de crescimento micelial. Para realizar esta análise, utilizou-se o *software* Rstudio© (TEAM, 2009) e o pacote EC50 estimator (ALVESK, 2022).

A dose discriminatória, que corresponde à concentração mínima de fungicida necessária para inibir 50% do crescimento micelial do fungo, foi determinada a partir do ponto de inflexão de curvas de dose-resposta em escala logarítmica (\log^{10}), considerando o crescimento micelial em relação às concentrações de fungicida e a resposta de EC50%. Para esta análise, utilizou-se o *software* Rstudio© (TEAM, 2009) e o pacote ggplot2 (WICKHAM, 2011).

Realizaram-se análises de variância (ANOVA) e teste de médias utilizando o Teste Scott-knott com um nível de significância de 5% para a comparação das médias de crescimento micelial entre as concentrações de fungicidas. Nesta análise, foi utilizado o *software* Rstudio© (TEAM, 2009) e o pacote agricolae (MENDIBURU; YASEEN, 2020).

Os perfis de resistência foram analisados em 69 isolados da coleção. Um disco de micélio com 5 mm de diâmetro foi colocado no centro da placa de Petri de 60 mm de diâmetro com meio de cultura BDA adicionado o fungicida ajustado na concentração correspondente à dose discriminatória determinada previamente. Os experimentos foram conduzidos separadamente para cada fungicida testado. Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 69 tratamentos (isolados) e três repetições.

As placas foram colocadas em uma incubadora BOD a 26 °C, no escuro. A cada 48 horas, o diâmetro médio das colônias (DMC) foi medido utilizando um paquímetro digital. A medição foi realizada em duas direções perpendiculares da colônia até que um dos tratamentos atingisse a borda da placa. Para calcular os valores de inibição do crescimento micelial dos isolados (ICM%), utilizamos a seguinte equação:

$$\text{ICM\%} = ((\text{DMCsf} - \text{DMCf}) / \text{DMCsf}) \times 100 \quad (1)$$

Em que:

DMCsf: Diâmetro médio da colônia inoculada em meio de cultura sem fungicida (testemunha)

DMCf: Diâmetro médio da colônia inoculada em meio de cultura com fungicida

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e teste de médias dos valores de inibição do crescimento micelial dos isolados, utilizando o teste Scott-knott com um nível de significância de 5%, por meio do *software* Rstudio© (TEAM, 2009) e o pacote agricolae (MENDIBURU; YASEEN, 2020).

A classificação da resistência aos fungicidas foi determinada com base na porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM%) dos isolados em relação ao tratamento testemunha. Os isolados foram classificados como extremamente sensíveis (SS) quando apresentaram ICM superior a 80%, sensíveis (S) quando o ICM foi menor que 80% e maior que 50%, resistentes (R) quando o ICM foi menor que 50% e maior que 20%, e extremamente resistentes (RR) quando o ICM foi inferior a 20%. Esta classificação foi adaptada com base na escala de

Edgington (AVOZANI; REIS; TONIN, 2014; EDGINGTON; KHEW; BARRON, 1971; TERAMOTO *et al.*, 2017).

3.3 EFICIÊNCIA DOS FUNGICIDAS SOBRE ISOLADOS RESISTENTES EM TOMATEIRO

O estudo foi conduzido em um viveiro localizado em Manaus/AM, com estruturas de aço galvanizado, coberto com uma camada de plástico filme de polietileno transparente de 150 micras e telas de sombreamento 35% raschel preta por baixo do plástico e nas paredes laterais.

Foram selecionados nove isolados (19, 23, 31, 39, 50, 53, 89, 97, 101) que apresentaram resistência a no mínimo a três fungicidas nos testes *in vitro*. Os isolados de *C. cassiicola* foram inoculados em mudas de tomateiro cereja (*Solanum lycopersicum* cv. *Carolina*[®]) de dois meses de idade e pelo menos três pares de folhas. As mudas foram preparadas em copo de plásticos de 600 mL contendo substrato autoclavado composto por areia, húmus de minhoca e casca de coco triturada, na proporção 1:1:1.

Foram preparadas suspensões de inóculo de *C. cassiicola* em água destilada e esterilizada na concentração de 10^4 conídios/mL⁻¹ (CELLOTO, 2014). Os conídios foram obtidos a partir da raspagem de colônias com alta esporulação, cultivadas durante 10 dias em placas de Petri contendo meio de cultura V8. As placas foram mantidas em temperatura ambiente ($\pm 26^\circ\text{C}$) com um fotoperíodo de 12 horas. A contagem dos conídios foi realizada através da observação de três gotas de 10 μL de cada suspensão de isolado, dispostas em uma lâmina, utilizando um microscópio óptico com uma objetiva de 40x.

A inoculação de *C. cassiicola* nas mudas de tomateiro foi realizada com auxílio de um pulverizador manual, utilizando 250 mL de suspensão de inóculo na concentração de 10^4 conídios/mL⁻¹, aplicado na superfície adaxial das folhas de 30 plantas para cada isolado até o início do ponto de escorrimento. Em seguida, as plantas foram colocadas em câmara úmida feita com sacos de plásticos transparentes umedecidos com água destilada e esterilizada, durante 48 horas.

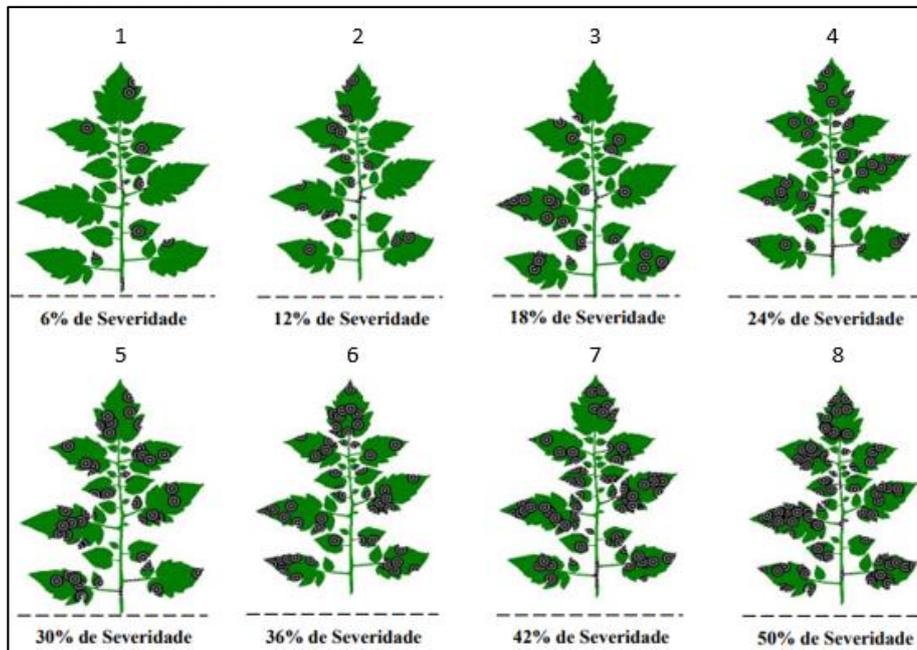
Suspensões de cada fungicida foram preparadas a partir de soluções estoque com concentração inicial de 10.000 $\mu\text{g/mL}$. Estas foram diluídas em água deionizada esterilizada, ajustadas para atingir as concentrações correspondentes à dose discriminatória *in vitro*, previamente determinada para cada fungicida.

Após 48 horas da retirada das plantas inoculadas da câmara úmida, foi realizado o tratamento com fungicida. Para cada tratamento, foram aplicados 250 mL de suspensão de

fungicida na superfície adaxial das folhas de 45 plantas, utilizando um pulverizador manual, até o início do ponto de escorrimento. Os tratamentos de controle positivo (+) e controle negativo (-) receberam pulverização de água destilada e esterilizada.

A avaliação do experimento foi realizada 48 horas após a aplicação dos fungicidas para quantificar a severidade dos sintomas de lesões foliares da mancha-alvo. Esta avaliação foi feita em três ramos de cada planta: terço superior, terço médio e terço inferior. Utilizou-se um sistema de notas baseado na escala diagramática elaborada por Paixão (2014). As avaliações foram encerradas quando um dos ramos da unidade amostral atingiu a nota 8 (Figura 5).

Figura 5 - Escala de notas para quantificar a severidade de *Corynespora cassiicola* em folíolos de tomateiro



Fonte: Paixão (2014).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 9 isolados x 4 fungicidas. Foram realizados dois controles. Em que o controle positivo (+) com plantas inoculadas e tratadas com água destilada e esterilizada, e o controle negativo (-) com plantas não inoculadas e não tratadas, totalizando 270 unidades amostrais, considerando cada unidade experimental um copo de plástico contendo uma planta.

Os dados de severidade dos sintomas foram obtidos ao calcular a média das notas entre os três ramos de cada planta. A partir das médias das notas, foram construídos gráficos de curvas de progresso da doença com o *software* Rstudio® (TEAM, 2009) e o pacote ggplot2 (WICKHAM, 2011).

Os valores da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), foram calculados pela seguinte equação:

$$\text{AACPD} = \sum [(Y_i + Y_{i+1}) / 2] * (X_{i+1} - X_i) \quad (2)$$

Em que:

Y_i : severidade da doença no tempo i .

X_i : tempo ou intervalo de tempo i .

Os valores de AACPD foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Scott-knott a 5% de significância, mediante uso do *software* Rstudio[®] (Team, 2009) com o pacote agricolae (MENDIBURU; YASEEN, 2020).

Após as avaliações de severidade da doença, procedeu-se ao REISolamento dos patógenos a partir de porções infectadas de tecido hospedeiro, a fim de cumprir os postulados de Koch (KOCH, 1884). Estes patógenos foram inoculados em placas de Petri com meio de cultura BDA. Em seguida, as estruturas das colônias dos patógenos foram examinadas em microscópio óptico, utilizando uma ocular de 40x, para confirmar a identificação de *C. cassicola* com base na morfologia dos conídios.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÕES DE RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS *IN VITRO*

Os resultados da avaliação do efeito de diferentes concentrações dos fungicidas Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol na determinação do EC50% revelaram uma diferença significativa no crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* entre as concentrações testadas, indicando variação no crescimento micelial do fungo em resposta às concentrações.

Essa diferença sugere que as concentrações dos fungicidas afetam o crescimento do fungo de maneira distinta. Algumas concentrações foram mais eficazes em inibir o crescimento micelial, enquanto outras concentrações apresentaram menor eficácia. Estes resultados destacam a importância de determinar a concentração ótima para o controle efetivo do fungo.

A seguir, são apresentados os resultados da Análise de variância (ANOVA) segundo o teste de Scott-Knott realizado ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dos valores de crescimento micelial médio (mm) dos isolados de *C. cassiicola*, juntamente com as concentrações efetivas médias necessárias para inibir 50% do crescimento micelial *in vitro* em relação ao tratamento controle (EC_{50%}) para os fungicidas Azoxistrobina (Tabela 2), Boscalida (Tabela 3), Carbendazim (Tabela 4) e Tebuconazol (Tabela 5).

Na Tabela 2, o resultado dos isolados 3, 10, 40, 45, 51, 57, 74, 80, 83, 92, 98 e 99 expostos às diferentes concentrações de Azoxistrobina, revelaram que o EC50% variou de 0,304 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ a 6,888 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Notavelmente, o isolado 10 demonstrou o maior valor de EC50%, indicando menor sensibilidade ao fungicida em comparação aos outros isolados. O isolado 3 exibiu o menor valor de EC50%, sugerindo ser o mais sensível à Azoxistrobina. A análise de variância revelou uma diferença significativa predominante no crescimento micelial dos isolados em relação à testemunha na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$.

Tabela 2 - Concentração Efetiva Média para 50% do crescimento micelial (EC_{50%}) em relação ao tratamento controle (0 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) dos isolados de *Corynespora cassiicola* em meio de cultura com diferentes concentrações do fungicida Azoxistrobina.

Isolados	0 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	0,05 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	0,10 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	0,5 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	1 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	5 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	10 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	EC 50% ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)
3	24,14 a	15,73	14,25 a	12,69 a	11,45 b	11,58 b	10,42 b	0,304
10	25,04 a	18,63	16,56 a	18,20 a	17,61 a	17,55 a	16,02 a	6,888
40	26,76 a	15,59	14,54 a	15,70 a	15,90 a	15,64 a	14,93 a	5,674
45	26,28 a	18,94	19,72 a	19,85 a	17,65 b	18,78 a	12,76 b	2,987
51	25,62 a	20,47	21,74 a	20,02 a	19,34 a	19,17 a	14,60 a	3,674
57	22,05 a	12,48	11,37 a	09,72 b	08,89 b	08,45 b	05,11 b	4,646

74	24,01 a	13,48	13,70 a	13,33 a	12,54 a	12,00 b	10,19 b	6,514
80	25,70 a	15,47	14,14 a	13,82 a	13,82 a	13,02 a	12,72 b	5,091
83	26,62 a	16,66	13,99 a	14,03 a	12,66 b	13,31 b	12,78 b	5,754
92	25,82 a	14,40	14,51 a	13,94 a	12,24 b	11,12 b	10,02 b	4,946
98	25,98 a	10,10	13,09 a	13,55 a	11,66 b	07,86 b	07,33 b	4,267
99	25,90 a	14,79	13,09 a	13,64 a	17,71	14,95 a	13,08 a	5,672

Fonte: De autoria própria (2023).

Nota: Crescimento micelial (mm).

Na Tabela 3, os isolados 14, 17, 18, 20, 25, 31, 35, 38, 41 e 46 foram submetidos às diferentes concentrações de Boscalida. Os resultados mostram que o EC50% variou de 4,886 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ a 39,414 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Observa-se que os isolados 14, 17, 18, 20 e 25 apresentaram valores menores de EC50%, indicando maior sensibilidade à Boscalida em comparação aos demais isolados. Contudo, o isolado 41 demonstrou o maior valor de EC50%, indicando ser menos sensível ao fungicida em relação aos outros isolados. Além disso, a análise de variância revelou uma diferença significativa predominante no crescimento micelial dos isolados em relação à testemunha na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}^{-1}$.

Tabela 3 - Concentração Efetiva Média para 50% do crescimento micelial (EC50%) em relação ao tratamento controle (0 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) dos isolados de *Corynespora cassiicola* em meio de cultura com diferentes concentrações do fungicida Boscalida

Isolados	0 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	1 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	5 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	10 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	30 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	EC 50% ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)
14	34,71 a	30,24 a	23,22 a	16,58 b	16,62b	17,12b	8,882
17	36,26 a	29,65 a	23,89 a	21,22 a	13,57b	16,73b	4,886
18	46,67 a	44,74 a	26,62 a	26,39 a	13,09b	16,48b	13,862
20	42,55 a	38,94 a	25,96 a	24,88 a	15,33b	16,36b	8,649
25	34,57 a	30,20 a	19,18 a	16,00 a	14,58b	13,41b	31,079
31	45,88 a	45,15 a	25,28 a	24,52 a	15,73b	18,59b	20,127
35	42,93 a	42,40 a	26,5 a	29,77 a	12,02b	18,46b	18,275
38	42,55 a	44,65 a	28,41 a	29,25 a	13,70b	16,42b	21,402
41	46,91 a	43,85 a	21,26 b	20,30 b	07,48b	08,54b	39,414
46	47,50 a	40,84 a	25,63 a	23,19 b	14,33b	16,78b	34,777

Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente

CV (%) 2,27 $p < 0,05$

Fonte: De autoria própria (2023).

Nota: Crescimento micelial (mm).

Na Tabela 4, os isolados 3, 10, 40, 45, 51, 57, 74, 80, 83, 92, 98 e 99 foram expostos às diferentes concentrações de Carbendazim. Os resultados revelaram que o EC50% variou de

0,244 $\mu\text{g/mL}$ a 39,666 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Os isolados 3, 10, 40, 45, 51, 92, 98 e 99 apresentaram valores menores de EC50%, indicando maior sensibilidade ao Carbendazim em comparação com os demais isolados. Entretanto, os isolados 57, 74 e 80 mostraram valores de EC50% próximos a zero, o que indica que o crescimento micelial foi totalmente inibido nessas concentrações, sinalizando uma alta eficácia do fungicida contra estes isolados. A análise de variância revelou uma diferença significativa predominante no crescimento micelial dos isolados em relação à testemunha na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}^{-1}$.

Tabela 4 - Concentração Efetiva Média para 50% do crescimento micelial (EC50%) em relação ao tratamento controle (0 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) dos isolados de *Corynespora cassiicola* em meio de cultura com diferentes concentrações do fungicida Carbendazim.

