



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Identificação de isolados de *Septoria lycopersici* do
tomateiro e sensibilidade a fungicidas**

Christiane Almeida da Costa

**Recife – PE
2019**

CHRISTIANE ALMEIDA DA COSTA

Identificação de isolados de *Septoria lycopersici* do tomateiro e sensibilidade a fungicidas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Ailton Reis (EMBRAPA Hortaliças) – Orientador

Dr. Valdir Lourenço Junior (EMBRAPA Hortaliças) – Coorientador

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C837i Costa, Christiane Almeida da
Identificação de isolados de *Septoria lycopersici* do tomateiro e
sensibilidade a fungicidas / Christiane Almeida da Costa. – 2019.
102 f.: il.

Orientador(a): Ailton Reis.

Coorientador(a): Valdir Lourenço Junior.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Tomate – Doenças e pragas 2. *Septoria* 3. Fungos fitopatogênicos
– Controle 4. Fungicidas I. Reis, Ailton, orient. II. Lourenço Junior,
Valdir, coorient. III. Título

CDD 632

Identificação de isolados de *Septoria lycopersici* do tomateiro e sensibilidade a fungicidas

CHRISTIANE ALMEIDA DA COSTA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em:27/02/2019.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Ailton Reis (EMBRAPA Hortaliças)

EXAMINADORES:

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2019**

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

Chico Xavier

A Deus!

OFEREÇO

Aos meus pais, Raimundo Lopes e Elineide Almeida pelo amor incondicional, apoio e ensinamentos. A meu irmão Christian e a meu pai de coração Antônio Dalmácio por toda amizade e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida. Por ser minha força e meu alicerce diante de todas as situações. Por ter me propiciado todas as possibilidades e conquistas. Obrigada!!!!!!

A meu irmão Christian Renato, ao meu pai Raimundo Lopes, meu padrasto Antônio Dalmácio e em especial minha querida mãe Elineide Almeida, por seu amor incondicional, apoio, incentivo e por ter acreditado que isso seria possível. À toda família Almeida. Em especial a minha querida avó Maria Andréa (*In memoriam*) e meu avô Elias Almeida (*In memoriam*).

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a PPP/FAPDF/CNPq (Processo nº 193.000.662/2015) e a EMBRAPA Hortaliças (CNPq) pela oportunidade em desenvolver esta pesquisa.

A meus orientadores Ailton Reis pela orientação, ajuda, confiança e amizade. E a Valdir Lourenço pelo incentivo, apoio, dicas, resoluções, por toda disposição em ajudar. Agradeço aos dois por fazerem uma orientação mais próxima e humana. A vocês sou imensamente grata!!!

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE, pelos bons exemplos de dedicação, profissionalismo e de amor a pesquisa e ensino. A todos os pesquisadores do laboratório de fitopatologia do CNPH, em especial ao Dr. Carlos Lopes e Dra. Alice Quezado.

Aos integrantes do laboratório de Fitopatologia do CNPH, Ana Flávia, Ana Júlia, Breno, Caio, Déborah, Elenice, Gabriela, Gustavo, Josefa, Luiz Henrique e Wesley. À Cléia Cabral, Rafaela Borges, Greecy Mirian (UFRPE) e Maurício Rossato do laboratório de genômica. E em especial a Fabiana e Wagner Ribeiro por toda boa vontade, disponibilidade em ajudar e pela amizade. Obrigada a todos por todos os momentos compartilhados!!!

Aos analistas Francisco, Getúlio, José Mendonça e Lúcio por todas as dicas e disponibilidade em ajudar. Ao pesquisador Antônio Moita, ao Pedro da irrigação e a todos os companheiros de transporte do CNPH, em especial “seu” José Maria.

Às minhas queridas e especiais amigas de curso, Ana Dulce e Josiene Veloso. E a todos os colegas do PPGF. A Bruno Ferreira, Luana Dantas, Dorian Yest e Iran Siqueira pela amizade, cumplicidade, atenção e também paciência em determinados momentos. E à tantas outras pessoas que não participaram ativamente no desenvolvimento deste trabalho, mas que tornaram minha estadia em Brasília mais feliz. Deixo aqui minha imensa gratidão a todos. Obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I- Introdução Geral	8
CAPÍTULO II- Caracterização molecular, morfológica e patogênica do agente causal da septoriose do tomateiro no Brasil.....	35
CAPÍTULO III- Sensibilidade de isolados de <i>Septoria lycopersici</i> a fungicidas, no Brasil.....	78
CAPÍTULO IV- Conclusões Gerais	102

RESUMO GERAL

A mancha de *Septoria* é uma das principais doenças fúngicas da cultura do tomateiro. Segundo a literatura, a doença tem como agente etiológico *Septoria lycopersici*, à qual inexistem estudos de caracterização molecular. O controle da doença se baseia na pulverização com fungicidas protetores e sistêmicos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos identificar e caracterizar isolados do fungo associado à septoriose do tomateiro no Brasil, averiguar se os isolados também causam doenças em outras espécies da família Solanaceae e caracterizar esses isolados quanto à sensibilidade à fungicidas. Os isolados foram identificados através de inferências filogenéticas baseadas nas sequências das regiões fator de alongação-1 α (EF1- α), β -tubulina (Tub) e Calmodulina (Cal). Dez isolados foram selecionados para a caracterização morfocultural e para o experimento de avaliação da patogenicidade e agressividade em tomateiro da cultivar Santa Clara. A caracterização morfológica foi conduzida a partir da mensuração das dimensões dos conídios e a caracterização cultural consistiu na mensuração do diâmetro da colônia nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C. Plantas cultivadas e silvestres de solanáceas foram utilizadas para testar a gama de hospedeiras do fungo. As análises filogenéticas demonstraram que todos os isolados agruparam com a espécie tipo de *S. lycopersici*. Verificou-se também haver grande variabilidade entre e dentro dos isolados no quesito comprimento dos conídios em meio de cultura. Além de se constatar que a temperatura ótima, para o crescimento da colônia ficou em cerca de 18°C. Todos os isolados selecionados para o teste de patogenicidade em tomateiro foram capazes de induzir sintomas típicos da doença, mas diferiram em sua agressividade. Um total de 8 espécies de solanáceas foram identificadas como potenciais hospedeiras alternativas de *S. lycopersici*. A concentração efetiva necessária para reduzir o crescimento micelial em 50% (CE50) foi avaliada para azoxistrobina, clorotalonil, tebuconazol e tiofanato-metílico *in vitro* e em casa de vegetação. De acordo com o teste de sensibilidade *in vitro*, foi detectada a presença de isolados pouco sensíveis cuja CE50 variou de 0,0024 a 252,7 mg/L para azoxistrobina, de 0,0008 a 6,85 mg/L para o clorotalonil, de 0,000047 a 215,44 mg/L para tebuconazol e 0,00086 a 215,44 mg/L para o tiofanato-metílico. Entretanto, *in vivo* foram detectados isolados com baixa sensibilidade a azoxistrobina e possível perda gradativa de sensibilidade para clorotalonil e tebuconazol. Com isso observou-se o risco de um possível declínio no controle da septoriose do tomateiro com estes fungicidas, evidenciando a necessidade de mais investigações.

Palavras chave: tomate, *Septoria*, etiologia, agressividade, fungicidas.

GENERAL ABSTRACT

Septoria leaf spot is one of the main fungal diseases of tomato crop. According to the literature the disease has as etiologic agent *Septoria lycopersici*, to which there are no studies of molecular characterization. Disease control is based on spraying with protective and systemic fungicides. In this context, the present study aimed to identify and characterize isolates of the fungus associated with Septoria leaf spot of tomato in Brazil, to investigate whether the isolates also cause diseases in other Solanaceae species and to characterize these isolates in terms of sensitivity to fungicides. Isolates were identified through phylogenetic inferences based on sequences from the elongation factor-1 α (EF1- α), β -tubulin (Tub) and Calmodulin (Cal) regions. Ten isolates were selected for the morphocultural characterization and for the pathogenicity and aggressiveness test on tomato of the cultivar Santa Clara. The morphological characterization was carried out by measuring the conidia dimensions and the cultural characterization consisted in measuring the diameter of the fungal colony at temperatures of 10, 15, 20, 25 and 30 °C. Cultivated and wild solanaceous plants were used to test the host range of the fungus. Phylogenetic analyzes showed that all isolates grouped with the *S. lycopersici* type species. There was also great variability between and within the isolates in the length of conidia in culture medium. In addition, it was found that the optimum temperature for the growth of the colony was around 18°C. All the isolates selected for the tomato pathogenicity test were able to induce typical symptoms of the disease but differed in their aggressiveness. A total of 8 species of Solanaceae were identified as potential alternative hosts of *S. lycopersici*. The effective concentration required to reduce mycelial growth by 50% (EC50) was evaluated for azoxystrobin, chlorothalonil, tebuconazole and thiophanate-methyl *in vitro* and in greenhouse. According to the *in vitro* sensitivity test, there were low sensitive isolates whose EC50 ranged from 0,0024 to 252,7 mg/L for azoxystrobin, from 0,0008 to 6,85 mg/L for chlorothalonil, from 0,000047 to 215.44 mg/L for tebuconazole and 0,00086 to 215,44 mg/L for thiophanate-methyl. However, *in vivo*, isolates with low sensitivity to azoxystrobin and possible gradual loss of sensitivity to chlorothalonil and tebuconazole were detected. With this, the risk of a possible decline in the control of tomato septoriossis with these fungicides was observed, evidencing the need for further investigations.

Keywords: tomato, *Septoria*, etiology, aggressiveness, fungicides.

CAPÍTULO I



Introdução Geral

Identificação de isolados de *Septoria lycopersici* do tomateiro e sensibilidade a fungicidas

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) anteriormente classificado como (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é nativo da América do Sul, tendo como centro de origem a região da Cordilheira dos Andes, região atualmente ocupada por Equador, Colômbia, Peru e Norte do Chile. Embora as formas ancestrais de tomate sejam originárias dessa área, segundo a literatura a sua ampla domesticação se deu no México, chamado de centro de origem secundária, e de lá foi levado, por exploradores espanhóis, para Europa, de onde foi adaptado, selecionado e, posteriormente, disseminado para vários locais do mundo (COLARICCIO, 2000; JENKINS, 1948).

A cultura do tomate pertence à família das Solanáceas, é uma dicotiledônea da ordem Tubiflorae, gênero *Solanum*. Apresenta a característica herbácea, caule redondo, piloso e macio quando jovem, tornando-se fibrosa com o passar do tempo. As folhas são alternadas, compostas de 11 a 32 cm de comprimento. Possui flor hermafrodita, sendo considerada uma planta autógama, embora possa ocorrer pequena taxa de polinização cruzada. As flores se formam em cachos, são pequenas e amarelas e o cálice possui cinco pétalas lanceoladas e largas. Os cachos de flores podem ser simples (não ramificados) e composto (ramificado). O fruto é carnoso, com 2 ou mais lóculos. As sementes são uniformes, pequenas, com pelos bem curtos (GOULD, 1992).

O tomateiro pode apresentar dois hábitos de crescimento distintos que condicionam a condução da cultura. O hábito indeterminado (tipo alto), que ocorre na maioria das cultivares de mesa que são caracterizadas pelas práticas de tutoramento e podas, com caule atingindo mais de 2,5 m de altura, onde ocorre dominância da gema apical sobre as gemas laterais, que se desenvolvem menos. O crescimento vegetativo da planta apresenta-se vigoroso e contínuo, ocorrendo juntamente com a produção de flores e frutos. O hábito determinado (tipo moita) ocorre nas cultivares melhoradas ou desenvolvidas especialmente para cultura rasteira, com a finalidade agroindustrial. Neste caso as hastes atingem apenas 1 m, apresentando um cacho de flores na extremidade. O crescimento vegetativo é menos vigoroso, as hastes crescem mais uniformemente e a planta assume a forma de uma moita (FILGUEIRA, 2008).

O tomateiro é a segunda hortaliça mais produzida no mundo, atrás apenas da cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.), e é considerada a décima commodities mais produzida no mundo. Em 2016, a produção mundial foi de cerca de 177, 042 milhões de toneladas em uma área colhida de 4,782,753 hectares. O Brasil foi considerado o nono produtor mundial, atrás da China, Índia, EUA, Turquia, Egito, Itália, Irã e Espanha (AGRIANUAL, 2018; FAO, 2019).

Segundo os últimos dados da FAO, no Brasil, a cultura ocupou uma área plantada de 63.980 hectares e uma produção de 4,167,629 toneladas (FAO, 2019). Seu cultivo é realizado em todos os estados, sendo a região Sudeste a maior produtora, com um valor de 1,934,798 milhões de toneladas produzidas, seguida das regiões Centro-Oeste com 1,230,336 de toneladas, Sul com 571,468 de toneladas, o Nordeste com cerca de 564,256 toneladas e por último o Norte com 12,188 de toneladas. Embora a maior região produtora seja o Sudeste, o estado de Goiás localizado na região Centro-Oeste é considerado o maior produtor nacional, com cerca de 1,185,585 de toneladas, produzidos numa área de 13,779 hectares (AGRIANUAL, 2018).

Cada cadeia produtiva possui características intrínsecas na produção, beneficiamento, processamento e comercialização, desde as cultivares utilizadas até as formas de cultivo e consumo final. Dentre as hortaliças fruto mais cultivadas no Brasil, destacam-se principalmente os cultivares de tomateiro tipos caqui, cereja e longa vida, pela sua grande aceitação no mercado e preços compensadores (CARDOSO, 2007).

Dentre os fatores que se mostram atrativos ao produtor, para o investimento e cultivo do tomateiro, pode-se listar: o ciclo relativamente curto, a opção entre um período de produção curto ou prolongado, a possibilidade de cultivar como uma cultura arvense, não coberta, ou como uma cultura protegida, a adaptabilidade em diferentes sistemas de cultivo, o valor econômico elevado, além da possibilidade dos frutos serem processados, secos e enlatados (NAIKA et al., 2006).

Essa hortaliça é de grande importância por contribuir para uma dieta alimentar saudável e equilibrada, sendo considerada um alimento funcional por seus frutos ricos em açúcares, sólidos insolúveis em álcool, ácidos orgânicos, minerais, vitaminas A, B1, B2, B3, B6, C, E, niacina, ácido fólico, biotina, além de ser rico em licopeno e outros compostos. Os frutos de tomate podem ser consumidos frescos, cozidos, em forma de molhos (CARVALHO, 2007; SILVA; GIORDANO, 2000). Os frutos ainda podem ser processados como purés, sucos e molho de tomate (*ketchup*). Também os frutos enlatados e secos constituem produtos processados de importância econômica (NAIKA et al., 2006).

O tomateiro desenvolve-se melhor em regiões altas de clima tropical, subtropical ou temperado, seco e com alta incidência de luz solar. Na região Sul o plantio é recomendado para os meses de setembro a fevereiro, já para o Norte os meses de março e julho, para as regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste o ano inteiro, com a colheita iniciada após 100 a 120 dias após o plantio (EMBRAPA, 2010).

Mancha de Septoria do tomateiro

Vários fatores limitam a produtividade da cultura, entre eles as doenças ocupam uma posição de destaque, pois podem levar a perdas elevadas se medidas de manejo não forem tomadas a tempo. Esta alta incidência de doenças ocorre por diversos motivos como, por exemplo, a variação climática e as diferentes formas de cultivo (INCAPER, 2010; LOPES; ÁVILA, 2005). Cerca de duzentas doenças de causas bióticas e abióticas já foram identificadas em cultivos de tomate, em todo o mundo. As de origem bióticas podem ser causadas por bactérias, vírus, fitoplasmas, nematoides, oomicetos e com destaque os fungos, a qual um maior número de doenças a eles são atribuídos (INOUE-NAGATA et al., 2016). Dentre as doenças fúngicas existem relatos de, pinta preta (*Alternaria linariae* Neerg.), oídio (*Oidiopsis taurica* Salmon e *Oidium neolycopersici* L.), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib.), murcha de Verticillium (*Verticillium dahliae* Kleb.), mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.), podridão de Sclerotium (*Sclerotium rolfsii* Lib.), mancha de Cladosporium (*Fulvia fulva* Cooke.), mancha de Corynespora (*Corynespora cassiicola* Bert & Curt.), mancha de Stemphylium (*Stemphylium solani* Weber. e *S. lycopersici* Enjoji.), podridão de Phoma (*Phoma destructiva* Plowr.), podridão de colo e raiz de Fusarium (*Fusarium solani* f. sp. *radicis-lycopersici* Forl.), podridão corticosa da raiz (*Setophoma lycopersici* Sayago.), cancro da haste (*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* Grogan, Kimble & Misaghi.) e mancha de Septoria (*Septoria lycopersici* Spegazzini.) (INOUE-NAGATA et al., 2016).