Isolados	0 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	1 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	5 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	10 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	50 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	250 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	EC 50% ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)
3	24,46 a	17,85 a	17,49 a	12,20 b	9,22 b	11,49 b	6,73 b	0,244
10	25,93 a	18,99 a	18,67 a	12,44 b	12,03 b	11,13 b	10,74 b	5,231
40	26,37 a	22,14 a	18,63 a	13,15 b	12,01 b	9,25 b	7,16 b	28,601
45	26,88 a	21,06 a	18,67 a	17,95 a	18,20 a	13,70 a	9,90 b	46,896
51	26,44 a	22,13 a	20,74 a	18,02 a	18,13 a	12,85 b	8,50 b	39,666
57	24,71 a	0,00 b	02,77 b	0,00 b	03,35 b	02,06 b	0,00 b	N/A
74	23,98 a	0,00 b	01,28 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	N/A
80	23,29 a	1,76 b	02,99 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	1,360
83	22,44 a	3,05 b	04,06 b	0,00 b	0,00 b	02,91 b	0,00 b	4,159
92	24,98 a	22,07 a	18,50 a	12,27 b	11,97 b	10,11 b	4,60 b	3,222
98	25,77 a	22,71 a	17,51 a	12,45 b	12,95 b	12,68 b	3,58 b	22,233
99	23,01 a	17,12 a	15,73 a	10,56 b	11,49 b	11,09 b	5,14 b	18,619

Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente

CV (%) 1,29 p<0,05

Fonte: De autoria própria (2023).

Nota: Crescimento micelial (mm).

Na Tabela 5, os isolados 3, 10, 40, 45, 51, 57, 74, 80, 83, 92, 98 e 99 foram expostos às diferentes concentrações de Tebuconazol. Os resultados indicam que o EC50% variou de 0,219 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ a 21,042 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Os isolados 3, 10, 40, 57, 74 e 99 apresentaram valores menores de EC50%, sugerindo uma maior sensibilidade ao Tebuconazol em comparação aos demais isolados. Todavia, os isolados 83, 92 e 98 demonstraram valores de EC50% acima de 5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, indicando uma menor sensibilidade ao fungicida. Destaca-se que o isolado 57 exibiu o menor

valor de EC50%, mostrando ser o mais sensível ao Tebuconazol. Ademias, a análise de variância revelou uma diferença significativa predominante no crescimento micelial dos isolados em relação à testemunha na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$.

Tabela 5 - Concentração Efetiva Média para 50% do crescimento micelial (EC50%) em relação ao tratamento controle (0 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) dos isolados de *Corynespora cassiicola* em meio de cultura com diferentes concentrações do fungicida Tebuconazol

Isolados	0 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	0,05 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	0,1 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	0,5 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	1 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	5 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	10 ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	EC50% ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)
3	25,85 a	20,10 a	17,14 a	19,50 a	18,58 a	12,43 b	10,84 b	0,219
10	23,22 a	23,59 a	21,13 a	23,14 a	21,16 a	15,02 a	12,91 a	0,514
40	23,89 a	24,09 a	21,57 a	22,40 a	21,51 a	12,78 a	16,01 a	2,591
45	20,75 a	20,72 a	20,75 a	20,95 a	20,60 a	14,9 a	12,42 b	21,042
51	20,75 a	22,06 a	22,72 a	18,94 a	20,91 a	14,58 a	16,60 a	12,158
57	26,62 a	17,64 a	18,67 a	15,09 a	18,04 a	13,31 b	07,07 b	0,413
74	24,92 a	18,81 a	21,44 a	19,26 a	16,59 a	12,98 a	12,31 b	13,852
80	25,99 a	20,14 a	24,22 a	21,92 a	15,55 a	12,01 b	16,55 a	5,533
83	21,04 a	23,56 a	24,98 a	20,79 a	19,13 a	04,77 b	10,17 b	5,086
92	24,01 a	20,45 a	22,50 a	20,65 a	19,46 a	12,00 b	07,29 b	5,702
98	21,07 a	19,37 a	21,82 a	20,11 a	19,15 a	10,53 b	08,34 b	5,753
99	26,19 a	23,42 a	24,77 a	24,26 a	20,56 a	13,27 a	09,76 b	2,411

Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem significativamente

CV (%) 3,72 $p < 0,05$

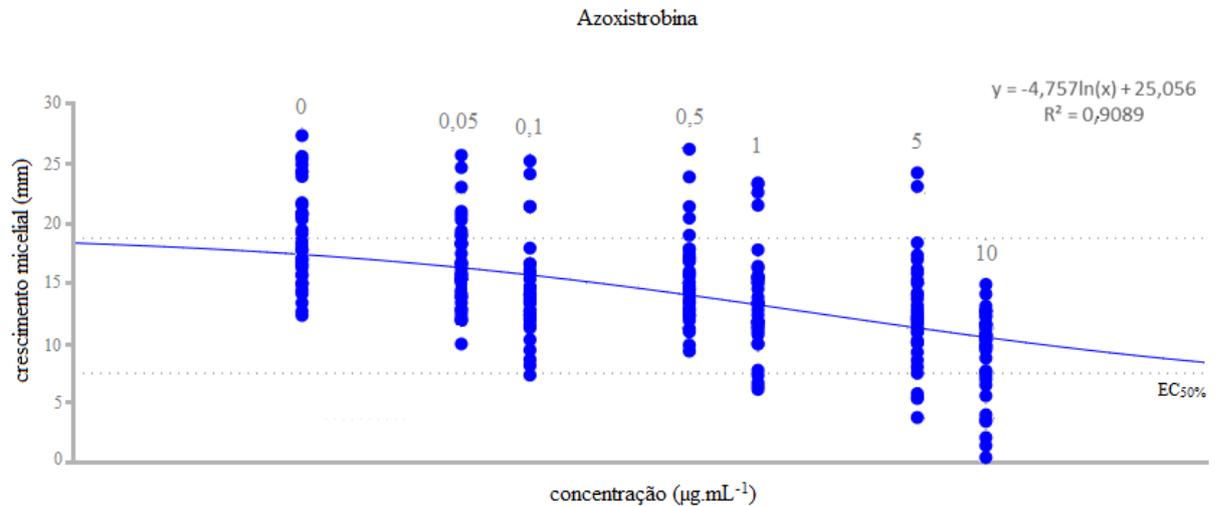
Fonte: De autoria própria (2023).

As curvas de regressão geradas a partir dos dados de crescimento micelial em relação às concentrações dos fungicidas apresentam valores de R^2 próximos de 1 para Azoxistrobina (Gráfico 1), Boscalida (Gráfico 2), Carbendazim (Gráfico 3) e Tebuconazol (Gráfico 4). Deste modo, indicam um bom ajuste da equação em relação aos dados originais coletados, demonstram uma relação inversamente proporcional entre o crescimento micelial e as concentrações testadas, e sugere que quanto maior a concentração do fungicida menor é o crescimento micelial observado. Isto indica que concentrações mais elevadas dos fungicidas têm um efeito mais pronunciado na inibição do crescimento micelial do fungo *C. cassiicola*.

Adicionalmente, observou-se o ponto de inflexão nas curvas dose-resposta nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ de Azoxistrobina (Gráfico 1), 10 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ de Boscalida (Gráfico

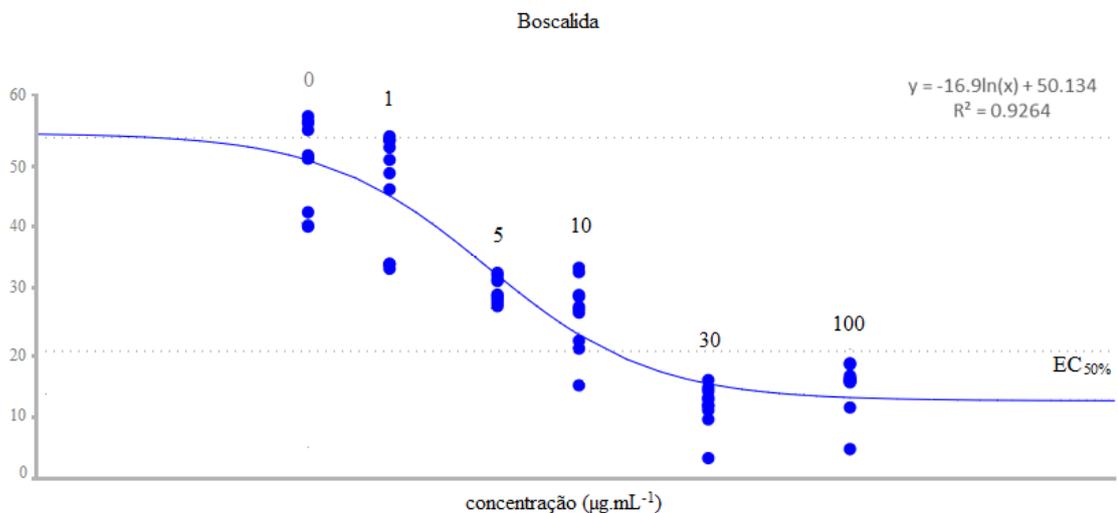
2), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Carbendazim (Gráfico 3) e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Tebuconazol (Gráfico 4). Nestas concentrações, salienta-se, ainda, o crescimento micelial 50% inferior em comparação com o tratamento testemunha sem fungicida. Esses resultados reforçam a eficácia dessas concentrações específicas na inibição do crescimento micelial *in vitro* do fungo *C. cassiicola*.

Gráfico 1 - Concentração do fungicida Azoxistrobina efetiva para a inibição de 50% do crescimento micelial (EC50%) de *Corynespora cassiicola*



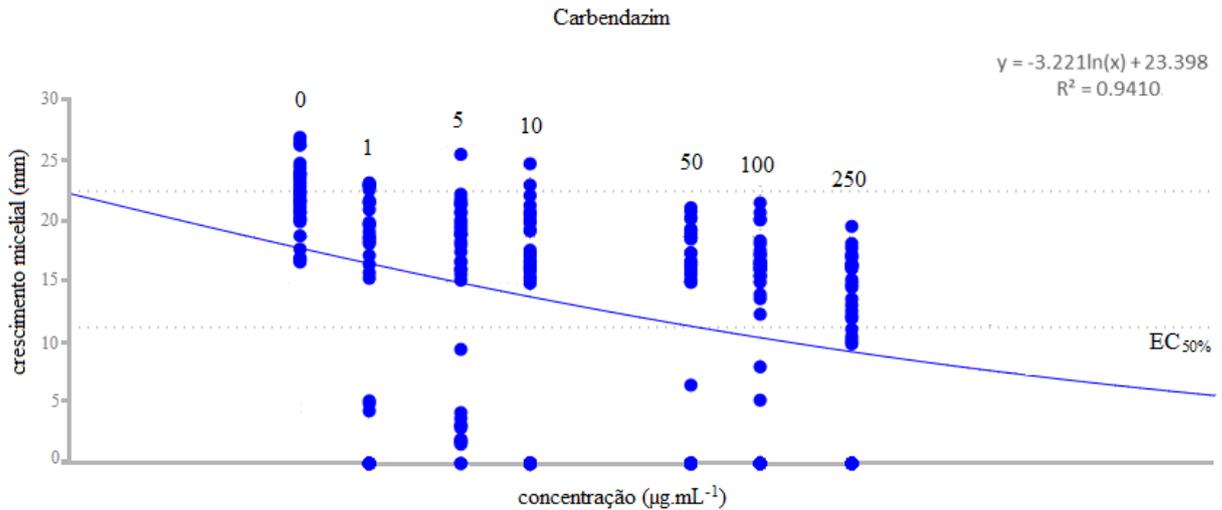
Fonte: De autoria própria (2023).

Gráfico 2 - Concentração do fungicida Boscalida efetiva para a inibição de 50% do crescimento micelial (EC50%) de *Corynespora cassiicola*



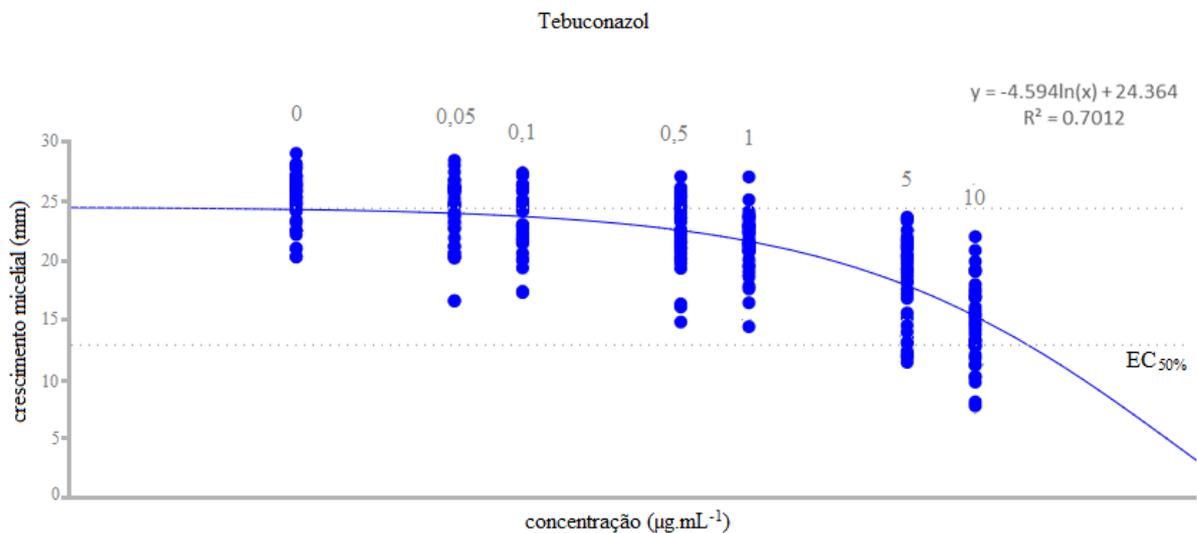
Fonte: De autoria própria (2023).

Gráfico 3 - Concentração do fungicida Carbendazim efetiva para a inibição de 50% do crescimento micelial (EC50%) de *Corynespora cassiicola*



Fonte: De autoria própria (2023).

Gráfico 4 - Concentração do fungicida Tebuconazol efetiva para a inibição de 50% do crescimento micelial (EC50%) de *Corynespora cassiicola*



Fonte: De autoria própria (2023).

O perfil de sensibilidade dos 69 isolados de *C. cassiicola* aos fungicidas Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol, foram expressos em termos de inibição do crescimento micelial (ICM%) e perfil de sensibilidade. Os resultados exibidos na Tabela 6 revelam a variabilidade na sensibilidade dos isolados de *C. cassiicola* aos fungicidas testados, permitindo a identificação dos diferentes perfis de sensibilidade entre os isolados (extremamente sensíveis (SS), sensíveis (S), resistentes (R) e extremamente resistentes (RR)) para todos os fungicidas testados.

Ao analisar os dados é possível observar que os valores de ICM% variam amplamente entre os isolados e os fungicidas testados, por exemplo, o isolado 28 demonstra alta sensibilidade (SS) a todos os fungicidas, enquanto o isolado 105 mostra resistência (R) ao Carbendazim. A variação de sensibilidade entre os fungicidas pode ter implicações importantes para o manejo e controle da mancha-alvo, visto que diferentes fungicidas podem ser mais ou menos eficazes contra determinados isolados.

A existência de variabilidade na sensibilidade dos isolados destaca a necessidade de monitorar e avaliar regularmente a sensibilidade de *C. cassicola* aos fungicidas utilizados. Esta variabilidade pode estar relacionada a fatores como adaptação genética, exposição prévia aos fungicidas e outras características intrínsecas do fungo. A monitoração contínua da sensibilidade é fundamental para evitar o surgimento e a disseminação de resistência.

Tabela 6 - Inibição do crescimento micelial (ICM%) e perfil de sensibilidade in vitro de *Corynespora cassiicola* aos fungicidas Azoxistrobina (1 µg/mL⁻¹), Boscalida (10 µg/mL⁻¹), Carbendazim (10 µg/mL⁻¹), e Tebuconazol (5 µg/mL⁻¹)

isolado	Azoxistrobina		Boscalida		Carbendazim		Tebuconazol	
	ICM %	Perfil de sensibilidade de	ICM %	Perfil de sensibilidade de	ICM %	Perfil de sensibilidade de	ICM %	Perfil de sensibilidade de
1	21,03	e R	43,64	c R	28,82	d R	74,87	a S
3	7,84	e RR	41,97	c R	23,72	d R	61,3	b S
5	31,59	d R	55,02	c S	100	a SS	75,67	a S
6	17,33	e RR	54,22	c S	100	a SS	60,03	b S
7	8,03	e RR	62,44	b S	15,98	e RR	58,44	b S
10	25,6	d R	71,8	b S	19,09	e RR	65,15	a S
14	7,72	e RR	73,62	b S	8,43	e RR	33,21	d R
15	30,6	d R	26,96	d R	100	a SS	70,41	a S
16	23,02	d R	35,3	d R	100	a SS	56,91	b S
19	5,29	e RR	49,87	c R	7,43	e RR	38,05	c R
21	77,9	b SS	68,13	b S	100	a SS	29,02	d R
23	12,14	e RR	57,53	c S	22,39	d R	40,75	c R
24	20,49	e R	65,04	b S	11,77	e RR	44,8	c R
26	69,36	b S	49,92	c R	22,32	d R	42,25	c R
27	10,01	e RR	59,43	c S	25,28	d R	53,92	b S
28	100	a SS	90,21	a SS	100	a SS	49,71	c R
29	12,48	e RR	58,02	b S	9,2	e RR	32,45	d R
30	69,98	b S	63,48	e S	100	a SS	44,43	c R
31	50,25	c S	0	c RR	49,28	b R	15,85	e RR
32	4,38	e RR	60,02	c S	18,62	e RR	63,82	a S
33	6,33	e RR	49,76	b R	21,17	d R	78,8	a S
34	2,5	e RR	70,89	a S	21,54	d R	49,17	c R
35	87,08	a SS	83,4	a SS	33,61	c R	57,92	b S
38	100	a SS	81,36	c SS	14,58	e RR	69,48	a S
39	20,52	e R	42,62	a R	15,71	e RR	57	b S
40	7,73	e RR	75,91	a S	25,83	d R	49,72	c R
42	8,36	e RR	86,26	b SS	25,68	d R	63,85	a S
44	25,64	d R	72,07	c S	20,74	d R	14,69	e RR
45	100	a SS	50,08	b S	23,62	c R	47,09	c R
46	5,05	e RR	63,21	b S	33,86	c R	62,02	b S
48	11,55	e RR	70,46	b S	31,57	b R	59,83	b S
49	12,87	e RR	64,46	c S	42,5	e R	29,63	d R
50	7,37	e RR	51,28	a S	15,05	e RR	45,99	c R
51	19,18	e RR	77,36	a S	9,96	e RR	44,47	c R
52	1,61	e RR	76,11	c S	17,71	e RR	69,07	a S
53	40,46	d R	47,97	c R	7,22	e RR	56,97	b S
54	25,36	d R	58,91	b S	9,37	a RR	67,64	a S
55	90,18	a SS	70,56	d S	100	a SS	37,51	c R
56	42,02	d R	37,2	b R	100	a SS	26,17	d R
57	37,09	d R	60,67	b S	100	a SS	43,97	c R
59	53,01	c S	66,92	c S	100	a SS	36,48	c R
60	40,39	d R	51,49	b S	100	a SS	53,3	b S
61	35,68	d R	69,09	b S	100	a SS	48,86	b R
62	19,13	e RR	73,91	c S	100	a SS	52,98	b S
64	26,3	d R	57,06	c S	100	a SS	50,76	b S
68	32,31	d R	54,17	c S	100	a SS	51,12	b S
72	65,13	b S	49,24	c R	100	a SS	59,53	c S
74	68,79	b S	55,7	c S	100	a SS	48,36	c R
75	42,33	d R	52,9	b S	100	e SS	44,76	c R
76	15,66	e RR	73,69	a S	13,24	a RR	48,57	c R
79	38,93	d R	80,6	c SS	100	a SS	44,81	b R
81	36,49	d R	47,58	a R	100	a SS	53,66	d S
83	25,78	d R	75,6	b S	100	e SS	34,11	d R

(continuação)

88	26,23	d	R	68,07	c	S	13,66	d	RR	32,65	c	R
89	13,23	e	RR	55,76	c	S	21,01	d	R	42,42	b	R
90	9,09	e	RR	59,45	c	S	21,5	e	R	53,3	b	S
91	39,93	d	R	56,05	b	S	15,66	e	RR	50,93	b	S
93	15,35	e	RR	70,79	b	S	10,09	e	RR	56,2	c	S
96	16,41	e	RR	67,84	c	S	7,4	e	RR	37,56	c	R
97	30,87	d	R	52,8	b	S	9,08	d	RR	44,48	a	R
98	0	e	RR	70,18	c	S	26,62	e	R	69,22	c	S
99	23,24	d	R	57,66	c	S	14,42	e	RR	47,25	c	R
101	3,5	e	RR	54,93	b	S	16,36	d	RR	48,11	a	R
102	13,64	e	RR	64,76	d	S	24,68	a	R	66,75	d	S
104	17,09	e	RR	37,74	d	R	100	a	SS	31,38	e	R
105	34,8	d	R	35,21	c	R	100	a	SS	15,94	b	RR
106	85,64	a	SS	56,51	b	S	100	d	SS	58,11	d	S
109	18,98	e	RR	70,53	c	S	27,09	d	R	34,27	a	R
110	24,21	d	R	51,89	b	S	20,55	e	R	71,68	a	S
CV%	14,4			13,5			13,1			15,88		

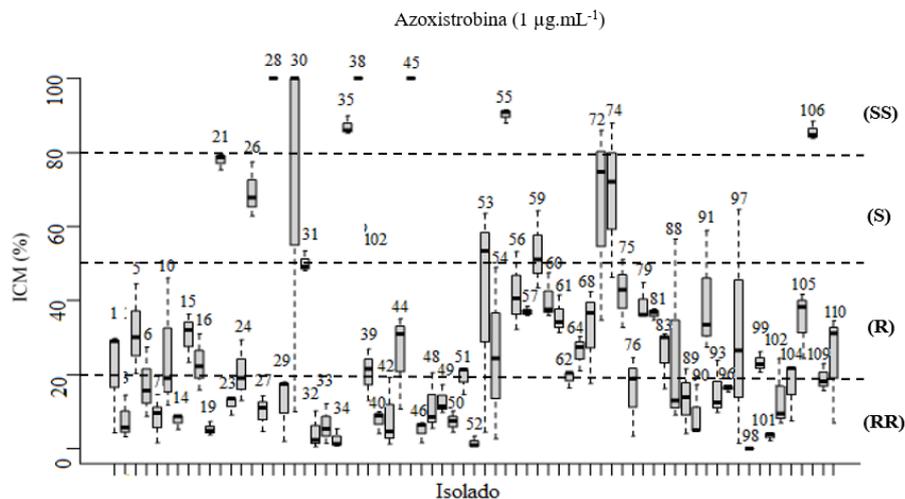
Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%

* SS = extremamente sensível quando ICM% > 80%, S = sensível quando 80% > ICM% > 50%, R = resistentes quando 50% > ICM% > 20%, RR = extremamente resistentes quando ICM% < 20%.

Fonte: De autoria própria (2023).

Azoxistrobina apresentou maior número de isolados com tendência à resistência *in vitro*, com 43,47% extremamente resistentes (RR), 37,68% resistentes (R), 8,69% sensíveis (S) e 10,14% extremamente sensíveis (SS) (Gráfico 5).

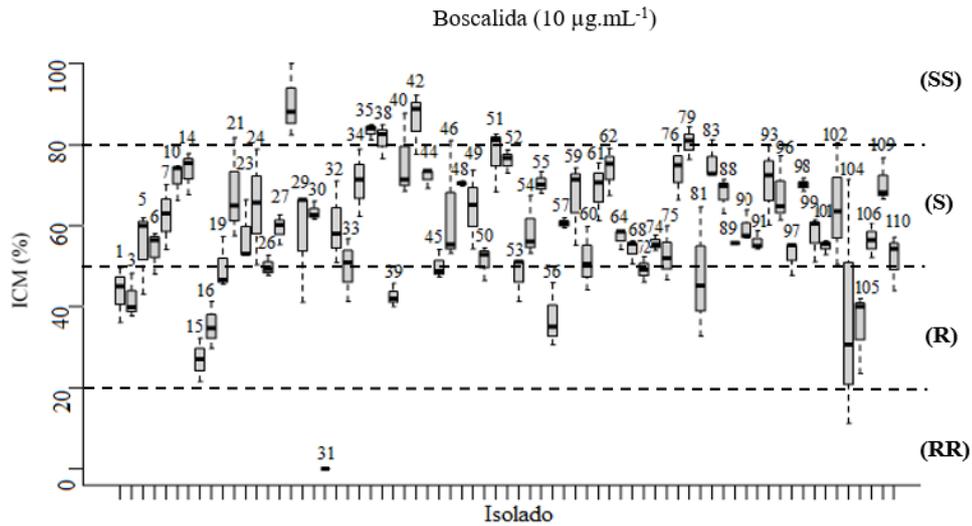
Gráfico 5 - Inibição de crescimento micelial (ICM%) de 69 isolados de *Corynespora cassiicola* ao fungicida Azoxistrobina na concentração 1 µg/mL⁻¹



Fonte: De autoria própria (2023).

Boscalida apresentou maior número de isolados com tendência à sensibilidade *in vitro*, com 71,01% dos isolados extremamente sensíveis (SS), 7,24% sensíveis (S), 20,28% resistentes (R) e 1,44% extremamente resistentes (RR) (Gráfico 6).

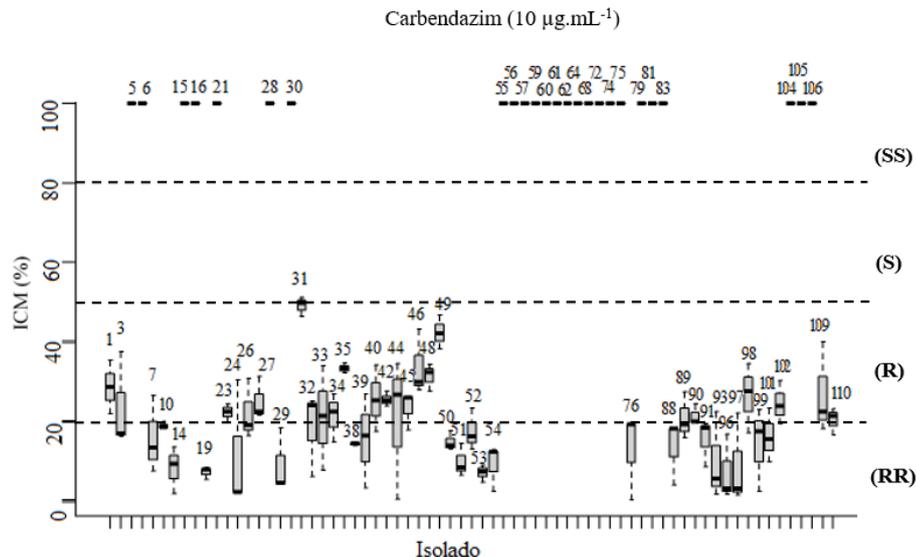
Gráfico 6 – Inibição de crescimento micelial (ICM%) de 69 isolados de *Corynespora cassiicola* ao fungicida Boscalida na concentração 10 µg/mL⁻¹



Fonte: De autoria própria (2023).

Carbendazim apresentou 36,23% dos isolados extremamente sensíveis (SS), nenhum isolado sensível (S), 31,88% resistentes ® e 31,88% extremamente resistentes (RR) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Inibição de crescimento micelial (ICM%) de 69 isolados de *Corynespora cassiicola* ao fungicida Carbendazim na concentração 10 µg/mL⁻¹

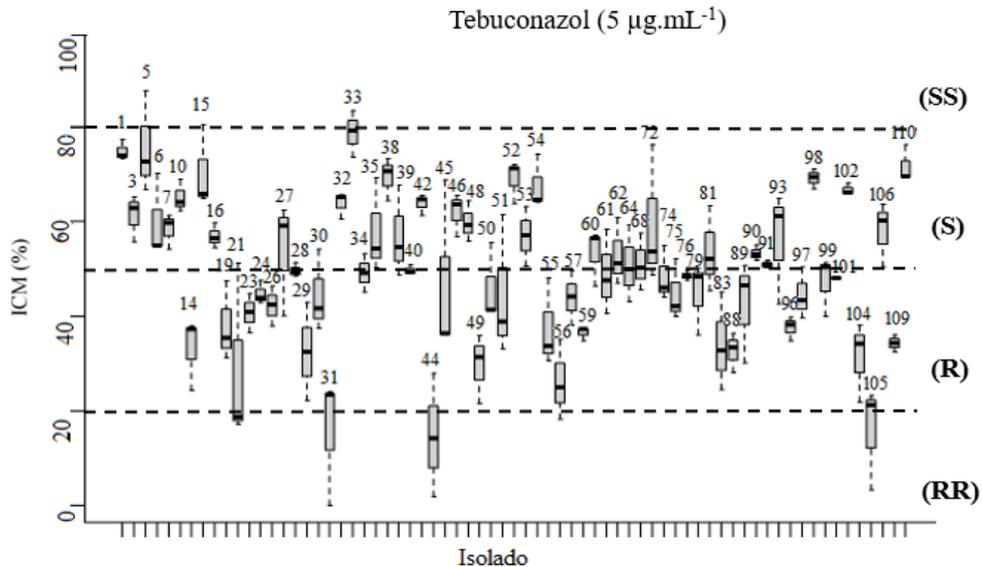


Fonte: De autoria própria (2023).

Tebuconazol apresentou nenhum isolado extremamente sensível (SS), 47,82% sensíveis (S), 47,82% resistentes ® e 4,34% extremamente resistentes (RR) (Gráfico 8).

(continuação)

Gráfico 8 - Inibição de crescimento micelial (ICM%) de 69 isolados de *Corynespora cassiicola* ao fungicida Tebuconazol na concentração 5 µg/mL-1



Fonte: De autoria própria (2023).

Houve, ainda, alta ocorrência de isolados resistentes a todos os fungicidas testados, indicando o aumento da pressão de seleção pelo uso indiscriminado dos fungicidas sistêmicos em altas doses ou subdosagens aplicadas repetidas vezes (ZAMBOLIM, 2008), bem como o favorecendo de indivíduos resistentes que já estavam presentes na população do microrganismo nas áreas do estudo. Pesquisas confirmam a ocorrência de resistência em *C. cassiicola*, aos fungicidas Azoxtrobina (ISHII *et al.*, 2007; MACKENZIE *et al.*, 2020; TERAMOTO *et al.*, 2011), Boscalida (MIYAMOTO *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2019), e Carbendazim (AVOZANI; REIS; TONIN, 2014; DUAN *et al.*, 2019; GODOY *et al.*, 2020; XAVIER *et al.*, 2013). O uso frequente de compostos químicos que atuam em locais específicos exerce pressão de seleção direcional sobre o fungo para se adaptar à nova condição e, conseqüentemente, o patógeno pode perder parcial ou totalmente sua sensibilidade aos fungicidas sistêmicos de alta especificidade.

Quando exposto a um determinado fungicida, o fungo pode apresentar diferentes respostas a depender de sensibilidade, capacidade de desenvolver resistência e outros fatores. Alguns fungos são suscetíveis a um determinado fungicida, respondendo rapidamente à aplicação e sofrendo danos ou morte. Outros tem uma menor sensibilidade ao fungicida, levando a uma resposta menos efetiva ou necessitando de doses mais altas para serem controlados (BARALDI *et al.*, 2022).

O comportamento do fungo pode variar de acordo com os fungicidas utilizados e seus diferentes modos de ação. Cada fungicida tem um alvo específico dentro do fungo e interfere

em processos metabólicos ou estruturais essenciais para a sobrevivência do organismo. Azoxistrobina é um fungicida que inibe a respiração mitocondrial, Boscalida inibe a síntese de lipídios, Carbendazim inibe a divisão celular e Tebuconazol inibe a biossíntese do ergosterol. Cada um destes fungicidas possui um modo de ação específico que interfere em processos vitais dos fungos e causa a morte ou supressão do crescimento (CARMONA; SAUTUA., 2017; FRAC, 2019; SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, 2023).

Quando um fungicida é utilizado repetidamente, os fungos que possuem resistência natural ou desenvolvem mutações que lhes conferem resistência têm uma vantagem seletiva. Esses fungos resistentes têm a capacidade de sobreviver e se multiplicar mesmo quando o fungicida é aplicado, enquanto as populações sensíveis são controladas. Com o tempo, a proporção de fungos resistentes aumenta e compromete a eficácia do fungicida (EDWARDS MOLINA *et al.*, 2022).

O uso repetido de um mesmo fungicida por um período prolongado proporciona a seleção de populações de fungos resistentes ao produto. Deste modo, reduz a eficácia e aumenta a ocorrência da resistência. No caso específico deste estudo, a Azoxistrobina, que apresentou o maior número de isolado resistentes, é utilizada para o controle de *C. cassicola* no Brasil desde 1998, a Boscalida, que apresentou o maior número de isolados sensíveis no estudo é utilizada desde 2004 (SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, 2023). Esta diferença no tempo de exposição em campo pode contribuir para a maior eficiência observada entre os fungicidas.