A septoriose ou mancha de Septoria em tomateiro foi relatada pela primeira vez em 1882 na Argentina, com posterior detecção em todas os países produtores de tomate (BARKSDALE, 1982). A doença é importante em épocas chuvosas, ocorrendo em quase todas as regiões produtoras de tomate, do Brasil e do mundo (INOUE-NAGATA et al., 2016; STEVENSON, 2014; ZAMBOLIM et al., 2000). No Brasil, a ocorrência desta doença tem aumentado muito nos últimos anos (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013a).

Os sintomas da doença ocorrem em todos os estágios de desenvolvimento da cultura (SEYMOUR; RIDINGS, 1980; ZITTER, 2001). Os sintomas iniciais são observados nas folhas mais velhas, geralmente por ocasião da formação do primeiro cacho de frutos, através de numerosas manchas circulares e elípticas, de 2 a 3mm de diâmetro, com as bordas escurecidas e o centro cor de palha (REIS; BOITEUX; LOPES, 2006). No centro das lesões, em condições de alta umidade, é possível notar pontos negros constituídos pela frutificação do fungo, os picnídios (INOUE-NAGATA et al., 2016).

Quando condições climáticas favoráveis estão associadas a cultivares muito suscetíveis, as lesões podem atingir 5mm ou mais de diâmetro, sendo então facilmente confundida com lesões de pinta-preta causadas por *Alternaria* spp. Entretanto, a presença de picnídios auxilia na distinção destas doenças (LOPES; ÁVILA, 2005; SEYMOUR; RIDINGS, 1980; STEVENSON, 2014; ZITTER, 2001). Geralmente, observa-se a presença de um halo amarelo estreito circundando as lesões em folhas (REIS; BOITEUX; LOPES, 2006). Com o passar do tempo a doença pode progredir de forma ascendente na planta, em direção às folhas mais novas, causando severa desfolha da planta (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013b). Ataques severos podem causar também lesões nas hastes, pedúnculo e cálice, onde as lesões são geralmente menores e mais escuras. Frutos raramente são afetados e as lesões de caule e cálice normalmente não apresentam picnídios (INOUE-NAGATA et al., 2016; LOPES et al., 2005; STEVENSON, 2014) (Figura 1).

É importante destacar que em 1996 na Zâmbia, durante a estação chuvosa, a espécie *S. lycopersici* provocou dois tipos de manchas foliares nas cultivares de tomateiro ‘Supermarglobe’ e ‘Heinz’. A identificação da espécie baseou-se apenas em caracteres morfológicos, sendo o isolado classificado como tipo 1 (T1) causou manchas castanhas escuras com o diâmetro máximo de 5 mm. Contudo, o isolado tipo 2 (T2) causou lesões de cor castanha acinzentada com vários anéis concêntricos e diâmetro de 4 a 12 mm, sendo os isolados distinguidos apenas com base em diferenças morfológicas (KAPOORIA; NDUNGURU, 1998). No Brasil, tem-se observado nas regiões produtoras de tomate sintomas similares aos descritos na Zâmbia. Entretanto, inexistem estudos tanto a nível de Brasil quanto a nível mundial que visem esclarecer se esses surtos epidêmicos da doença estão associados com mais de uma espécie de *Septoria*.

A espécie produz picnídios em grande quantidade nos centros das lesões maduras na planta, assim como, no cultivo *in vitro*. Nas plantas, os conídios são liberados em cirrus hialinos, aglutinados por substâncias mucilaginosas, sendo necessária o impacto de gotas de

água para que ocorra a disseminação (INOUE-NAGATA et al., 2016; LOPES; ÁVILA, 2005; REIS; BOITEUX; LOPES, 2006; STEVENSON, 2014).

Embora o patógeno não seja um habitante do solo, este pode persistir de uma época de cultivo para o outro nos restos de cultura de plantas doentes. O patógeno também pode sobreviver em sementes contaminadas, as quais constituem o veículo de disseminação do fungo para longas distâncias, constituindo fonte de inóculo inicial para outras áreas de cultivo (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013a).

Caso a transmissão ocorra a partir da semente, a infecção pode iniciar nas folhas cotiledonares e destas os esporos são dispersos para outras partes da planta. Para plantas vizinhas a disseminação pode ocorrer pelo impacto de gotas de água, seja da chuva ou de irrigação por aspersão, associadas a ventos fortes (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013a; REIS; BOITEUX; LOPES, 2006). O patógeno também pode ser disseminado através das mãos dos trabalhadores durante os tratos culturais, insetos (besouros), implementos e ferramentas agrícolas. A chuva contribui fortemente para a produção, liberação e dispersão dos conídios do patógeno. Quando associada a ventos fortes, são responsáveis pela dispersão a distâncias maiores (INOUE-NAGATA et al., 2016; PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013a; REIS; BOITEUX; LOPES, 2006).

Em condições de alta umidade relativa e temperaturas favoráveis (15°C a 27°C, ótima de 25°C), o conídio germina com posterior penetração na planta, através dos estômatos. Os sintomas iniciais aparecem por volta de seis dias após a infecção. Os picnídios surgem após 14 dias da infecção. As temperaturas ótimas para ocorrência de epidemias da doença estão entre 20 a 25°C. Assim, longos períodos de temperatura amena, associadas a alta umidade relativa, chuvas abundantes ou irrigação por aspersão, constituem condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (INOUE-NAGATA et al., 2016; PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013a; REIS; BOITEUX; LOPES, 2006; STEVENSON, 2014). No Brasil a incidência é mais séria nos cultivos de tomate estaqueado realizados durante o período chuvoso do ano. Contudo observa-se alta incidência da doença em tomate rasteiro (processamento industrial) cultivado no período seco do ano e irrigado via pivô central (LOURENÇO Jr.; REIS; COSTA, 2016).

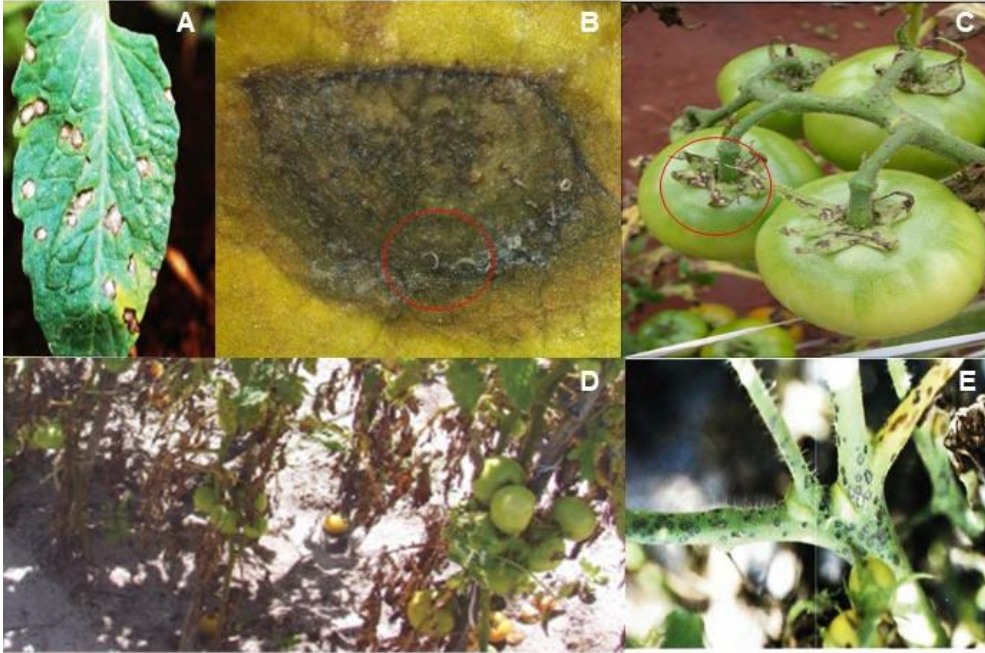


Figura 1. Sintoma de septoriose causada por *S. lycopersici* em folha de tomateiro (A), lesão foliar com presença de esporos em cirrus (B), lesões no cálice (C), coalescência e desfolha das folhas baixeras (D), lesões na haste (E). Fotos: A e E- Carlos Lopes, B- Christiane Costa, C- Ailton Reis e D- Valdir Lourenço.