Ademais, fungos podem desenvolver resistência aos fungicidas ao longo do tempo, seja por meio de mutações genéticas ou pela seleção de variantes resistentes já presentes na população fúngica. Estas variantes resistentes têm a capacidade de sobreviver e se multiplicar mesmo na presença do fungicida, reduzindo a eficácia do controle (XAVIER *et al.*, 2021).

Um dos fatores que afeta a eficiência do controle químico da mancha-alvo de *C. cassicola*, é atribuído à presença de genótipos do fungo com a mutação G143A, uma alteração específica na sequência de nucleotídeos do gene do citocromo b do fungo. Essa mutação envolve a substituição de uma glicina (G) por uma alanina (A) na posição 143 da sequência de aminoácidos codificada por esse gene. O citocromo b é uma proteína presente nas mitocôndrias, desempenhando um papel crucial no transporte de elétrons durante a respiração celular. Essa proteína é alvo de alguns fungicidas, como a Azoxistrobina, que interferem na função do citocromo b, inibindo a respiração celular e levando à morte do fungo (AVOZANI, A.; REIS, E. M.; TONIN, 2014; DUAN *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2021; MACKENZIE *et al.*, 2020; MELLO *et al.*, 2022; SMITH; KELLY; LAMOUR, 2021; XAVIER *et al.*, 2021).

A resistência de populações de *C. cassiicola* ao fungicida Carbendazim ocorre devido presença de mutações específicas (E198A e F200Y) no gene da β -tubulina, uma proteína essencial na formação dos microtúbulos, estruturas fundamentais para a divisão celular e o crescimento dos fungos. O Carbendazim atua inibindo a montagem correta dos microtúbulos que impede a divisão celular e o desenvolvimento dos fungos patogênicos (DUAN *et al.*, 2019; MAO *et al.*, 2022; MELLO *et al.*, 2022; XAVIER *et al.*, 2021)

O Boscalida está atualmente registrado como um agente eficaz contra *C. cassiicola*, embora a resistência de populações do fungo em campo seja relatada dois anos após o lançamento do produto (MIYAMOTO *et al.*, 2009). Mecanismo de resistência foi encontrado associado às várias mutações pontuais diferentes em uma das subunidades (B, C ou D) do complexo SDH. Estas mutações incluíram a substituição de histidina (CAC) por tirosina (TAC) ou de histidina (CAC) por arginina (CGC) na posição 278 do aminoácido (SdhBH278Y/R) na subunidade SdhB; a substituição de serina (TCG) por prolina (CCG) na posição 73 (SdhC-S73P) na subunidade SdhC; e a substituição de serina (TCC) por prolina (CCC) ou de glicina (GGC) por valina (GTC) na posição 89 (SdhD-S89P) ou 109 na subunidade SdhD (SdhD-G109V) (MIYAMOTO *et al.*, 2010; NEVES; BRADLEY, 2021; SUN *et al.*, 2022b; ZHU, *et al.*, 2019; ZHU, *et al.*, 2022).

Embora não fora relatada a resistência de *C. cassiicola* especificamente ao fungicida Tebuconazol, na literatura existem relatos de resistência de *C. cassiicola* aos fungicidas DMI, que compartilham o mesmo modo de ação (MA *et al.*, 2020; ZHU, *et al.*, 2020). Isto destaca a importância de uma abordagem proativa no monitoramento da resistência, considerando a possibilidade de desenvolvimento de resistência cruzada entre os fungicidas de uma mesma classe e se enfatiza a importância do monitoramento contínuo para garantir o manejo eficaz das doenças causadas por este patógeno.

O monitoramento contínuo da resistência e a adoção de práticas de manejo integrado de doenças são essenciais para minimizar o desenvolvimento e a disseminação da resistência. Isto pode incluir o uso de diferentes modos de ação de fungicidas, rotação de culturas, adoção de boas práticas agrícolas e a utilização de técnicas de controle biológico. A compreensão dos mecanismos de resistência e o monitoramento adequado permitem o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo de doenças e a preservação da eficácia dos fungicidas para o controle de *C. cassiicola*.

4.2 EFICIÊNCIA DOS FUNGICIDAS SOBRE ISOLADOS RESISTENTES EM TOMATEIROS

A avaliação dos sintomas da mancha-alvo foi conduzida ao longo de um período de 16 dias e foi finalizada quando um ramo de uma unidade amostral alcançou a pontuação máxima na escala diagramática para a avaliação da severidade da mancha-alvo em folhas de tomateiro (PAIXÃO, 2014).

Os resultados apresentados na Tabela 7 do estudo revelam diferenças significativas na progressão da severidade da doença entre os tratamentos com os fungicidas e o tratamento controle (sem aplicação de fungicida), evidenciando que os fungicidas tiveram um efeito positivo no controle da mancha-alvo.

Além disso, foi observada uma diferença significativa na severidade da mancha-alvo entre os diferentes isolados dentro de cada tratamento, o que indica a presença de genótipos com perfis de resposta distintos à ação dos produtos fungicidas utilizados.

Tabela 7 - Severidade média e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) da mancha-alvo em tomateiros inoculados com *Corynespora cassiicola* resistentes a Azoxistrobina (1 µg mL⁻¹), Boscalida (10 µg mL⁻¹), Carbendazim (10 µg mL⁻¹), Tebuconazol (5 µg mL⁻¹)

isolado	Azoxistrobina			Boscalida			Carbendazim			Tebuconazol			Controle		
	severidade (%)	AAC PD		severidade (%)	AA CPD		severidade (%)	AAC PD		severidade (%)	AA CPD		severidade (%)	AAC PD	
19	33,32	b	151,67	50,00	a	234,67	30,00	b	87,08	10,60	c	61,25	48,32	a	135,83
23	50,00	a	157,08	19,23	b	74,53	50,00	a	134,17	32,82	b	191,25	37,50	a	135,42
31	30,82	b	46,25	24,02	b	32,54	10,82	c	22,92	13,32	c	59,17	42,50	a	146,67
39	48,32	a	243,75	14,55	b	70,44	36,00	b	111,67	0,00	c	0,00	50,00	a	150,83
50	34,16	b	145,42	9,96	b	60,00	26,82	b	54,58	50,00	a	218,75	46,66	a	138,33
53	29,16	b	152,92	13,00	b	68,95	5,00	c	17,50	0,00	c	0,00	50,00	a	146,25
89	3,34	c	19,17	4,20	c	20,82	0,00	c	0,00	0,00	c	0,00	26,66	b	58,75
97	0,00	c	0,00	2,23	c	10,20	0,00	c	0,00	4,84	c	21,25	33,32	b	155,42
101	6,60	c	33,33	22,80	b	47,83	0,00	c	0,00	4,50	c	25,00	26,66	b	76,25

CV = 13,64%

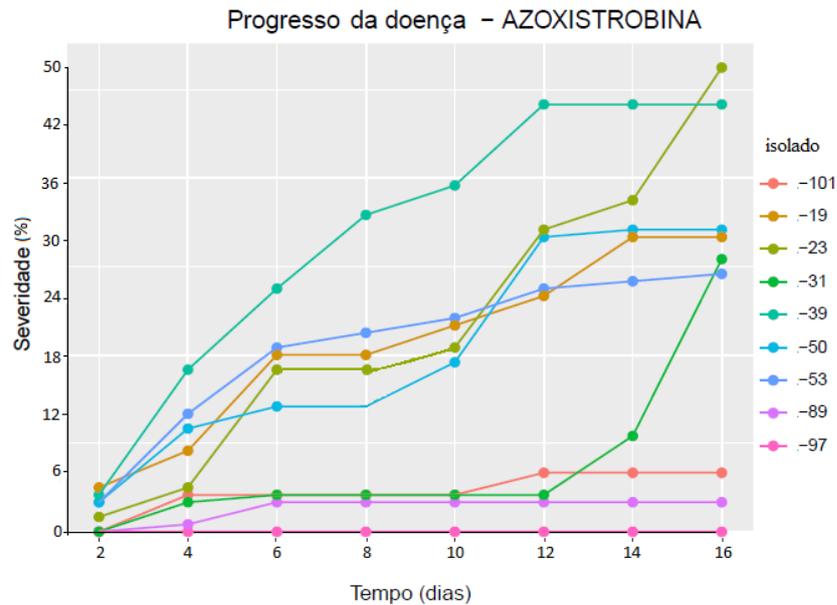
*Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%

Fonte: De autoria própria (2023).

Um fungicida com um menor valor de severidade indica uma maior eficácia no controle da doença e, ao mesmo modo, um fungicida com uma AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) menor indica um menor acúmulo da doença ao longo do tempo. Esses resultados destacam a importância de selecionar o fungicida adequado e ajustar a concentração de aplicação com base nos dos perfis genotípicos específicos da doença para obter um controle eficaz da mancha-alvo.

O tratamento com Azoxistrobina na concentração de 1 µg/mL⁻¹ (Gráfico 9) mostrou baixa eficácia no controle do progresso da severidade da mancha-alvo para os isolados 19, 23, 31, 39, 50 e 53. No entanto, apresentou alta eficácia para os isolados 89, 97 e 101, evidenciando a variabilidade na resposta dos isolados à ação específica deste fungicida em diferentes concentrações.

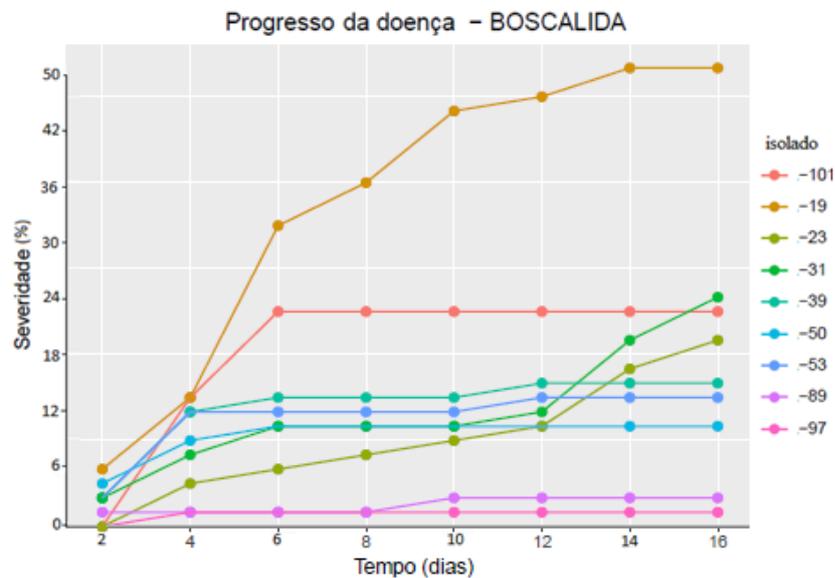
Gráfico 9 - Progresso da severidade de mancha-alvo causada pelos isolados de *Corynespora cassiicola* em tomateiro versus tempo (dias), observados no tratamento com Azoxistrobina na concentração 1 µg/mL⁻¹



Fonte: De autoria própria (2023).

O tratamento com Boscalida na concentração 10 µg/mL⁻¹ (Gráfico 10) mostrou baixa eficácia no controle do progresso da severidade da mancha-alvo para o isolado 19, eficácia moderada para os isolados 23, 31, 39, 50, 53, 101 e alta eficácia para os isolados 89 e 97.

Gráfico 10 - Progresso da severidade de mancha-alvo causada pelos isolados de *Corynespora cassiicola* em tomateiro versus tempo (dias), observados no tratamento com Boscalida na concentração 10 µg mL⁻¹

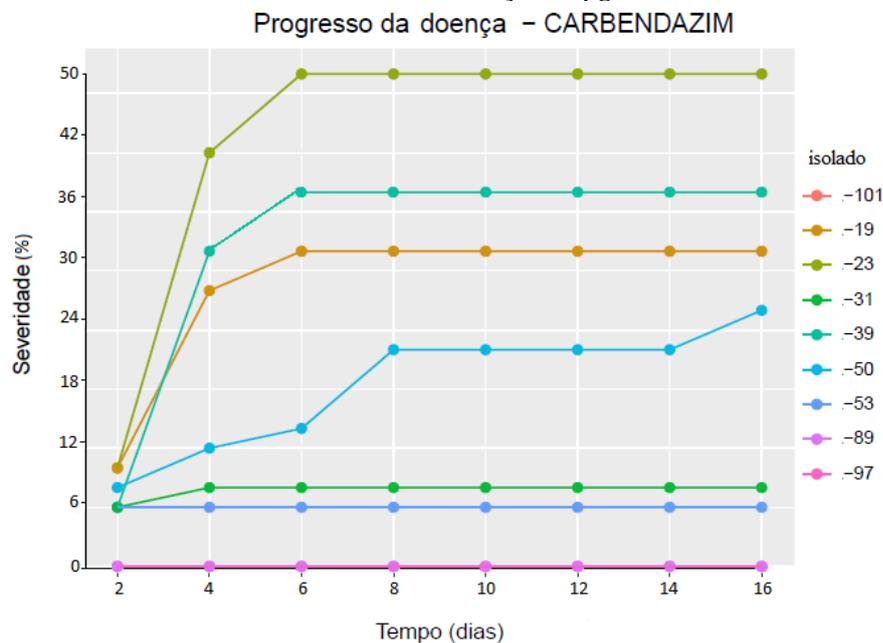


Fonte: De autoria própria (2023).

O tratamento com Carbendazim na concentração 10 µg mL⁻¹ (Gráfico 11) mostrou baixa eficácia no controle do progresso da severidade de mancha-alvo para os isolados 19, 23, 39, e 50 e alta eficácia para os isolados 31, 53, 89,97, e 101.

É fundamental ressaltar que, embora o Carbendazim tenha mostrado eficácia no controle da doença em plantas de tomate, é necessário levar em consideração as regulamentações e proibições de substâncias químicas que podem ocorrer ao longo do tempo. Com base na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 739/2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), publicada em agosto de 2022, o uso e a comercialização deste fungicida foram proibidos no Brasil. Portanto, é essencial estar ciente das atualizações das regulamentações e seguir as diretrizes estabelecidas pelos órgãos regulatórios competentes.

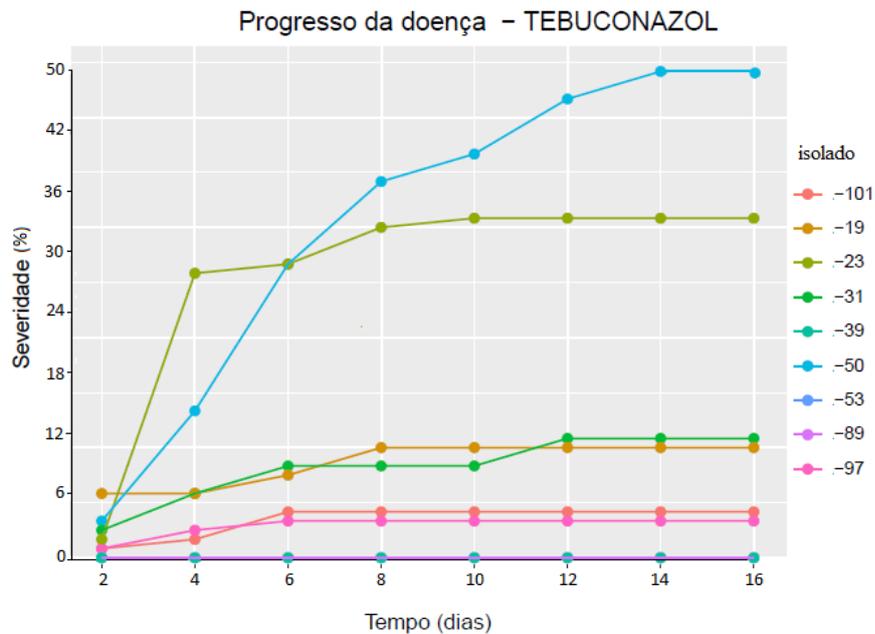
Gráfico 11 - Progresso da severidade de mancha-alvo causada pelos isolados de *Corynespora cassiicola* em tomateiro versus tempo (dias), observados no tratamento com Carbendazim na concentração 10 µg/mL-1



Fonte: De autoria própria (2023).

O tratamento com Tebuconazol na concentração 5 µg mL⁻¹ (Gráfico 12) demonstrou baixa eficácia no controle do progresso da severidade de mancha-alvo para os isolados 23 e 50 e alta eficácia para os isolados 19, 31, 39, 53, 89, 97, e 101.