Taxonomia do gênero *Septoria*

Septoria compreende um grupo de fungos com 3148 taxa associadas ao gênero (INDEX FUNGORUM, 2019). É considerado um dos gêneros de fungos fitopatogênicos mais comumente encontrados no mundo, e causador de doenças em uma diversidade de plantas cultivadas e não cultivadas (QUAEDVLIEG et al., 2013; VERKLEY et al., 2013). A espécie tipo, a partir da qual o gênero foi descrito, é *S. cytis*. Esta espécie foi isolada a partir de doença incidente em uma leguminosa lenhosa, *Cytisus laburnum* L. (= *Laburnum anagyroides*), embora, o patógeno também estivesse associado a outras plantas herbáceas pertencentes a família botânica Fabaceae (FARR, 1992; VERKLEY et al., 2013).

O gênero é caracterizado por apresentar formas assexuais em Ascomycota e, embora, formas sexuais sejam desconhecidas para muitos dos taxa, existem relatos que as classificaram principalmente em *Mycosphaerella* e *Sphaerulina* (APTROOT, 2006; CROUS et al., 2000; CROUS et al., 2001; SUTTON; HENNEBERT, 1994; VERKLEY; PRIEST, 2000; VON ARX, 1983).

Antes da classificação e identificação de fitopatógenos possuir o auxílio de aspectos moleculares, a maioria dos taxonomistas adotavam o conceito genérico para *Septoria*, que incluía caracteres morfológicos como, a exemplo, conidiomata picnidial do tipo holoblástica, marrom. Conidióforos reduzidos a células conidiogênicas. Células conidiogênicas de paredes lisas, simpodiais e / ou proliferação percorrente e conídios hialinos, lisos, filiformes a cilíndricos, multi-septados. Micélio imerso, ramificado, septado, de coloração marrom pálida (CONSTANTINESCU, 1984; FARR, 1992; SUTTON, 1980; SUTTON; PASCOE, 1987, 1989).

Características morfológicas em *Septoria* e *Septoria*-like (espécies morfológicamente próximas ao gênero em questão) são geralmente conservadas, e caracteres morfológicos específicos para descrevê-las e identificá-las são limitados. Devido a essa falta de caracteres morfológicos específicos, a taxonomia de *Septoria* passou a depender largamente de informações relacionadas ao hospedeiro, o que conseqüentemente conduziu a muitas das espécies descritas a serem identificadas apenas pela planta hospedeira, e pela variação em caracteres suplementares informativos tais como: comprimento, largura e septação do conídio (JORSTAD, 1965, 1967; SUTTON, 1980;). Destes caracteres suplementares, a largura do conídio parece ser a mais estável (isto é, apresenta a menor variação intraespecífica) e, na maioria das espécies de *Septoria*, a largura do conídio raramente varia mais de 1 μm (PRIEST, 2006).

Recentes estudos que envolveram o sequenciamento de DNA, demonstraram que as características morfológicas que eram utilizadas para delimitar os gêneros de coleomicetos no passado, em particular aquelas características relacionadas à estrutura dos conídios e conidiogênese, não se correlacionavam bem com as sequências filogenéticas inferidas (CROUS et al., 2001; QUAEDVLIEG et al., 2013; VERKLEY et al., 2004a, b).

Estudos filogenéticos moleculares iniciais confirmaram as relações das espécies de *Septoria*-like com forma sexual de *Mycosphaerella zaeae*, e que estes fungos assim como *Septoria* tem origens poli e parafiléticas (CROUS et al., 2001; GOODWIN et al., 2001; SUTTON, 1980; VERKLEY et al., 2004a, b; VERKLEY et al., 2013). Embora anteriormente houvesse sido especulado que *Septoria* seria um gênero polifilético (SUTTON, 1980), a prova dessa hipótese aguardava a introdução de técnicas moleculares. Cunfer e Ueng (1999), foram os primeiros a usar informações de sequências de rDNA da região ITS, para postular que a espécie *Zymoseptoria tritici* (então conhecida como *Septoria tritici*) e várias *Stagonospora* spp. (gênero morfológicamente semelhante e anteriormente ligado a *Septoria*), na verdade pertenciam a dois gêneros distintos (QUAEDVLIEG et al., 2013). Verkley et al. (2004b) estendeu esse estudo empregando uma combinação de 28S rRNA (LSU) para provar que *Septoria* seria poli e parafilético. Seu trabalho mostrou que as espécies *Septoria*-like, como *Z. tritici* e *Z. passerinii* foram mais intimamente relacionadas com *Ramularia* do que com a maioria das outras espécies de *Septoria*, utilizadas nos seus conjuntos de dados. Entretanto, os resultados obtidos não forneceram informações filogenéticas suficientes para discriminação de espécies estreitamente relacionadas, nem resolveram a maioria dos nós internos formados nas árvores. Devido a essas incoerências obtidas a partir das regiões sequenciadas citadas acima, foi realizada pela primeira vez uma abordagem polifásica multilocus, através do sequenciamento da região LSU nrDNA, ITS, e da β -tubulina, o que permitiu identificar com segurança *Septoria* spp., além de possibilitar a separação de espécies estritamente relacionadas em distintos grupos monofiléticos frequentemente relacionadas às suas respectivas famílias de plantas hospedeiras. Entretanto, apesar das árvores inferidas fornecerem uma melhor resolução, ficou claro que ainda seriam necessários mais loci de DNA para resolver totalmente espécies próximas e espécies complexas dentro de *Septoria*. Sequência de genes em multilocus geralmente fornecem uma boa resolução, com o máximo de suporte para a maioria dos nós terminais da árvore filogenética, pois a variação intraespecífica dos genes investigados é menor para a maioria das taxa (FEAU et al., 2006; VERKELEY et al., 2013).

Análises da filogenia a partir da sequência de 7 loci, ITS, genes de RNA (parcial) LSU ribossômicas, RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit), actina (Act), calmodulina (Cal), Tub (β -tubulina), e EF1- α (fator de alongação 1- α), concluíram que as *Septoria*-like estão distribuídas em 3 clados principais (VERKELEY et al., 2013). Foram estabelecidos o gênero *Septoria*, o gênero *Sphaerulina* e o novo gênero *Caryophylloseptoria*. Quinze novos gêneros, diversas novas espécies, além de novas combinações taxonômicas (a exemplo *S. avenae* transferida para o gênero *Parastagonospora* e reconhecida atualmente como *P. avenae*) também foram estabelecidas, a partir de 370 isolados. Este estudo, somado aos estudos de (QUAEDVLIEG et al., 2013). Ainda no estudo de Verkeley et al. (2013), os resultados elucidaram que todos os genes utilizados no estudo foram capazes de distinguir as espécies do conjunto de dados utilizados, entretanto, com diferenças na distinção para algumas espécies por alguns genes, como por exemplo a β -tubulina, que não foi capaz de separar sozinho algumas espécies. Por isso, os autores recomendam a utilização de pelo menos 2 loci codificantes de proteína para identificar *Septoria* e gêneros afins. Sendo que, as regiões EF1- α e β -tubulina apresentaram elevada taxa de sucesso na amplificação e a maior percentagem de resolução de espécies, quando comparados com os outros loci utilizados no estudo, por tanto, segundo os mesmos autores seria recomendável a utilização destes dois loci em multilocus com outros genes para identificação das espécies no gênero.

Gama de hospedeiros de *S. lycopersici*

A especificidade quanto ao hospedeiro durante muito tempo foi um critério decisivo na delimitação das espécies do gênero *Septoria*, isso devido a insuficiência de características morfológicas úteis e devido ao alto nível de variação nelas existentes (JORSTAD 1965; SUTTON, 1980; QUAEDVLIEG et al., 2013; VERKELEY et al., 2013).

Tradicionalmente, espécies de *Septoria* que eram morfológicamente muito semelhantes, mas encontradas em plantas hospedeiras de diferentes famílias botânicas foram consideradas como taxa distintas (VERKELEY et al., 2013). Vários estudos pareciam confirmar amplamente a crença geral de que as espécies de *Septoria* têm uma variedade de hospedeiros que são limitados a um único gênero de plantas e, em relativamente poucos casos também incluíam alguns gêneros próximos da mesma família botânica (PRIEST, 2006). Entretanto, pesquisas com inoculação em diversas hospedeiras demonstraram que, a identificação de *Septoria* spp. apenas pela especificidade ao hospedeiro estaria propensa a erros, pois algumas espécies não são restritas a um hospedeiro específico (BEACH, 1919; TETEREVNIKOVA-

BABAYAN, 1987). Esse fato foi demonstrado em estudos mais atuais que constataram algumas exceções, ou seja, que algumas espécies têm uma ampla gama de hospedeiras, mais do que o esperado, incluindo hospedeiros de mais de uma família, como exemplo, a espécie *S. protearum*, anteriormente associada apenas à família Proteaceae, que foi encontrada também em associação com plantas hospedeiras de mais seis famílias, incluindo fanerógamas e criptogâmicas, como: Araceae (*Zantedeschia*), Aspleniaceae (*Asplenium*), Rutaceae (*Boronia*), Boraginaceae (*Myosotis*), Oleandraceae (*Nephrolepis*) e Rosaceae (*Geum*) e a espécie *S. paridis* Pass. associada às famílias Liliaceae e Violaceae (VERKELEY et al., 2013).