Gráfico 12 - Progresso da severidade de mancha-alvo causada pelos isolados de *Corynespora cassiicola* em tomateiro versus tempo (dias), observados no tratamento com Tebuconazol na concentração 5 µg/mL-1



Fonte: De autoria própria (2023).

A eficácia dos fungicidas no controle da mancha-alvo causada por *C. cassiicola* é um tema de grande importância na agricultura e os resultados apresentados podem ser utilizados em estudos futuros ou em programas integrados de manejo de doenças na região amazônica.

Embora os fungicidas demonstrem eficácia no controle da doença para diversos isolados, é preocupante constatar que alguns isolados não foram adequadamente controlados. Esta falha de eficácia indica que a resposta mancha-alvo aos fungicidas é um fenômeno que está associada à presença de variedades resistentes do fungo.

A presença de variação na sensibilidade aos fungicidas entre os isolados de *C. cassiicola* revela a possibilidade da existência de variedades resistentes na área de estudo. A resistência aos fungicidas é um desafio crescente na agricultura moderna, e a diversidade genética do patógeno desempenha um papel crucial na seleção de indivíduos resistentes. Esta diversidade genética permite que alguns isolados de *C. cassiicola* apresentem características que os tornam mais ou menos suscetíveis aos efeitos dos fungicidas utilizados.

5 CONCLUSÕES

Foi identificada uma alta ocorrência de isolados do fungo *C. cassiicola* resistentes aos fungicidas Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol nos ensaios *in vitro*. Isto indica a presença de variantes resistentes do fungo na região metropolitana de Manaus, Amazonas, Brasil.

Entre os fungicidas testados, a Azoxistrobina foi o produto menos eficaz no controle de *C. cassiicola* nos ensaios de resistência *in vitro*, enquanto a Boscalida foi o mais eficaz. Estes resultados demonstram a importância de selecionar o fungicida adequado para um controle eficaz da doença.

Os ensaios *in vivo* mostraram diferenças significativas na severidade da mancha-alvo em tomateiros entre os tratamentos com os fungicidas Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol em comparação com o tratamento controle sem a adição de fungicida. Isto indica que os fungicidas têm um efeito positivo no controle da doença, mas a eficácia varia de acordo com o fungicida utilizado e a variedade do fungo.

Observou-se variação na sensibilidade aos fungicidas entre os isolados de *C. cassiicola* coletados em áreas de agricultura da região metropolitana de Manaus. Isto indica a presença de genótipos distintos do fungo com diferentes perfis de resistência aos fungicidas nestas populações.

Por fim, ressalta-se a importância de uma abordagem integrada no manejo da mancha-alvo, considerando a seleção adequada de fungicidas, o monitoramento da sensibilidade dos isolados e a adoção de medidas de controle que considerem a variabilidade genética do patógeno. Estas informações fornecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de manejo da doença e contribui para a sustentabilidade da agricultura na região amazônica.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. *et al.* Isolamento de fungos fitopatogênicos. *In*: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2016. p. 55-91.
- ALVESK. ec50estimator: an automated way to estimate EC50 for stratified datasets. R package version 0.2.0. **Github**, 2022. Disponível em: <https://github.com/AlvesKS/ec50estimator>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- AVOZANI, A.; REIS, E. M.; TONIN, R. B. Sensitivity loss by *Corynespora cassiicola*, isolated from soybean, to the fungicide Carbendazim. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 273-276, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1928>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/JRPw6yZmHVKCsbSP86VTcr/?lang=en#>. Acesso: 17 ago. 2023.
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: Editora Nacional, 1983. 288 p.
- BARALDI, A. L. M. *et al.* Sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom de alternária a fungicidas do grupo químico das estrobilurinas. **Citrus Research & Technology**, v. 42, E1065, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/crt.23222>. Disponível em: <https://citrusrt.cesm.br/journal/citrusrt/article/doi/10.4322/crt.23222>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- CARMONA, M.; SAUTUA, F. La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas: causas y efectos en cultivos extensivos. **Agronomía & Ambiente**, v. 37, n. 1, 2017. Disponível em: <http://agronomiayambiente.agro.uba.ar/index.php/AyA/article/view/60>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.
- CELLOTO, M. *et al.* Efeito de caldas sobre *Corynespora cassiicola*. **Nucleus**, v. 11, n. 2, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1007>. Disponível em: <https://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/1007>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- CORKLEY, I.; FRAAIJE, B.; HAWKINS, N. Fungicide resistance management: maximizing the effective life of plant protection products. **Plant Pathology**, v. 71, n. 1, p. 150-169, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13467>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.13467>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- DAL'SASSO, T. C. da S. *et al.* Genome sequences and in silico effector mining of *Corynespora cassiicola* CC_29 and *Corynespora olivacea* CBS 114450. **Archives of Microbiology**, p. 1-9, 2021. DOI: [10.1007/s00203-021-02456-7](https://doi.org/10.1007/s00203-021-02456-7). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34213598/>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- DUAN, Y. *et al.* Benzimidazole-and QoI-resistance in *Corynespora cassiicola* populations from greenhouse-cultivated cucumber: An emerging problem in China. **Pesticide**

biochemistry and physiology, v. 153, p. 95-105, 2019. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.11.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30744902/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

EDGINGTON, L. Y.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42-44, jan. 1971. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1971Articles/Phyto61n01_42.pdf. Acesso em: 17 ago. 2023.

EDWARDS MOLINA, J. P. *et al.* Soybean target spot caused by *Corynespora cassiicola*: a resurgent disease in the Americas. **Tropical Plant Pathology**, v. 47, n. 3, p. 315-331, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00495-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40858-022-00495-z>. Acesso em: 17 ago. 2023.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). **Pathogen Risk List**. Brussels, Belgium: FRAC, CropLife International, 2019. Disponível em: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

GODOY, C. V. *et al.* Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na cultura da soja, na safra 2019/2020: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica**, Embrapa Soja, n. 159, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1123555/eficiencia-de-fungicidas-para-o-controle-da-mancha-alvo-corynespora-cassiicola-na-cultura-da-soja-na-safra-20192020-resultados-sumarizados-dos-ensaios-cooperativos>. Acesso em: 17 ago. 2023.

GOMES, D. P. *et al.* Progresso temporal da brusone do trigo em função do inóculo primário, da aplicação de fungicida e da resistência dos genótipos. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 50-58, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/187354>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/V4VGW34yhxFSvNwmhyScG6Q/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Agropecuário 2017. **CensoAgro 2017**, c2017. Disponível em: <https://censoagro2017.ibge.gov.br/>. Acesso em: 13 abr. 2023.

ISHII, H., *et al.* Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. **Phytopathology**, v. 97, n. 11, p. 1458-1466, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-11-1458>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-97-11-1458>. Acesso em: 17 ago. 2023.

KOCH, R. Die Aetiologie der Tuberkulose. **Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte**. v. 2, p. 1-88. 1884.

LI, X. *et al.* Detection of a Point Mutation (G143A) in Cyt b of *Corynespora cassiicola* That Confers Pyraclostrobin Resistance. **Horticulturae**, v. 7, n. 6, p. 155, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7060155>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-7524/7/6/155>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MA, D. *et al.* Evaluation of sensitivity and resistance risk of *Corynespora cassiicola* to isopyrazam and mefentrifluconazole. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 2779-2785, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1094/PDIS-02-20-0384-RE>. Disponível em:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-02-20-0384-RE>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MACKENZIE, K. J. *et al.* Widespread QoI fungicide resistance revealed among *Corynespora cassiicola* tomato isolates in Florida. **Plant disease**, v. 104, n. 3, p. 893-903, 2020. DOI:
<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0460-RE>. Disponível em:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-03-19-0460-RE>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MAO, Y. *et al.* Evolution of Benzimidazole Resistance Caused by Multiple Double Mutations of β -Tubulin in *Corynespora cassiicola*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 48, p. 15046-15056, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05912>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.2c05912>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MELLO, F. E. de *et al.* Resistance of *Corynespora cassiicola* from soybean to QoI and MBC fungicides in Brazil. **Plant Pathology**, v. 71, n. 2, p. 373-385, 2022. DOI:
<https://doi.org/10.1111/ppa.13474>. Disponível em:
<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.13474>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MELO, M. M. de; REIS, E. M. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* em soja, limiares térmicos e temperatura ótima para a germinação de conídios em meio de cultura. *Summa Phytopathologica*, v. 36, p. 254-256, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000300014>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/sp/a/BmLQWBGzBnYw3CGzRmCcChK/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MENDIBURU, F. de; YASEEN, M. *Agricolae: statistical procedures for agricultural research*. **R package**, v. 1.4.0, 2020.

MIYAMOTO, T. *et al.* Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. **Plant Pathology**, v. 58, n. 6, p. 1144-1151, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x>. Disponível em:
<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x>. Acesso em: 17 ago. 2023.

NEVES, D. L.; BRADLEY, C. A. Baseline sensitivity of *Cercospora sojina* and *Corynespora cassiicola* to pydiflumetofen. **Crop Protection**, v. 147, p. 105461, 2021. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105461>. Disponível em:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026121942030394X?casa_token=XP4OluwQi4UAAAAA:ni-NYfivY5_NubKBMPtbJ9FhXmLIDMIWkjXkCqsbNaE96M8-guSol6U1ElFxt1P8rccAEaMh9Q. Acesso em: 17 ago. 2023.

PAIXÃO, A. C. de C. **Efeito da luz transmitida através de coberturas coloridas transparentes sobre a mancha-alvo do tomateiro**. 2014. Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico úmido) – Programa de Pós-graduação, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, Manaus, Amazonas, 2014. Disponível em:
<https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/5229>. Acesso em: 17 ago. 2023.

RUSSELL, P. E. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management**. Brussels, Belgium: Crop Life International, 2002. Disponível em:

<https://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-3.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Agrofit: sistema de agrotóxicos fitossanitários. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, 2023. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2021. *E-book*.

SMITH, T. M.; KELLY, H. Y.; LAMOUR, K. H. Detection of the G143A Mutation in the Cytochrome b Gene of *Corynespora cassiicola* Isolates from Soybean in Tennessee. **Plant Health Progress**, v. 22, n. 4, p. 570-572, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHP-04-21-0072-BR>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHP-04-21-0072-BR>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SUN, B. *et al.* Double mutations in succinate dehydrogenase are involved in SDHI resistance in *Corynespora cassiicola*. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 132, 2022a. DOI: 10.3390/microorganisms10010132. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35056581/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SUN, B. *et al.* Rapidly increasing boscalid resistance in *Corynespora cassiicola* in China. **Phytopathology**, v. 112, n. 8, p. 1659-1666, 2022b DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-21-0503-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHYTO-12-21-0503-R>. Acesso em: 17 ago. 2023.

TEAM, R. Development Core. A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>, 2009.

TERAMOTO, A. *et al.* In vitro sensitivity of *Corynespora cassiicola* isolated from soybean to fungicides and field chemical control of target spot. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 281-289, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2195>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/gdkF9hKBY7Yr5n4BpWL4N8n/?lang=en#>. Acesso em: 17 ago. 2023.

TERAMOTO, A. *et al.* Reaction of hybrids, inhibition in vitro and target spot control in cucumber. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 342-348, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/n6GqTYNFBWqThBxLvmkcyFf/?lang=en&format=pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

WANG, X. *et al.* Defining fungicide resistance mechanisms in the *Corynespora cassiicola* population from Mississippi soybean. **Plant Disease**, aug./2023. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-22-1297-RE>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-06-22-1297-RE>. Acesso em: 17 ago. 2023.

WICKHAM, H. ggplot2. **WIREs Computational Statistics**, v. 3, n. 2, p. 180-185, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/wics.147>. Disponível em: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wics.147>. Acesso em: 17 ago. 2023.

XAVIER, S. A. *et al.* Microtiter method to monitor *Corynespora cassiicola* and sensitivity of the pathogen to Carbendazim, prothioconazole and pyraclostrobin. **Crop Protection**, 144, 105554, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105554>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219421000247?via%3Dihub>. Acesso em: 17 ago. 2023.

XAVIER, S. A. *et al.* Sensitivity of *Corynespora cassiicola* from soybean to Carbendazim and prothioconazole. **Tropical plant pathology**, v. 38, n. 5, p. 431-435, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013005000020>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/tpp/a/LHMgZgJv43Ltf7sMmxznHLy/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas. In.: ZAMBOLIM, L. *et al.* **Produtos fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acariciados e herbicidas)**. Viçosa, MG: UFV/DFP, 2008. p. 213-261.

ZHU, F. *et al.* Occurrence, distribution, and characteristics of boscalid-resistant *Corynespora cassiicola* in China. **Plant disease**, v. 103, n. 1, p. 69-76, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1760-RE>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-11-17-1760-RE>. Acesso em: 17 ago. 2023.

ZHU, J. *et al.* Baseline sensitivity of *Corynespora cassiicola* to metconazole and efficacy of this fungicide. **Crop protection**, v. 130, p. 105056, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105056>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219419304028>. Acesso em: 17 ago. 2023.

ZHU, J. *et al.* SDH mutations confer complex cross-resistance patterns to SDHIs in *Corynespora cassiicola*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 186, p. 105157, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105157>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048357522001249>. Acesso em: 17 ago. 2023.

CAPÍTULO 2: DIVERSIDADE FILOGENÉTICA DE *CORYNESPORA CASSIICOLA* NA REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS AMAZONAS, BRASIL

RESUMO

A alta variabilidade genética do fungo *Corynespora cassiicola* é uma característica importante que permite que o fungo se adapte a diferentes ambientes e hospedeiros. Isto pode tornar a doença mais difícil de ser controlada e gerar desafios para o manejo. A caracterização molecular de *C. cassiicola* é uma estratégia importante para entender a diversidade genética do fungo e a possível especialização em diferentes plantas hospedeiras e regiões geográficas. Estudos filogenéticos são importantes para identificar a diversidade genética e a possível especialização do fungo, visando a aplicação dessas informações em estratégias para otimizar programas de manejo integrado de doenças. Objetivou-se caracterizar molecularmente isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes plantas hospedeiras e municípios do Amazonas, a partir da construção de árvores filogenéticas com base nas regiões genômicas rDNA ITS, CAA5, GA4 e ACT1. Confirmou-se a existência de duas linhagens bem definidas de *C. cassiicola* no Amazonas, correlacionadas com as linhagens PL1 e PL4 de sequências de referência identificadas na literatura, sugerindo que estas evoluíram a partir de uma população ancestral comum.

Palavras-chave: *Corynespora cassiicola*, Caracterização molecular, Diversidade genética. Filogenia, Agricultura tropical.

1 INTRODUÇÃO

Epidemias severas da mancha-alvo, causada por *Corynespora cassiicola*, em uma ampla gama de plantas hospedeiras são cada vez mais evidente, influenciadas pelas mudanças climáticas e pelo processo de intensificação dos sistemas produtivos na agricultura. Este fungo coevoluiu com seus hospedeiros influenciado pelas condições ecológicas. Qualquer alteração na população predominante do hospedeiro pode resultar em mudanças subsequentes na população do patógeno (BANGUELA-CASTILHO *et al.*, 2020).

A variabilidade genética é uma característica essencial em *C. cassiicola*, pois confere diversidade de formas alternativas de um mesmo gene nos indivíduos da espécie. Esta variabilidade genética resulta em diferenças morfológicas e fisiológicas que permitem aos indivíduos responder de diferentes maneiras às mudanças ambientais (DEMARTELAERE *et al.*, 2020). *C. cassiicola* é uma espécie cosmopolita com alta variabilidade genética que lhe confere uma ampla capacidade de adaptação às diferentes condições climáticas e tipos de plantas, possibilitando sua sobrevivência em ambientes diversos (RONDON; LAWRENCE, 2019).

A correta caracterização e compreensão da variabilidade genética de *C. cassiicola* são elementos essenciais para análises ecológicas e para o desenvolvimento de medidas de manejo da doença (SHIMOMOTO *et al.*, 2011). Classificado como um fungo mitospórico da classe Ascomycota, *C. cassiicola* não apresenta reprodução sexuada e produz esporos assexuados denominados conídios. A alta variabilidade genética deste organismo está associada aos processos de mutações espontâneas dentro das populações (SUMABAT *et al.*, 2018).

Nesse contexto, é fundamental obter conhecimento sobre as variedades existentes em *C. cassiicola* por meio de levantamentos sistemáticos que reconstituam a origem, diversificação e relações genéticas dos organismos. Os estudos filogenéticos, baseados no sequenciamento de dados moleculares, são considerados os métodos mais eficientes para traduzir estas informações. Combinados com a bioinformática, os diagnósticos permitem a análise rápida e precisa das características genéticas de um organismo (JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

O princípio filogenético classifica as espécies de acordo com padrões de variação genética herdada de um ancestral comum. A partir disto, linhagens são definidas por agrupamentos cladísticos representados em árvores filogenéticas, em que são agrupados os organismos que compartilham um ancestral comum e apresentam mutações similares. Essas informações são importantes para apoiar a tomada de decisões em programas de manejo

integrado de doenças, possibilitando a detecção da ocorrência de novas combinações gênicas de virulência (JAYAWARDENA *et al.*, 2021).

Um dos principais objetivos dos estudos filogenéticos é identificar a variabilidade genética dos organismos-praga em diferentes ambientes, assim como a presença de diferentes linhagens patogênicas. Estes estudos visam compreender a origem, diversidade genética, possíveis especializações das espécies, relações com as plantas hospedeiras e a capacidade de resistência ao uso de fungicidas (HORIIKE, 2016).

Um estudo pioneiro forneceu uma amostragem global da variabilidade genética desta espécie, identificando seis linhagens filogenéticas relacionadas ao hospedeiro de origem e patogenicidade, independentemente da origem geográfica, evidenciando um recente movimento global do fungo (DIXON *et al.*, 2009).

Estudos posteriores demonstraram que a diversidade de *C. cassiicola* está relacionada à especialização do hospedeiro. Os perfis de virulência variam significativamente de acordo com essa especialização. Isto sugere o envolvimento de mecanismos genéticos específicos reconhecidos por uma gama limitada de hospedeiros compatíveis (BANGUELA-CASTILLO *et al.*, 2020; DÉON *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2018).

Esta pesquisa realiza a caracterização molecular de isolados de *C. cassiicola* provenientes de diferentes plantas hospedeiras e municípios do Amazonas, por meio do sequenciamento multilocus das regiões genômicas rDNA ITS, CAA5, GA4 e ACT1, e identifica possíveis linhagens filogenéticas do fungo. Essa caracterização molecular fornecerá informações importantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo da mancha-alvo.

Ao compreender a variabilidade genética de *C. cassiicola*, é possível melhorar as análises ecológicas e direcionar medidas de manejo mais eficazes e desenvolver estratégias direcionadas para o controle da doença, adaptando práticas culturais, tratamentos químicos e seleção de plantas resistentes partir da abordagem filogenética. Pode-se identificar linhagens específicas e suas características genéticas, auxiliando na tomada de decisões para o controle da mancha-alvo. Essas informações são valiosas para a implementação de medidas de manejo integrado e para garantir a sustentabilidade da produção agrícola frente aos desafios impostos por esse fitopatógeno.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a existência de diferentes linhagens filogenéticas do fungo *C. cassicola* no estado do Amazonas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar linhagens filogenéticas de *C. cassicola* com base na filogenia das regiões genômicas rDNA ITS, CAA5, GA4 e ACT1.

Avaliar se há isolados de *C. cassicola* resistentes a fungicidas nas linhagens filogenéticas identificadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

As coletas de material vegetal com sintomas da mancha-alvo foram realizadas em propriedades rurais dos municípios de Manaus, Iranduba, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo, no estado do Amazonas. Foram obtidos 110 isolados de *C. cassiicola* a partir de folhas de tomateiro, pepino e mamoeiro com sintomas de mancha-alvo, descritos anteriormente na Tabela 1 do Capítulo 1. O isolamento, a obtenção de isolados monospóricos e a preservação dos isolados foram feitos conforme descrito no Capítulo 1, Seção 3, Subseção 3.1.

3.2 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi obtido a partir dos isolados de *C. cassiicola* cultivados em placas de Petri contendo meio V8 (200 mL de suco de vegetais V8 "CAMPBELL Soup Co."; 16 g de ágar; 3,2 g de CaCO₃ e 800 mL de água destilada), mantidas sob temperatura ambiente (± 26 °C) durante 10 dias. O micélio crescido nas placas foi recolhido e macerado com nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilos esterilizados até que o material atingisse a consistência de um pó fino. A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo CTAB 2% (DOYLE; DOYLE, 1987, *adaptado*).

A extração de DNA foi realizada com 100 mg do material macerado, o qual foi acondicionado em microtubo de 2 mL, contendo 600 μ L de tampão de extração (CTAB 2%). Os tubos foram agitados durante 20 segundos, imersos em banho maria à 65 °C durante 30 minutos e homogeneizados por inversão manual a cada 10 minutos. Após este período, foram resfriados em gelo por 5 minutos e adicionados ao microtubo 500 μ L da solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 3 minutos, e logo após recolhida a fase aquosa (sobrenadante), que foi transferida para novos tubos contendo 500 μ L da solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitado-o por 20 segundos e centrifugando a 14000 rpm, durante 3 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo microtubo, no qual foram adicionados 600 μ L de isopropanol (-20 °C). A seguir, os microtubos foram colocados em freezer (-20 °C) por 4 horas para formar os *pellets* do DNA (DNA sedimentado no fundo do tubo), que foram centrifugados a 14000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado em 500 μ L de etanol 75% e etanol 95%. Os microtubos foram centrifugados novamente a 14000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o microtubo com o *pellet* colocado para secar em câmara de fluxo laminar até não conter mais traços de etanol. O pellet foi dissolvido em 50 μL de água destilada e armazenado em freezer ($-20\text{ }^\circ\text{C}$). A extração do DNA foi confirmada em gel de agarose (0,8%) e o tamanho do fragmento de DNA estimado com o marcador de peso molecular de 100 pb (Sinapse). A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de ultravioleta (Loccus Biotecnology[®]).

Para a quantificar o DNA, foi utilizado espectrofotômetro NanoDrop[®] 2000 (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica adotada de 260 nm e concentração final ajustada para 50 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. O DNA foi quantificado via eletroforese em gel de agarose (0,8%), usando como referência o marcador de peso molecular de 100 pb (Sinapse) e armazenados em freezer ($-20\text{ }^\circ\text{C}$).

3.3 PCR E SEQUENCIAMENTO

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi feita conforme os trabalhos Dixon *et al.* (2009), Déon *et al.* (2014), Banguela-Castillo *et al.* (2020), Aguiar *et al.* (2022), utilizando as regiões do espaçador transcrito interno de rDNA (ITS), citocromo oxidase (CAA5), giberelina desaturase (GA4) e actina (ACT1). A região rDNA (ITS) foi escolhida por ser o barcode universal de fungos, enquanto as regiões CAA5, GA4 foram escolhidas por serem *loci* hipervariáveis relacionados a designação de linhagens filogenéticas, enquanto a ACT1 por ser uma região polimorfismos de nucleotídeo único que influenciam nos traços genotípicos em *C. cassicola*.

As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 12 μL , com 1 μL de DNA, 2,4 μL de tampão incolor Go Taq[®] Flexi (5X), 0,8 μL de MgCl_2 (25 mM), 0,5 μL de dNTPs (10 mM), 1 μL de iniciadores (0,5 μM *primer* Forward + 0,5 μM *primer* Reverse) (Figura 1), 0,12 μL da enzima GoTaq[®] Colorless (Promega) e 6,18 μL de água deionizada. Para evitar contaminação dos reagentes, foram preparados controles negativos, substituindo o DNA por água deionizada no preparo da reação. A sequência dos primers e o tamanho dos fragmentos (pares de bases) esperados estão listados na Quadro 1.

Quadro 1 - Lista de primers usados no sequenciamento do DNA de *Corynespora cassiicola*

<i>Primers</i>	Sequências (5' - 3')	Gene Alvo	fragmento (pb)
ITS1F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	rDNA ITS	600 ^a
ITS4R	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	rDNA ITS	
GA4F	5' CCTGCTCCGACTTTGAG 3'	GA4	400 ^b
GA4R	5' CCTCGTCTGCCAGTTCTTCT 3'	GA5	
CAA5F	5' GTCCACAAGTGGAACCTCGT 3'	CAA5	300 ^b
CAA5R	5' CCTCGTCTGCCAGTTCTTCT 3'	CAA6	
ACT-512F	5' ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC 3'	ACT1	300 ^c
ACT-783R	5' TACGAGTCCTTCTGGCCCAT 3'	ACT1	

Fonte: ^aWhite *et al.* (1990), ^bBanguela-Castillo *et al.* (2020), ^cCarbone e Kohn (1999).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biosystem® (MG96G) e as condições utilizadas para amplificação das regiões rDNA (ITS), CAA5, GA4 foram um ciclo inicial de desnaturação à 94 °C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94 °C, anelamento dos *primers* à 58 °C por 30 segundos, extensão à 72 °C por 45 segundos, finalizando com um ciclo de extensão final à 72 °C por 5 minutos. As condições utilizadas para amplificação da região ACT1 são idênticas as demais com exceção da temperatura de anelamento dos *primers* de 61 °C (DIXON, 2009). Os amplicons gerados foram verificados em gel de agarose (1,2%), corados com Gel Red™ (Biotium), usando como referência o marcador de peso molecular 1k Plus (Sinapse).

A purificação dos produtos da PCR foi realizada adicionando-se 2 µL de reagente ExoSAPIT™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) e 5 µL do produto de PCR. A amostra foi incubada a 37 °C por 4 minutos para degradar os excessos de *primers* e nucleotídeos, em seguida, foi incubada a 80 °C por 1 minuto para inativar o reagent ExoSAP-IT™. O produto de PCR purificado foi utilizado para sequenciamento de DNA. A reação de sequenciamento foi feita com o kit de sequenciamento BigDye™ Terminator v3.1 (1,8 µL de tampão BigDye™; 0,4 µL de enzima BigDye™; e 0,2 µL de primer F BigDye™). O sequenciamento das amostras foi feito no sequenciador automático ABI 3130 Applied Biosystems® no Laboratório de Biodegradação da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

3.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento foram analisados com o programa SeqAssem® (HEPPERLE, 2004). As sequências foram implementadas no Programa

MEGA7 (KUMAR *et al.*, 2016), alinhadas com a ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004), e submetidas a análise comparativa com sequências de material de referência, depositadas no National Center for Biotechnological Information (NCBI) utilizando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências que exibiram identidade superior a 95% em relação às sequências obtidas neste estudo, foram baixadas para serem incluídas nos agrupamentos das sequências utilizadas para as análises filogenéticas. Foram usados como *outgroup* as espécies *Corynespora smithii* (CABI5649b), *Corynespora proliferata* (CBS112393) e *Corynespora olivacea* (CBS291.74) (Quadro 2).

Quadro 2 - Sequências de referência utilizadas neste estudo para a construção das filogenias de isolados de *Corynespora cassicola* do estado do Amazonas

Isolados	Hospedeiros	Origem	Número de acesso do gene no GenBank®			
			CAA5	GA4	ITS	ACT
YP 59	<i>Ipomea batatas</i>	Yap	FJ853002	FJ852859	FJ852716	FJ853141
PW 69	<i>Piper betle</i>	Palau	FJ852966	FJ852823	FJ852680	FJ853105
YP 27	<i>Cucumis sativus</i>	Yap	FJ852997	FJ852854	FJ852711	FJ853136
SN64	<i>Asystasia gangetica</i>	Saipan	FJ852990	FJ852847	FJ852704	FJ853129
RWB321	<i>Glycine Max</i>	Brasil	FJ852878	FJ852735	FJ852592	FJ853021
NIAS 712045	<i>Solanum melogena</i>	Japão	FJ852885	FJ852742	FJ852599	FJ853024
GU99	<i>Saintpaulia ionantha</i>	Guam	FJ852943	FJ852800	FJ852657	FJ853082
SN48	<i>Coccinia grandis</i>	Saipan	FJ852987	FJ852844	FJ852701	FJ853126
AS49	<i>Solanum lycopersicum</i>	Samoa Americana	FJ852860	FJ852717	FJ852574	FJ853003
AS117	<i>Carica papaya</i>	Samoa Americana	FJ852872	FJ852729	FJ852586	FJ853015
BZ DOA16b	<i>Carica papaya</i>	Brasil	FJ852874	FJ852731	FJ852588	FJ853017
AS58	<i>Vigna unguolata</i>	Samoa Americana	FJ852863	FJ852720	FJ852577	FJ853006
GU70	<i>Solanum melogena</i>	Guam	FJ852936	FJ852793	FJ852650	FJ853075
SN 59	<i>Lantana Camara</i>	Saipan	FJ852989	FJ852846	FJ852703	FJ853128
GU111	<i>Manihot esculenta</i>	Guam	FJ852912	FJ852769	FJ852626	FJ853051
BZ JMP217	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	FJ852876	FJ852733	FJ852590	FJ853019
SN37	<i>Vigna unguolata</i>	Saipan	FJ852984	FJ852841	FJ852698	FJ853123
CABI5649b	<i>Fagus sylvatica</i>	Inglaterra	FJ852883	FJ852740	FJ852597	-
CBS112393	<i>Fagus sylvatica</i>	Itália	FJ852882	FJ852739	FJ852596	-
CBS291.74	<i>Tilia spp.</i>	Holanda	FJ852881	FJ852738	FJ852595	FJ853022

Fonte: De autoria própria (2023).

Os arquivos foram implementados no programa Sequence Matrix 1.7.8[©] para análise individual e concatenada dos dados referentes as regiões genômicas rDNA ITS, CAA5, GA4 e ACT1. Os dados obtidos foram inseridos no portal CIPRES Science Gateway V. 3.3 (<https://www.phylo.org/>) para a construção das árvores filogenéticas, a partir do método

Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood – ML) utilizando a ferramenta RAxML-HPC v.8 on XSEDE (Stamatakis, 2014), e a robustez das árvores foi calculada mediante uso do método de *bootstrap*, com 1000 pseudoréplicas. A visualização das árvores filogenéticas foi feita no *software* MEGA7.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

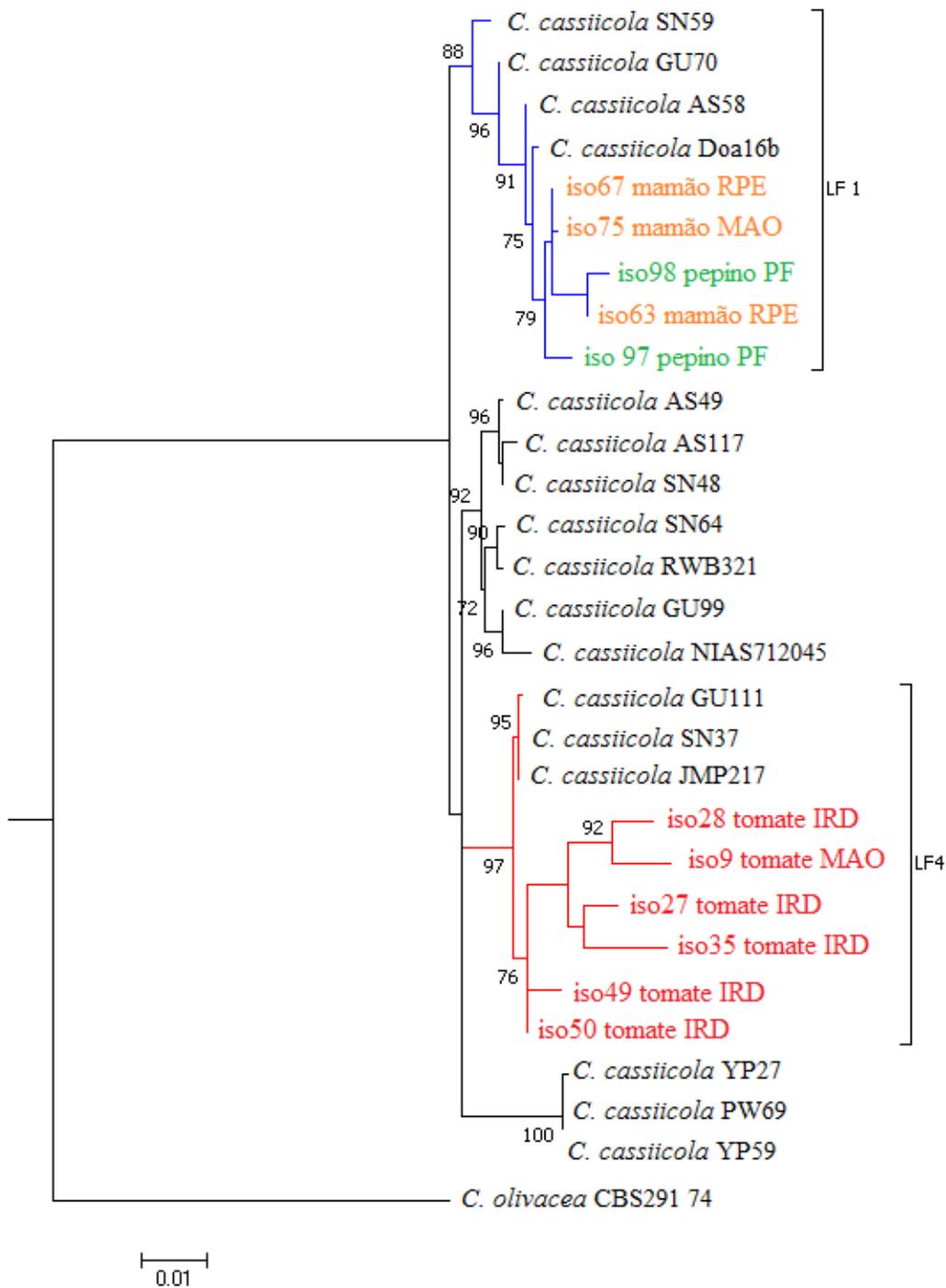
Os resultados obtidos nesta pesquisa confirmaram que todos os isolados avaliados pertencem à espécie *Corynespora cassiicola*. Foram analisadas um total de 252 sequências de DNA, incluindo 30 sequências da região genômica ACT1 (200pb), 63 sequências de CAA5 (330pb), 53 sequências de GA4 (370 pb) e 106 sequências de ITS (584 pb), obtidas pelo do DNA de 110 isolados. A partir destas sequências genômicas, desenvolveu-se uma árvore filogenética consenso que incluiu 11 isolados e 18 sequências de referência (DIXON *et al.*, 2009), juntamente com 1 sequência de grupo externo (*C. olivaceae* CBS291.74).