Outro fato observado ao longo dos estudos com o referido gênero é que, diferentes espécies de *Septoria* poderiam parasitar uma mesma planta hospedeira (DEMAREE; WILCOX 1943; SHIN; SAMEVA, 2004). No trabalho mais recente com as espécies do gênero, estas foram descritas taxonomicamente e organizadas em uma seção final, de acordo com suas respectivas famílias de hospedeiras, a exemplo, a família Apiaceae que é infectada pelas espécies *Septoria aegopodii* Desm., *S. aegopodina* Sacc., *S. anthrisci* Pass. & Brunau., *S. apícola* Spog., *S. heraclei* Lib., *S. petroselini* Desm. e *S. sii* Roberge ex Desm. e a família Asteraceae infectada por *Septoria chromolaenae* Crous & Den Breejën., *S. chrysanthemella* Sacc., *S. ekmaniana* Petr. & Cif., *S. erigerontis* Peck., *S. hypochoeridis* Petrov, *S. lactucae* Pass., *S. leucanthemi* Sacc. & Spieg., *S. matricariae* Syd., *S. putrida* Strasser e *S. senecionis* Westend. de (VERKELEY et al., 2013). Apesar de vários resultados obtidos neste trabalho, quanto a confirmação da gama de hospedeiras, a nível de família botânica, para algumas espécies do gênero *Septoria*, nenhuma espécie associada a família Solanaceae fora citada no referido trabalho. Todavia, segundo a literatura, já existem relatos que a espécie *S. lycopersici*, possa além de infectar o tomateiro, sobreviver também em associação a outras solanáceas como, batata, berinjela e plantas daninhas como *Solanum carolinense* L. (urtiga-de-cavalo), *Solanum nigrum* L. (erva-moura) e a outro gênero pertencente as Solanáceas, como *Datura stramonium* L. (estramônio) (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013a). Como as Solanáceas são uma família representada por diversos gêneros e espécies de plantas, algumas com amplo cultivo na agricultura e outras como plantas silvestres, e devido à escassez de trabalhos quanto a gama de possíveis hospedeiras alternativas de *S. lycopersici*, torna-se necessário um estudo mais abrangente a fim de elucidar possíveis fontes alternativas de inóculo para plantios de tomateiro.

Manejo da Septoriose do tomateiro

Para o manejo da septoriose, recomenda-se o plantio de mudas de boa procedência. A prática de rotação de culturas com gramíneas, por pelo menos 1-2 anos, para evitar o acúmulo de inóculo no solo. Destruição de restos culturais logo após a colheita. Coberturas do solo, de plástico ou de resíduos orgânicos, devem ser utilizadas para reduzir o contato entre a folhagem e o solo. Plantio distante de lavouras mais velhas ou infectadas com o patógeno, adubação balanceada, arejamento entre plantas através de espaçamento adequado e a aplicação de fungicidas como medida preventiva (LOPES; REIS; ÁVILA, 2003; LOPES; REIS, 2011; STEVENSON, 2014; ZAMBOLIM et al., 2000).

No que se refere à resistência, não existem cultivares comerciais de tomate resistentes à septoriose (HANSEN, 2009). Entretanto, resultados de algumas pesquisas indicam que futuramente há a possibilidade de obtenção de cultivares resistentes, pois fontes de resistência foram encontradas em ensaio com cultivares em casa de vegetação e no com germoplasma de tomate cultivado e selvagem campo (SATELIS; BOITEUX; REIS, 2010). De 124 acessos, dez acessos foram classificados como altamente resistentes e 33 como resistentes. Um acesso de *S. habrochaites* com elevada resistência e oito acessos resistentes foram identificados. Cinco novas fontes com elevados níveis de resistência foram identificadas em acessos da espécie *S. peruvianum* (PI-306811, CNPH-1036, LA-1910, LA-1984 e LA-2744) (SATELIS; BOITEUX; REIS, 2010).

Comumente o controle da septoriose em tomateiro é realizado com a aplicação foliar de fungicidas de contato e sistêmicos, muitas vezes já utilizada no controle da pinta preta (*Alternaria* sp.) e da requeima (*Phytophthora infestans*). Entretanto, os fungicidas de contato apresentam menor eficiência que os sistêmicos, por serem facilmente removidos pela água da chuva ou irrigações por aspersão (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013a). Atualmente no Brasil, existem 79 produtos comerciais registrados para o controle da doença, entre eles os de ação multi sítio, como o clorotalonil (cloronitrilas) e os sistêmicos (sítio específico), tiofanato-metílico (metil benzimidazol carbamatos- MBC), tebuconazol (Fungicidas inibidores da desmetilação- DMI) e azoxistrobina (Fungicidas inibidores da quinona externa-QoI) (AGROFIT, 2019).

É importante frisar que, atualmente quase todos os fungicidas usados na agricultura demonstram melhor efeito quando aplicados antes que a infecção ocorra, pois, quando presentes na superfície dos órgãos da planta, os fungicidas destroem os esporos dos fungos ou suprimem os tubos de germinação, as hifas e outras estruturas fúngicas, embora, em muitos casos serem necessárias medidas de controle da doença após a ocorrência da infecção, ou seja, após o patógeno já estar esporulado ou após o surgimento dos sintomas (IVIC, 2010). No que

refere-se ao manejo da septoriose do tomateiro a partir de fungicidas, pesquisas indicam que para uma maior eficácia deste método, seja necessário realizar uma programação preventiva da aplicação, ou seja, antes que a doença ocorra nas primeiras folhas inferiores, sendo a primeira aplicação realizada quando os primeiros frutos do primeiro cacho sejam visíveis, logo após a queda das flores (HANSEN, 2009). Contudo, vale ressaltar que a estratégia química para o controle pode ser pouco eficiente sob condições favoráveis de temperatura e precipitação, ou quando a doença já se encontra instalada em cultivos onde foram plantadas cultivares muito suscetíveis (AGROFIT, 2019; PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013a; STEVENSON, 2014; ZAMBOLIM et al., 2000).

Quando as condições ambientais forem muito favoráveis à infecção e dispersão de conídios, e quando as plantas estiverem em período de crescimento, recomenda-se a aplicação de fungicidas a cada 7 a 10 dias. Em algumas regiões, recomenda-se aplicar clorotalonil ou maneb, rotacionados com azoxistrobina a cada 7 dias. Pois uma rotação de ingredientes ativos possibilita o retardo do desenvolvimento de isolados do fungo resistentes a fungicidas, como a azoxistrobina (HANSEN, 2009; STEVENSON, 2014).

Resistência a fungicidas

A utilização de fungicidas representa uma das principais metodologias para o controle de doenças de plantas, constituindo parte integrante da produção eficiente de alimentos. Entre diversos motivos, a facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos tornaram a utilização de fungicidas amplamente difundidos em diversas culturas (GHINI; KIMATI, 2000).

Quanto ao modo de ação, os fungicidas podem ser categorizados como multi-sítios ou sítios específicos (McGRATH, 2004). Os primeiros, inibem simultaneamente uma ampla gama de enzimas e estruturas celulares, o que oferece proteção preventiva às plantas. Já os sítio- específicos são caracterizados por apresentar ação contra um único ponto da via metabólica do patógeno ou contra uma única enzima ou proteína necessária para o fungo (McGRATH, 2004).