A análise das árvores filogenéticas revelou alta similaridade genética entre os isolados de *C. cassiicola* do Amazonas e os isolados de referência de diferentes regiões do mundo, o que sugere uma distribuição cosmopolita do fungo e uma origem comum ancestral ao longo da evolução da espécie. Estes resultados corroboram estudos filogenéticos anteriores que mostraram a falta de correlação entre dados filogenéticos e localização geográfica, indicando genótipos com especialização em relação à espécie hospedeira (AGUIAR *et al.*, 2022; BANGUELA-CASTILLO *et al.*, 2020; DÉON *et al.*, 2014; DIXON *et al.*, 2009; SUMABAT *et al.*, 2018).

A árvore filogenética, que incluiu a concatenação dos quatro genes rDNA ITS, ACT1, GA4 e CAA5, revelou agrupamentos de linhagens filogenéticas (LFs) de *C. cassiicola*. Os isolados deste estudo foram agrupados em duas LF's relacionadas à planta hospedeira, independentemente da sua origem geográfica. Estas LFs foram identificadas como LF1 e LF4, conforme proposto por Dixon *et al.* (2009). Os isolados coletados de mamoeiro (*Carica papaya*) e pepineiro (*Cucumis sativus*) em Manaus, Presidente Figueiredo e Iranduba foram agrupados na LF1, enquanto os isolados de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) 'Cereja' e 'Caraíba' em Manaus e Iranduba foram agrupados na LF4 (Figura 6).

Observou-se que os isolados de *C. cassiicola* provenientes de tomateiro são exclusivos das LF's 3 e 4. Embora não tenham sido encontrados isolados de tomateiro na LF1, estes isolados podem causar doenças quando inoculados em tomateiros e servir como fonte de hospedeiros para possíveis epidemias de mancha-alvo em campos de cultivo de tomateiro (DIXON *et al.*, 2009). Portanto, a consorciação das culturas de pepino (*Cucumis sativus*) e mamão (*Carica papaya*) em áreas de plantio de tomateiro deve ser evitada no Amazonas.

Figura 6 - Árvore filogenética consenso



Fonte: De autoria própria (2023).

Nota: Construída por inferência de Máxima Verossimilhança de dados combinados dos genes rDNA ITS, ACT1, GA4 e CAA5 de *Corynespora cassiicola*. A barra de escala mostra o número de substituições por sítio e os valores do suporte de bootstrap > 70% com 1000 repetições são exibidos nos nós. As linhagens filogenéticas (PL) indicam clados de alto suporte com os agrupamentos das seqüências dos isolados obtidos neste estudo e seqüências de referência de Dixon *et al.* (2009).

Os avanços nos procedimentos de classificação filogenética simplificada desempenham um papel fundamental ao tornar essa metodologia mais acessível e, como consequência, tem

ocorrido um aumento significativo na pesquisa sobre o controle eficiente de epidemias causadas por microrganismos fitopatogênicos na agricultura, o que permite uma melhor compreensão das relações genéticas entre os organismos, bem como a identificação de linhagens específicas e sua associação com hospedeiros e origens geográficas. Além disso, estas inovações abrem novas perspectivas para a aplicação de técnicas metagenômicas em estudos populacionais, ampliando ainda mais o conhecimento nessa área.

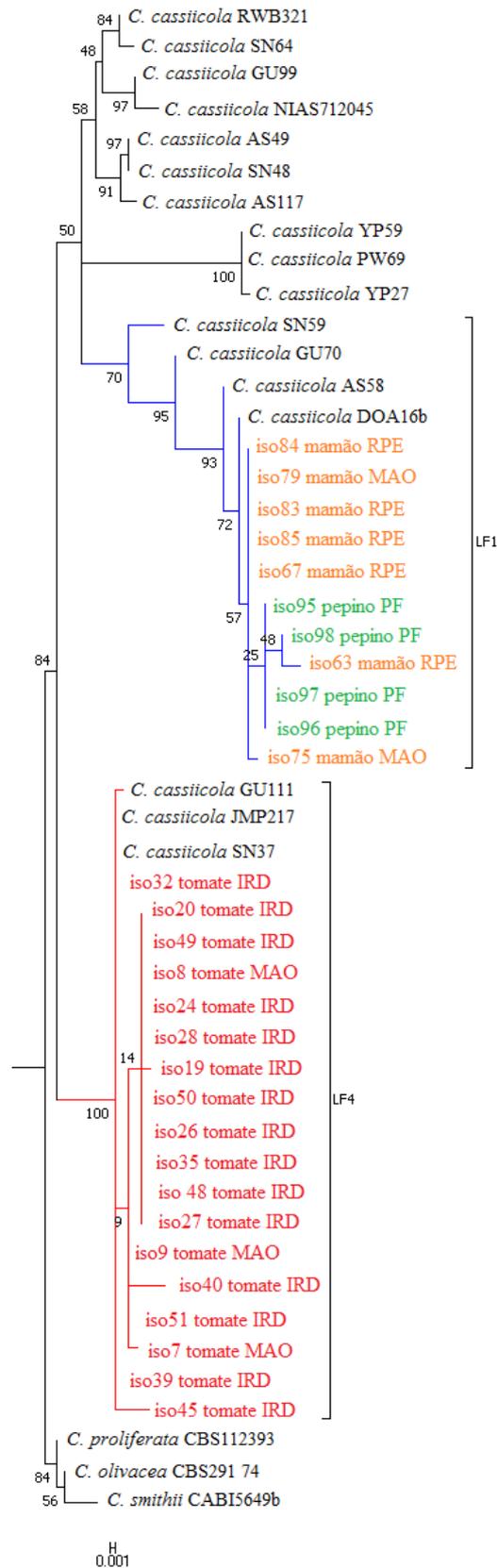
Um estudo conduzido por Banguela-Castillo *et al.* (2020) exemplifica essa abordagem ao demonstrar que é possível definir linhagens filogenéticas (LFs) de *C. cassiicola* por meio da concatenação de dados dos genes GA4 e CAA5. Os polimorfismos de nucleotídeos e restrição nestas regiões se mostram conservados entre indivíduos que pertencem à mesma linhagem filogenética. O gene GA4 é associado às LFs 1, 2, 3, 4, 5 e 7, enquanto o gene CAA5 delimita as LFs 2, 4 e 6.

A partir deste conhecimento, elaborou-se uma árvore filogenética com sequências de 26 isolados de *C. cassiicola*, nas quais os genes GA4 e CAA5 foram concatenados (Figura 7). Esta árvore filogenética foi complementada por 18 sequências de referência e 3 sequências externas com o intuito de fortalecer os resultados obtidos na árvore filogenética consenso dos genes rDNA ITS, ACT1, GA4 e CAA5.

A análise da inferência filogenética construída a partir dos genes GA4 e CAA5 revelou que os isolados de *C. cassiicola* coletados de mamoeiro (*Carica papaya*) e pepino (*Cucumis sativus*) em Manaus (MAO), Rio Preto da Eva (RPE) e Iranduba (IRD) correspondem à LF1. Contudo, os isolados provenientes de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) 'Cereja' e 'Caraíba', coletados em Manaus e Iranduba, foram agrupados na LF4, confirmando os resultados observados previamente na árvore filogenética consenso dos 4 genes.

A análise de diferentes genes proporciona uma compreensão mais abrangente das relações genéticas entre os isolados de *C. cassiicola*. Esta abordagem otimiza a identificação de linhagens específicas e a associação com hospedeiros e origens geográficas, fornecendo informações valiosas para estudos epidemiológicos e de controle de doenças nas plantas.

Figura 7 - Árvore filogenética



Fonte: De autoria própria (2023).

Nota: construída por inferência de Máxima Verossimilhança de dados combinados dos genes GA4 e CAA5 de *Corynespora cassiicola*. A barra

de escala mostra o número de substituições por sítio e os valores do suporte de bootstrap > 70% com 1000 repetições são exibidos nos nós. As linhagens filogenéticas (PL) indicam clados de alto suporte dos agrupamentos.

Nas construções de árvores filogenéticas individuais a partir do sequenciamento dos *loci* rDNA ITS, GA4, CAA5 e ACT1, os padrões de agrupamento entre as linhagens filogenéticas de *C. cassiicola* não apresentaram suporte robusto. No entanto, a árvore filogenética construída com base na região rDNA ITS (Figura 8) revelou a associação dos isolados em dois agrupamentos distintos (Figuras 9 e 10) que se correlacionaram com duas mutações gênicas (Figura 11). Estas mutações, caracterizadas por alterações no código de bases nitrogenadas do DNA, ocorreram nas posições 158pb e 278pb de sequências com 584 pb. Nas amostras classificadas na linhagem LF1 foram identificadas mutações para T e para G, enquanto nas amostras classificadas na linhagem LF4 foram observadas mutações para C e para A, respectivamente.

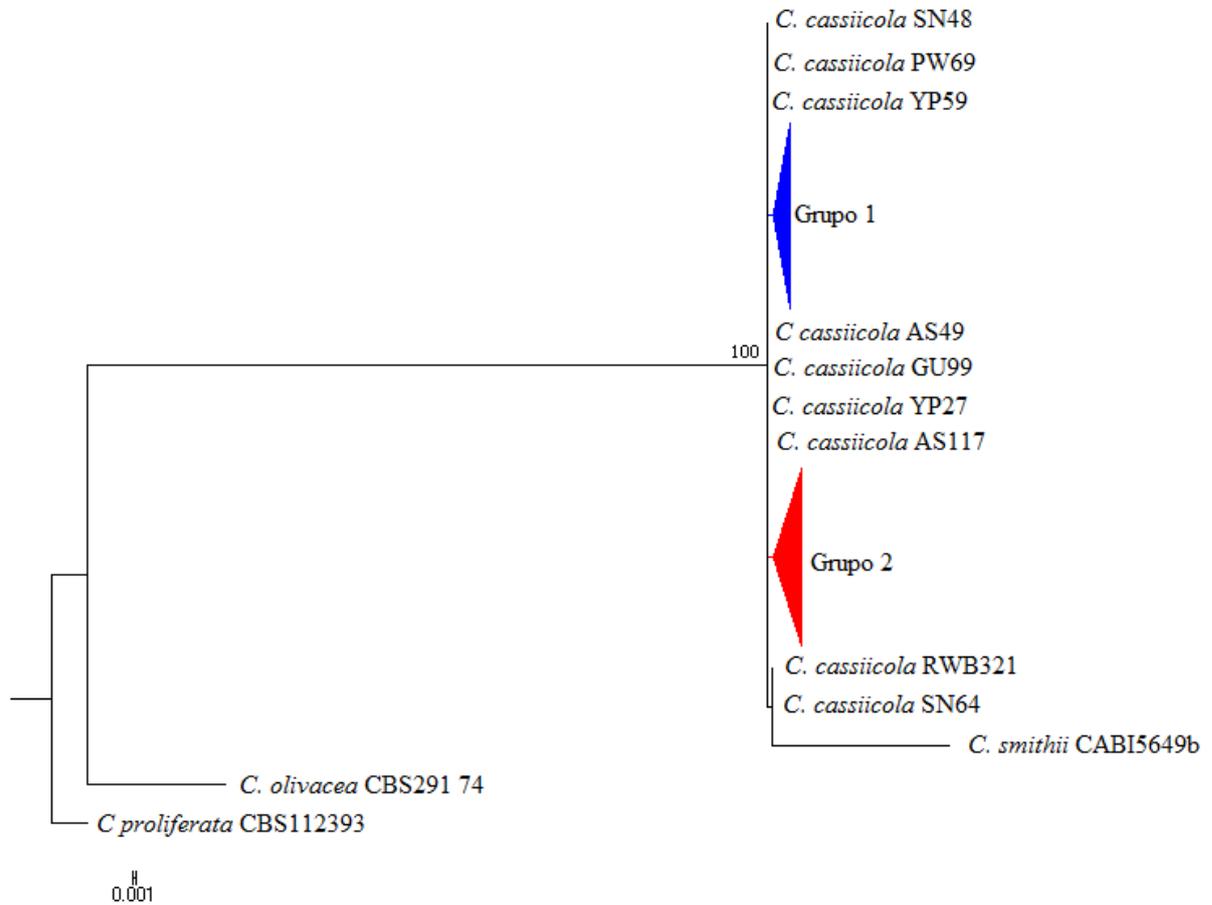
Estes agrupamentos filogenéticos encontrados na árvore rDNA ITS se alinham com os dados filogenéticos obtidos a partir da concatenação dos dois e quatro genes em estudos anteriores de Dixon *et al.* (2009), Déon *et al.* (2014) e Banguela-Castillo *et al.* (2020), disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI, c2023). Esta consistência reforça a utilidade do sequenciamento da região rDNA ITS como uma triagem inicial dos isolados de *C. cassiicola* e a seleção dos indivíduos para reprodução de resistência. Os isolados pertencentes à linhagem LF1 podem ser utilizados para rastrear a resistência à mancha-alvo em mamoeiro (*Carica papaya*) e pepino (*Cucumis sativus*), enquanto os isolados da linhagem LF4 podem ser empregados na triagem de resistência à mancha-alvo em tomateiro (*Solanum lycopersicum*).

Além disso, a identificação de polimorfismos pontuais em regiões específicas do genoma facilita a genotipagem rápida e precoce de *C. cassiicola* em programas de controle de doenças, permitindo a identificação das linhagens por meio de marcadores moleculares. Esta abordagem molecular auxilia na tomada de decisões e no direcionamento de estratégias de manejo, contribuindo para a eficácia dos programas de controle fitossanitário.

Em suma, os resultados obtidos mediante sequenciamento da região rDNA ITS se mostram valiosos para a triagem inicial dos isolados de *C. cassiicola*, seleção de indivíduos para reprodução de resistência e genotipagem rápida. A identificação de polimorfismos pontuais permite a caracterização das linhagens filogenéticas de forma precisa e eficiente,

auxiliando no controle de doenças e no desenvolvimento de estratégias de manejo mais direcionadas.