Quanto aos fungicidas multi-sítios têm-se, como exemplo, as cloronitrilas, que foram introduzidas em 1960, sendo consideradas o principal fungicida não sistêmico de ação protetora, de amplo espectro, por controlar um grande número de fungos. Apresenta ação fungistática e fungicida (TOMLIN, 2002). O mecanismo de ação do clorotalonil, quimicamente denominado tetrachloroisophthalonitrile, ocorre a partir da união do fungicida

aos grupos sulfidril e mercapto. A conjugação com sulfidrilas na germinação de células fúngicas, conduz à interrupção da glicólise, pois o fungicida evita a ativação da enzima gliceraldeído-3-fosfato de hidrogenase e talvez outras enzimas similares, que por sua vez resulta na falta de energia. Com a desativação destas enzimas, atuantes no ciclo de Krebs, o ATP não é produzido, o que conseqüentemente leva a morte das células fúngicas por não completarem processos necessários para sua formação e viabilidade (RODRIGUES, 2006).

O clorotalonil é recomendado para o controle de várias doenças fúngicas em uma diversidade de culturas, como o algodoeiro, amendoim, arroz, banana, batata, beterraba açucareira, cafeeiro, citros, cucurbitáceas, fruteiras de caroço, gramas, olerícolas, a exemplo, no controle de *S. lycopersici* no tomateiro etc (AGROFIT, 2019; RODRIGUES, 2006; TOMLIN, 2002).

Entre os produtos com ação sítio-específico destacam-se os pertencentes ao grupo dos tiofanatos (MBC), triazois (DMI) e das estrobilurinas (QoI) etc. Estes fungicidas agem inibindo diferentes vias biossintética dos patógenos, tais como síntese de ácido nucleico, mitose e divisão celular, respiração celular, síntese de aminoácidos e proteínas, síntese de lipídios, biossíntese de esterol na membrana, biossíntese da parede celular, e síntese de melanina na parede celular (FRAC, 2012, 2015).

MBC é o nome dado ao grupo de fungicidas que produzem um composto químico denominado carbendazin, que é o principal agente tóxico dos MBC, cujo nome químico é metil-2-benzimidazole carbamato (BCM ou MBC) (KUS; ALTANLAR, 2003). Os MBCs são formados por 2 grupos, os dos benzimidazois e dos tiofanatos. Os primeiros são chamados de benzimidazois típicos, por apresentarem em sua estrutura química um anel heterocíclico e os segundos são chamados de benzimidazois atípicos, sem o anel heterocíclico, neste último grupo destaca-se o tiofanato-metílico. Diferentemente dos benzimidazois típicos, que sofrem o processo de hidrólise para produção do carbendazin, o tiofanato-metílico produz via ciclização degradativa, e independente da forma estrutural e via de produção, ambos produzem o carbendazin e por isso, muitos pesquisadores classificam os fungicidas tiofanato como MBC (BRIGGS et al., 2002; FRAC, 2015; HEWITT, 1998; PICININI, 1994; RODRIGUES, 2006). O carbendazin tem a afinidade de se ligar à tubulina, uma proteína que compõem os microtúbulos do fuso mitótico e que formaria o citoesqueleto celular, durante a fase de metáfase no processo de mitose. Devido a essa ligação, da molécula fungicida com as tubulinas, ocorre a inibição da mitose e de outros processos celulares, pois os microtúbulos não se unem. A formação dos microtúbulos é distorcida, o que impede por sua vez a divisão

do núcleo e a consequente separação, o que por sua vez resulta na morte da célula (GHINI; KIMATI, 2002; HEWITT, 1998).

O Tiofanato-metílico denominado quimicamente de methyl benzimidazol-2-ylcarbamate, pode ser recomendado para diversas culturas como, fruteiras, a exemplo, banana, cerejas, abacaxi, maçã, mamão, manga, morango. Olerícolas como a abóbora, alho, berinjela, cebola, feijão, feijão vagem, cucurbitáceas, ervilha, batata, berinjela, beterraba, além de doenças do tomateiro, como a septoriose (AGROFIT, 2019; RODRIGUES, 2006).

Os DMI correspondem aos fungicidas que atuam na biossíntese de esteróis. O mecanismo de ação destes fungicidas deve-se ao acúmulo de esteróis como o 4,4-dimetil e o 4 α -metil, ambos com radical 14 α -metil, ao promover a inativação do processo de desmetilação do lanosterol até compostos intermediários, que são precursores do ergosterol. O ergosterol, é o principal esterol presente na membrana celular, que aumenta as propriedades da bicamada lipídica tornando-a menos fluída, e a redução da disponibilidade de ergosterol resulta no rompimento da membrana e no extravasamento de solutos iônicos com consequente morte da célula. Com a ausência do ergosterol e com o aumento de compostos intermediários, há a promoção da desorganização da estrutura celular, o que por sua vez acarretará a indução da formação de membranas alternativas. Com doses elevadas do fungicida observa-se dano direto sobre a membrana, além de alterações morfológicas. Estas alterações se caracterizam por inchamento das células, vacuolização excessiva, septação incompleta, aparecimento de vesículas entre a membrana e a parede celular e a formação de inclusões membranosas (RODRIGUES, 2006; TOMLIN, 2002; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007).

Dentre os DMI, os triazóis podem agir como protetores, exercendo ação tóxica sobre a formação do tubo germinativo e no apressório, ou de forma curativa, impedindo o crescimento micelial e o desenvolvimento do haustório (FORCELINI, 1994). Os principais representantes pertencentes a esse grupo são azaconazol, bromuconazol, difenoconazol, ipconazol, tebuconazol etc (FRAC, 2015; RODRIGUES, 2006). O tebuconazole denominado quimicamente como (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol, é recomendado para diversos cultivos, incluindo cereais (*Puccinia* spp., *Septoria* spp. e *Fusarium*), em amendoim (*Micosphaerella* spp., *Puccinia arachidis*, *Sclerotium rolfsii*), e batata (*A. solani*) e tomate (*Septoria lycopersici*, *Alternaria solani*) (AGROFIT, 2019; RODRIGUES, 2006).

Os QoI correspondem aos fungicidas que atuam no sítio de oxidação da ubiquinol. O mecanismo de ação, deste fungicidas, ocorre através da inibição da respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c1, no sítio Qo,

interferindo na produção de ATP. Por interferir no metabolismo primário, essa classe de fungicidas apresenta amplo espectro de ação sobre diferentes filos do reino Fungi, como Basidiomycota e Ascomycota (SIEROTZKI, 2015). As moléculas pertencentes ao grupo das estrobilurinas atuam preventivamente inibindo a germinação de esporos, apresentando alguma ação curativa e erradicante inibindo o desenvolvimento dos fungos nos estádios iniciais de pós-germinação, com atividade antiesporulante (RODRIGUES, 2006; VENÂNCIO et al., 1999). Os principais representantes pertencentes a esse grupo são a pyraclostrobina (methoxy-carbamates), fluoxastrobina (grupo químico dihydro-dioxazines) e a azoxistrobina (grupo químico methoxy-acrylates) etc (FRAC, 2015; RODRIGUES, 2006).

A azoxistrobina quimicamente é o methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy) pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3- methoxyacrylate, é amplamente utilizado contra fungos fitopatogênicos em diversas culturas como *Pyricularia oryzae* e *Bipolaris oryzae* em arroz, *Puccinia*, *Drechslera*, *Bipolaris sorokiniana* em cereais de inverno; *Phakopsora pachyrhizi*, *Cercospora kikuchi* e *Septoria glycines* em soja e *Alternaria* spp. e *Septoria lycopersici* em tomate etc (AGROFIT, 2019; RODRIGUES, 2006).

Apesar dos vários benefícios da utilização de fungicidas para o controle de diversas doenças, seu uso contínuo e de forma indiscriminada pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, o que inviabiliza seu controle pelo fungicida anteriormente eficaz e coloca em risco a eficiência do método, tornando atualmente a resistência como um dos mais importantes problemas do controle químico de doenças de plantas (AZEVEDO, 2001; GHINI; KIMATI, 2002).

A resistência aos fungicidas é considerada um ajuste estável e herdável que resulta na redução da sensibilidade de um fungo a determinado fungicida. Esta habilidade é obtida através de processos evolutivos e o risco de resistência está relacionado com o grupo químico a que pertence o fungicida, especificamente ao seu modo de ação (EUROPEAN, 1988; McGRATH, 2004; REIS; REIS; FORCELINI, 2007).

A resistência depende de três tipos de fatores, o primeiro relacionado ao fungo e sua maior capacidade reprodutiva e variabilidade genética, características que possibilitam maiores chances de adaptação a um novo fungicida. O segundo fator relacionado ao fungicida e seu modo de ação específico, característica inerente aos fungicidas sistêmicos, ou seja, quanto mais específica a afinidade fungicida-fungo, maior probabilidade de resistência. E o terceiro fator, as práticas quanto a aplicação, dosagem, intervalo e número de aplicações, sendo por tanto a ocorrência de mutantes resistentes proporcional a frequência de uso do produto, como consequência da pressão induzida. Sendo que as condições climáticas

favoráveis ao patógeno e o manejo deficiente da cultura atuam como agravantes dos três fatores citados (GARCIA, 1999).