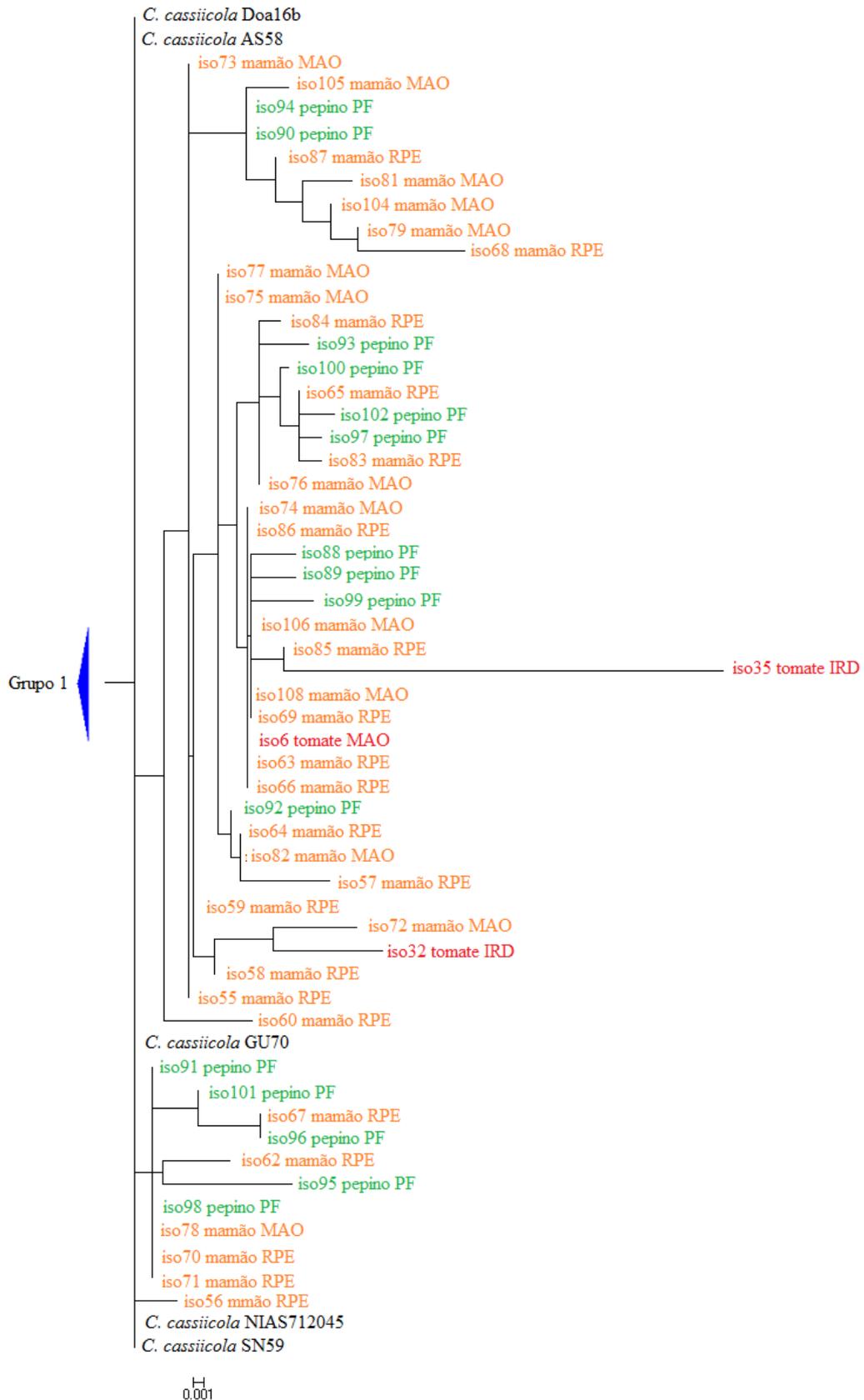
Figura 8 - Árvore filogenética



Fonte: De autoria própria (2023).

Nota: construída por inferência de Máxima Verossimilhança com base no gene ITS do DNA de isolados de *Corynespora cassiicola*. A barra de escala mostra o número de substituições por sítio e os valores do suporte de bootstrap > 70% com 1000 repetições são exibidos nos nós.

Figura 9 - Descrição do grupo 1



Fonte: De autoria própria (2023).

Nota: apresentado na árvore filogenética construída por inferência de Máxima Verossimilhança com base no gene ITS do DNA de isolados de *Corynespora cassiicola*.

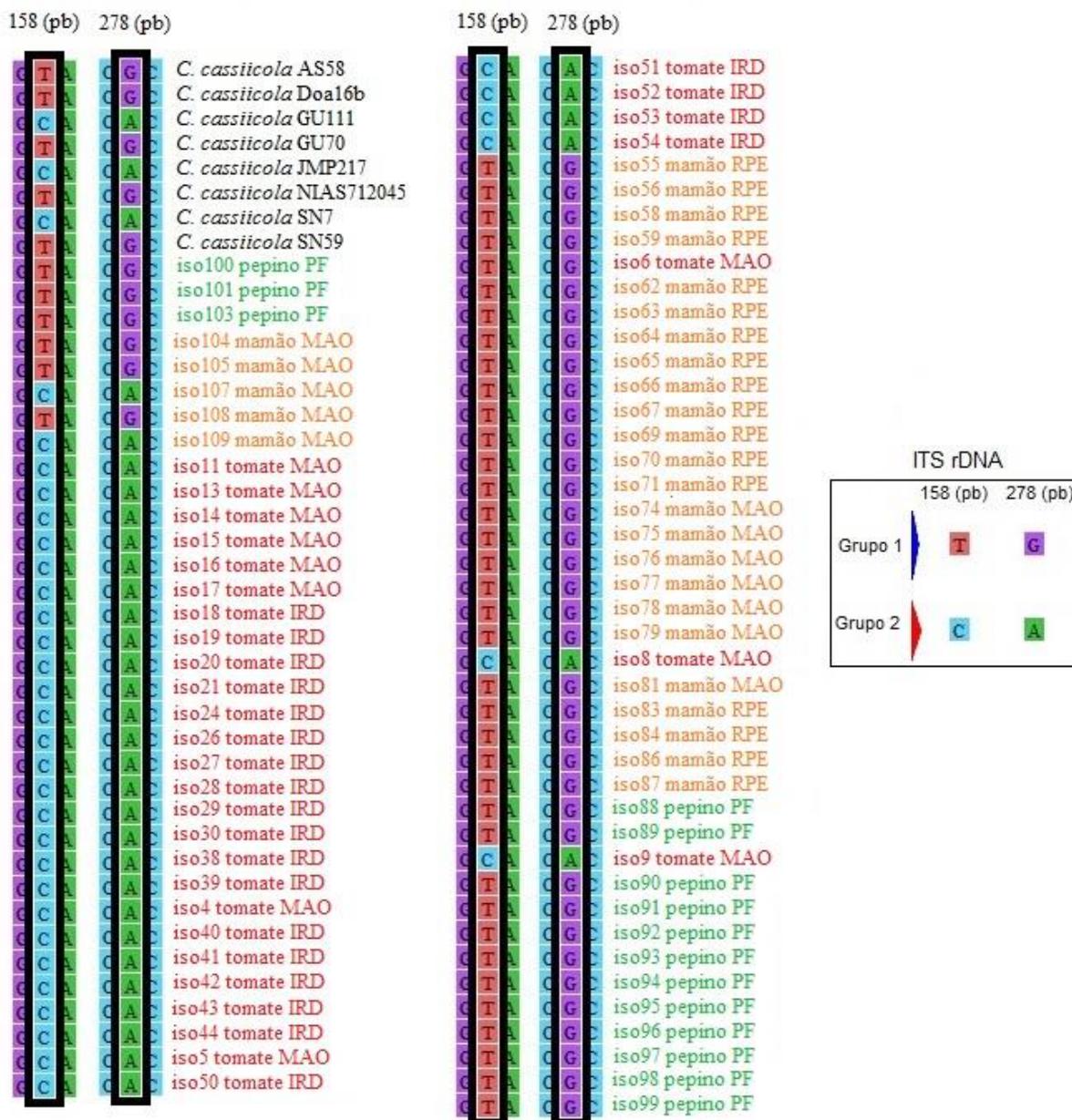
Figura 10 - Descrição do grupo 2



Fonte: De autoria própria (2023).

Nota: apresentado na árvore filogenética construída por inferência de Máxima Verossimilhança com base no gene ITS do DNA de isolados de *Corynespora cassiicola*.

Figura 11 - Mutações nos pares de bases 158 e 278 em um alinhamento de 584 pares de bases da região rDNA ITS de *Corynespora cassiicola*



Fonte: De autoria própria (2023)

Os mecanismos de resistência dos fungos aos fungicidas estão ligados à capacidade de seleção de linhagens resistentes de patógenos. Foi identificada alta incidência de isolados de *C. cassiicola* classificados nas linhagens filogenéticas LF1 e LF4 resistentes aos fungicidas Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol (Tabela 8), evidenciando a ocorrência de seleção de organismos resistentes. No entanto, o mecanismo de resistência não foi reconhecido a partir da análise das regiões genômicas rDNA ITS, ACT1, GA4 e CAA5.

Tabela 8 - Relação entre as linhagens filogenéticas FL1 e FL4 de *Corynespora cassiicola* e a presença de variantes resistentes aos fungicidas Azoxistrobina, Boscalida, Carbendazim e Tebuconazol

Isolados	Linhagensm filogenéticas (LF)	Perfis de resistência*			
		Azoxistrobina	Boscalida	Carbendazim	Tebuconazol
7	4	RR	S	RR	S
19	4	RR	R	RR	R
24	4	R	S	RR	R
26	4	S	R	R	R
27	4	RR	S	R	S
28	4	SS	SS	SS	R
35	4	SS	SS	R	S
39	4	R	R	RR	S
40	4	RR	SS	R	R
45	4	SS	S	R	R
48	4	RR	SS	R	S
49	4	RR	S	R	R
50	4	RR	S	RR	R
51	4	RR	SS	RR	R
75	1	R	S	SS	R
79	1	R	SS	SS	R
83	1	R	SS	SS	R
96	1	RR	S	RR	R
97	1	R	S	RR	R
98	1	RR	SS	R	S

Fonte: De autoria própria (2023).

Nota: SS = extremamente sensível, S = sensível, R = resistente e RR = extremamente resistente.

Os resultados destacam a importância da variabilidade genética de *C. cassiicola* como uma estratégia adaptativa que permite ao fungo infectar uma ampla gama de plantas hospedeiras. Esta variabilidade genética representa um desafio para o manejo integrado de doenças, visto que diferentes variantes genéticas do fungo apresentam diferentes graus de resistência aos tratamentos químicos e culturais. Esta diversidade genética também pode influenciar a especificidade do fungo em relação a determinadas plantas hospedeiras.

Os estudos filogenéticos realizados foram essenciais para identificar a diversidade genética e a especialização de *C. cassiicola* em diferentes plantas hospedeiras. A construção de árvores filogenéticas com base nas regiões genômicas rDNA ITS, CAA5, GA4 e ACT1 confirmou a existência de pelo menos duas linhagens bem definidas de *C. cassiicola* no Amazonas, correlacionadas com as linhagens PL1 e PL4 de sequências de referência identificadas na literatura. Estas linhagens podem representar diferentes variantes genéticas do

fungo com características específicas relacionadas à sua virulência, patogenicidade e comportamento em relação aos hospedeiros.

Os resultados inferem que as duas linhagens de *C. cassicola* no Amazonas evoluíram a partir de uma população ancestral comum. Esta descoberta tem implicações importantes para o manejo integrado de doenças, visto que permite a adoção de medidas específicas de controle para cada linhagem. Com uma compreensão mais aprofundada da diversidade genética de *C. cassicola*, é possível desenvolver estratégias mais eficazes para o controle da mancha-alvo. Isto inclui a seleção de métodos de controle mais adequados para cada linhagem, como tratamentos químicos direcionados ou práticas culturais específicas.

A construção de árvores filogenéticas é uma ferramenta valiosa para entender a diversidade genética de *C. cassicola* e orientar o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficazes. Com base nestes resultados, é possível direcionar esforços para o controle da doença, adaptando as práticas de manejo e os tratamentos de acordo com as características genéticas das linhagens presentes na região. Desta forma, é possível aumentar a eficiência no controle da mancha-alvo e minimizar os impactos negativos nas culturas agrícolas.

5 CONCLUSÕES

O fungo *Corynespora cassiicola* apresenta diferentes linhagens filogenéticas no estado do Amazonas. O uso dos *loci* rDNA ITS, GA4, CAA5 e ACT1 possibilitou a classificação eficiente dos isolados em linhagens filogenéticas distintas. A região ITS se mostrou útil como uma triagem inicial para identificação dos agrupamentos filogenéticos.

A combinação dos dados dos genes rDNA ITS, ACT1, GA4 e CAA5 confirmou a presença das linhagens filogenéticas LF1 e LF4 de *C. cassiicola* na região estudada, seguindo uma distribuição genotípica clonal global. Estas linhagens filogenéticas estão correlacionadas com as plantas hospedeiras, em que a LF1 é composta por isolados de mamoeiro e pepino, enquanto a LF4 é composta por isolados de tomateiro.

Estas linhagens filogenéticas podem apresentar respostas distintas aos genótipos hospedeiros e aos fungicidas, indicando a importância de medidas de controle específicas para cada variedade do fungo. A existência de isolados resistentes aos fungicidas nas linhagens filogenéticas identificadas é uma preocupação adicional que deve ser considerada no manejo da mancha-alvo.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F. M. *et al.* Phylogenetic network analysis of South and North American *Corynespora cassiicola* isolates from tomato, cucumber, and novel hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 163, n. 3, p. 657-671, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02505-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-022-02505-x>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- BANGUELA-CASTILLO, A. *et al.* An updated phylogenetic classification of *Corynespora cassiicola* isolates and a practical approach to their identification based on the nucleotide polymorphisms at the *ga4* and *caa5* loci. **Mycologia**, v. 112, n. 1, p. 24-38, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1670018>. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/211338/1/Castillo-An-Updated.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00275514.1999.12061051>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- DEMARTELAERE, A. C. F. *et al.* Aspectos morfofisiológicos, variabilidade genética e controle alternativo da *Alternaria alternata* f. sp. citri em tangerineira ‘Dancy’. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 90621-90646, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n11-465>. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/20269>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- DÉON, M. *et al.* Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. **Fungal biology**, v. 118, n. 1, p. 32-47, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.10.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878614613001530>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- DIXON, L. J. *et al.* Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1015-1027, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-9-1015>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-99-9-1015>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004. DOI: [10.1093/nar/gkh340](https://doi.org/10.1093/nar/gkh340). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15034147/>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- HEPPERLE, D. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualisation tool for molecular sequences. **SeqAssem (C)**, 2004. Disponível em: <http://www.sequentix.de/>. Acesso em: 13 abr. 2023.

HORIIKE, T. An introduction to molecular phylogenetic analysis. **Reviews in Agricultural Science**, v. 4, p. 36-45, 2016. DOI: https://doi.org/10.7831/ras.4.0_36. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/ras/4/0/4_36/_article/-char/en. Acesso em: 17 ago. 2023.

JAYAWARDENA, R. S. *et al.* What is a species in fungal plant pathogens? **Fungal Diversity**, v. 109, n. 1, p. 239-266, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00484-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-021-00484-8>. Acesso em: 17 ago. 2023.

KUMAR, S. *et al.* MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016. DOI: 10.1093/molbev/msw054. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27004904/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). National Library of Medicine. **NCBI**, c2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 12 fev. 2023

RONDON, M. N.; LAWRENCE, K. S. *Corynespora cassiicola* isolates from soybean in Alabama detected with G143A mutation in the cytochrome b gene. **Plant Health Progress**, v. 20, n. 4, p. 247-249, 2019.

SHIMOMOTO, Y. *et al.* Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. **Plant pathology**, v. 60, n. 2, p. 253-260, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02374.x>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2010.02374.x>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SUMABAT, L. G. *et al.* Clonality and geographic structure of host-specialized populations of *Corynespora cassiicola* causing emerging target spot epidemics in the southeastern United States. **Plos one**, v. 13, n. 10, p. e0205849, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205849>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0205849>. Acesso em: 17 ago. 2023.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262687766_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_RNA_Genes_for_Phylogenetics. Acesso em: 17 ago. 2023.

WU, J. *et al.* Variation of cassiicolin genes among Chinese isolates of *Corynespora cassiicola*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 4, p. 634-647, 2018. DOI: 10.1007/s12275-018-7497-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30054815/>. Acesso em: 17 ago. 2023.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de desenvolvimento do fungo *C. cassiicola* é complexo e contínuo. Como organismo vivo, o fungo está em constante evolução que o torna cada vez mais resistente aos fungicidas convencionais utilizados na agricultura.

Devido à presença em quase todas as regiões tropicais e à capacidade de infectar uma ampla variedade de plantas hospedeiras, *C. cassiicola* é objeto de estudos voltados para compreender a relação entre o patógeno e seu hospedeiro. Estas pesquisas abrangem aspectos como origem, morfologia, diversidade genética, filogenia e possível especialização das espécies.

Ressalta-se a necessidade de pesquisas futuras para aprofundar o conhecimento sobre as relações filogenéticas deste fungo. Os estudos podem fornecer *insights* sobre a adaptação e resistência de *C. cassiicola* aos fungicidas, à medida que se continua a investigar o processo de desenvolvimento do fungo.

Em suma, compreende-se que *C. cassiicola* é um patógeno em constante evolução e que o entendimento da relação com os fungicidas e a capacidade de desenvolver resistência demanda pesquisas contínuas e aprofundadas. As investigações contribuirão para o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficazes, em vista da sustentabilidade da agricultura e a proteção das culturas agrícolas.