O desenvolvimento de resistência ocorre quando os isolados resistentes surgem a partir de uma taxa natural de mutação genética muito baixa, sendo esses isolados menos afetados pelo fungicida. Uma vez que o fungicida pode controlar efetivamente os isolados sensíveis, os isolados resistentes podem tornar-se dominantes na população sob pressão de seleção com o uso do fungicida, ao longo do tempo, e conseqüentemente falhas no controle da doença pode eventualmente ocorrer (MA; MICHAILIDES, 2005).

É importante ressaltar que até o ano de 1970, quase todos os fungicidas utilizados eram inibidores multi-sítio. Apesar da sua ampla utilização, a resistência a esses compostos era um evento raro. Entretanto, desde a introdução dos fungicidas do tipo sítio específico, no final de 1960, a resistência em fungos fitopatogênicos tornou-se um problema importante para a proteção de plantas (BRENT, 1995). Em decorrência disso, os casos de resistência, que até a década de 70 limitavam-se a menos de 10 gêneros de fungos passaram a cerca de 64 casos em 1988 (DELP, 1988).

A aplicação de produtos tipo específico, apresenta alto risco para o desenvolvimento de resistência em relação aos fungicidas múltiplo-sítio, pois propicia a seleção de células resistentes, eliminando as sensíveis, e ao longo dos anos, com o uso intensivo desses fungicidas, os fungos vêm adquirindo resistência a determinados produtos. Pois uma única mutação no patógeno normalmente permite superar a ação do fungicida, como por exemplo, pela incapacidade do fungicida em se ligar ao ponto de ação nos fungos (McGRATH, 2004; PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009).

Um dos casos mais conhecidos, por se tratar do primeiro relato sobre resistência de fungos à fungicidas sistêmicos e apenas um ano após o lançamento, foi o do fungicida benomyl (grupo dos MBC), para o controle do Oídio das cucurbitáceas, causada por *Podosphaera fuliginea* (Sinonímia: *Sphaerotheca fuliginea*). Após esse relato, diversos outros foram registrados, como a resistência de *Botrytis cinerea* também ao benomyl, em morango, pimentão, batata e eucalipto, além de diversos outros exemplos, todos relatados no Brasil (CABRINI; KIMATI, 1986; GHINI; KRUGNER, 1987; GHINI, 1990, 1996; GHINI; KIMATI, 2002).

Os níveis de resistência a fungicidas podem ser mensurados em laboratório, a partir da exposição de uma coleção de fungos provenientes de uma população de campo, ao fungicida e, em seguida, é medida a resposta de toxicidade. Essa resposta é geralmente mensurada pela inibição do crescimento micelial, germinação do esporo, ou infecção na planta para fungos

que não podem ser cultivados em meio de cultura. Posteriormente, a concentração efetiva para inibir 50% do crescimento micelial (CE50), germinação dos esporos, ou infecção passa a ser estimada para cada amostra individual (DAMICONE; SMITH, 2019).

Diversos resultados foram obtidos a partir de ensaios de laboratório, a exemplo testes de sensibilidade *in vitro* de isolados de *Septoria tritici* (*Zimoseptoria tritici*) a Trifloxistrobina (grupo dos QoIs), obtidos nos anos de 1999, 2004 e 2008 obtiveram valores de EC50 <0,00013 mg ml⁻¹, >0,4 mg ml⁻¹ e >0,4 mg ml⁻¹, respectivamente, demonstrando aumento gradativo da EC50 no tempo, com perda total da sensibilidade (BEYER et al., 2011). Variação e redução de sensibilidade para alguns isolados também foi constatada, a partir de testes com folhas destacadas de soja, tratadas com diversas concentrações de tebuconazol (DMI) e inoculadas com isolados de *Phakopsora pachyrhizi*. A amplitude da sensibilidade foi calculada a partir da SRF, ou seja, pelo fator de redução da sensibilidade, onde valores >1,0 indicaria redução na sensibilidade do isolado, sendo que oito isolados de um total de 18, apresentaram SRF >2,0 mg/L (REIS; DEUNER; ZANATTA, 2015). Resistência de *B. cinerea*, do morangueiro, à tiofanato-metilico (MBC) também foi constatada em testes *in vitro*, onde os valores para EC50 foram superiores 688 µg /ml (BAGGIO; PERES; AMORIM, 2018).

O monitoramento da sensibilidade tornou-se indispensável, pois possibilita determinar a presença de populações de fungos resistentes e por consequência verificar a eficácia dos programas de tratamentos com fungicidas, portanto, o monitoramento da resistência é particularmente importante para garantir o controle eficaz da doença, sendo crucial para a compreensão da distribuição, evolução e o impacto da resistência a fungicidas em campo (KIMATI, 1987; SIAH et al., 2014). Para a indústria de fungicidas, a avaliação do risco da resistência em proporções que causem falha ou significativa diminuição do controle da doença em campos comerciais, tem importância fundamental. Tal avaliação influencia as decisões sobre a seleção e o lançamento de novos produtos no mercado, a estratégia de uso de forma a garantir a eficiência por um longo prazo e o tipo de monitoramento que deve ser realizado (GHINI; KIMATI, 2002).

Cabe ressaltar também que, o surgimento da resistência em fungos a determinados fungicidas, leva a consequências danosas para diversos segmentos de uma sociedade, prejuízos que vão desde a empresa que propiciou altos investimentos para lançar um produto e que perde a confiabilidade dos clientes e sua posição no mercado. Como para o agricultor, que ao aplicar um fungicida que não controla a doença, tende a intensificar as aplicações sem obtenção dos resultados esperados, o que por sua vez encarece a produção. Assim como para

o consumidor, pela possibilidade de receber um produto com altos índices de resíduos de pesticidas e por maiores preços. Além de tudo isso, tem a contaminação do meio ambiente, quando os fungicidas são utilizados de forma inadequada (GHINI; KIMATI, 2002; KIMATI, 1987).

Diante do exposto, e considerando o aumento em importância da referida doença na cultura do tomateiro, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização de isolados de *Septoria*, a partir de informações de sequências de DNA, características morfológicas e culturais, visando o esclarecimento da etiologia da septoriose do tomateiro no Brasil. Objetivou-se também investigar se o agente etiológico da septoriose do tomateiro é patogênico a outras culturas de importância econômica e a plantas denominadas invasoras, e se os isolados apresentariam sensibilidade aos principais fungicidas utilizados para manejo da doença. As informações obtidas ajudarão a entender a epidemiologia da doença, servindo de subsídio para o desenvolvimento de medidas de controle mais efetivas, o que possibilitará minimizar as perdas na produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura Brasileira**. FNP: Consultoria Andamp; Comércio, São Paulo, p. 416-423, 2018.

AGROFIT - Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 jan. 2019.

APTROOT, A. ***Mycosphaerella and its anamorphs 2***. Conspectus of *Mycosphaerella*. CBS Biodiversity Series 5. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2006. 231 p.

AZEVEDO, L. A. S. **Proteção integrada de plantas com fungicidas: teoria, prática e manejo**. São Paulo: ISBN, 2001. 230 p.

BAGGIO, J. S.; PERES, N. A.; AMORIM, L. Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from conventional and organic strawberry fields in Brazil to azoxystrobin, iprodione, pyrimethanil, and thiophanate-methyl. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 102, n. 9, p. 1803-1810, 2018.

BARKSDALE, T. H. Control of an epidemic of *Septoria* leaf spot of tomato by resistance. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, n. 1, p. 239-240, 1982.

BEACH, W. S. Biologic specialization in the genus *Septoria*. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 6, p. 1-32, 1919.

BEYER, M.; KIESNER, F.; VERREET, J.-A.; KLINK, H. Fungicide sensitivity of *Septoria tritici* field isolates is affected by an interaction between fungicidal mode of action and time. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 93, n.1 (Supplement), p. s7-s13, 2011.

BRENT K. J. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? Bruxelas: GIFAP, 1995. 48 p.

BRIGGS, J.; WHITWELL, T.; FERNANDEZ, R.T.; RILEY, M.B. Effect of integrated pest management strategies on chlorothalonil, metalaxyl, and thiophanate-methyl runoff at a container nursery. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 127, p. 1018-1024, 2002.

CABRINI, H. M.; KIM ATI, H. Ocorrência de isolados de *Botrytis cinerea* Per ex Fr. Resistentes a benomyl em morangos (*Fragaria* spp.) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 12. p. 16. 1986.

CARDOSO, B. C. **Produtividade e qualidade de tomate com um e dois cachos em função da densidade de plantio, em hidroponia**. 2007. 49 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CARVALHO, J. L.; PAGLIUCA, L. G. Tomate: Um mercado que não para de crescer globalmente. **Revista Hortifruti Brasil**, Piracicaba, n.58, p.6-14, 2007.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A. L. R.; LOURENÇÃO, A. L.; MELO, A. M. T.; SIQUEIRA, W. J. Detecção do *Chrysanthemum* stem necrosis viruses em tomateiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.25, n.2, p. 252-254, 2000

CONSTANTINESCU, O. Taxonomic revision of *Septoria*-like fungi parasitic on Betulaceae. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge v. 83, p. 383-398, 1984.

CROUS, P. W.; APTROOT, A.; KANG, J.C.; BRAUN, U.; WINGFIELD, M. J. The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 45, p-107-121, 2000.

CROUS, P. W.; KANG, J-C.; BRAUN, U. A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequences and morphology. **Mycologia**, New York, v. 93, n. 1, p. 1081-1101, 2001.

CUNFER, B. M.; UENG, P. P. Taxonomy and identification of *Septoria* and *Stagonospora* species on small-grain cereals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 267-284, 1999.

DAMICONE, J.; SMITH, D. Fungicide Resistance Management. Oklahoma Cooperative Extension Service. Disponível em: <<http://osufacts.okstate.edu>> Acesso em: 16 jan. 2019.

DELP, C. P. **Fungicide resistance in North America**. Saint. Paul: APS Press. 1988. 133 p.

DEMAREE, J. B.; WILCOX, M. S. The fungus causing the so-called “*Septoria* leafspot disease” of raspberry. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 33, p. 986-1003, 1943.

EMBRAPA. **Catálogo brasileiro de hortaliças**. Saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no Brasil. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2010. 60 p.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Fungicides resistance: definitions and use of terms. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. **European and Mediterranean Plant Protection Organization**, Paris, n. 1, p. 569-571, 1988.

FAO. Food and agricultural organization. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

FARR, D. F. Species of *Septoria* on the *Fabaceae*, subfamily *Faboidae*, tribe *Genistae*. **Sydowia** v. 44, n. 1, p. 13-31, 1992.

FEAU, N.; HAMELIN, R. C.; BERNIER, L. Attributes and congruence of three molecular data sets: inferring phylogenies among *Septoria*-related species from woody perennial plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 40, n. 1, p. 808–829, 2006.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2008. 421 p.

FORCELINI, C. A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 335-355, 1994.

FRAC. Fungicide resistance action committee. FRAC code list: fungicide sorted by mode of action, 2012. Disponível em: < <http://www.frac.info/publication/anhang/FRAC-CodeList2011-final.pdf> > Acesso em: 20 fev. 2019.

FRAC. Fungicide resistance action committee. FRAC Code List 2015: fungicides sorted by mode of action. 2015. Disponível em: <Disponível em: <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf?sfvrsn=4> >. Acesso em: 20 fev. 2019.

GARCIA, A. **A resistência dos fungos como consequência da utilização de fungicidas sistêmicos**: mecanismos de resistência, monitoramento e estratégias anti-resistência. Porto Velho: Embrapa-CPAF, 1999. 28 P. (Documentos, 45).

GHINI, R. Ocorrência e sensibilidade colateral de linhagens de *Botrytis cinerea* resistentes a benzimidazóis em berinjela, em Registro, SP. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 16, p. 36, 1990.

GHINI, R. Ocorrência de resistência em linhagens de *Botrytis cinerea*, no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 285-288, 1996.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. 78 p.

GHINI, R.; KRUGNER, T. L. Ocorrência de *Botrytis cinerea* resistente a benomyl em viveiro de *Eucalyptus viminalis*, em Três Barras, SC. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.13, n. 1, p.36, 1987.

GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 648–658, 2001.

GOULD. W. A. **Tomato production, processing and technology**. 3ed. Baltimore: Woodhead Publishing, 1992. 550 p.

HANSEN, M. A. Septoria leaf spot of tomato. Orono: Virginia Cooperative Extension Plant Disease, 2009. Disponível em: < <http://anr.ext.wvu.edu/r/download/57038>>. Acesso em 30 jan. 2019.

HEWITT, H. G. **Fungicides in crop protection**. Oxon, UK: CAB International, 1998. 221 p.

INDEX FUNGORUM. *Septoria*. Disponível em:< <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>. Acesso em: 05 jan. 2019.

INCAPER- INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSAO RURAL. Tomate. Vitória: Incaper, 2010. 430 p.

INOUE-NAGATA, A. K.; LOPES, C. A.; REIS, A.; PEREIRA, R. B.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; PINHEIRO, J. B.; LIMA, M. F. **Doenças do tomateiro** (*Lycopersicon esculentum*). In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016 v. 2, p. 697-732.

IVIC, D. **Curative and Eradicative Effects of Fungicides**. In: CARISSE, O (Ed.). **Fungicides**. Shanghai: InTech, 2010. p. 3-22.

JENKINS, J. A. The origin of the cultivated tomato. **Economic Botany**, New York, v. 2, n. 1, p. 379-392, 1948.

JORSTAD, I. **Septoria and septoroid fungi on dicotyledones in Norway**. Oslo: Oslo University Press, 1965. 110 p.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLomon, D. W. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, p. 141-149, 1997.

KAPOORIA, R.G.; NDUNGURU, J. Rare symptoms and conidial variation in *Septoria lycopersici* in Zambia. **Mycopathologia**, Haia, v. 142, n.1, p. 101-105, 1998.

KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento.

Agrotécnica, São Paulo, n.1, p.5-7. 1987.

KUS, C.; ALTANLAR, N. Synthesis of some new benzimidazole carbamate derivatives for evaluation of antifungal activity. **Turkish Journal of Chemistry**, Istanbul, n. 27, p. 35-39, 2003.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. 152p.

LOPES, C. A.; REIS, A.; BOITEUX, L. S. **Doenças fúngicas**. In: LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. v. 1, p. 17-51.

LOURENÇO Jr., V; REIS, A.; COSTA, C. A. Frutos vulneráveis. **Hortaliças e Frutas: Cultivar**, Pelotas, n 98, p. 28-29, 2016.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop protection**, Guildford, v. 24, p. 853-863, 2005.

MCGRATH, M. T. What are Fungicides. **The Plant Health Instructor**, New York, 2004.

Disponível em: < <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/fungicides.aspx>.

Acesso em: 15 ago. 2019.

NAIKA S.; JEUDE, J. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, 2006. 104 p.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, São Luís, v. 3, n. 2, p. 34, 2009.

PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. **Recomendações para o manejo da septoriose em tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013a. 4 p. (Comunicado Técnico, 96).

PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. **Diagnose e controle alternativo de doenças em tomate, pimentão, cucurbitáceas e cenoura**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013b. 16 p. (Circular técnica, 121).

PICININI, E. C. Fungicidas benzimidazoles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 357-409, 1994.

PRIEST, M. J. Fungi of Australia. **Septoria**. Melbourne: ABRS, Canberra: CSIRO Publishing, 2006. 259 p.

QUAEDVLIEG, W.; VERKLE, G. J. M.; SHIN, H-D.; BARRETO, R. W.; ALGENAS, A. C., SWART, W. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P.W. Sizing up *Septoria*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 75, n. 1, p. 307–390, 2013.

REIS, A.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. **Mancha de Septoria**: doença limitante do tomateiro no período de chuvas. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 6 p. (Comunicado Técnico, 37).

REIS, E. M.; REIS, A. C.; FORCELINI, C. A. **Manual de fungicidas**: guia para o controle químico de doenças de plantas. 5ª. ed. Passo Fundo: Editora da Universidade de Passo Fundo, 2007. 136p.

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo frac**. 2006. 249 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.

SATELIS, J. F.; BOITEUX, L. S.; REIS, A. Resistência a *Septoria lycopersici* em espécies de *Solanum* (Secção *Lycopersicon*) e em progênies de *S. lycopersicum* × *S. peruvianum*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.67, n.3, p. 334-341, 2010.

SEYMOUR, C. P.; RIDINGS, W. H. **Septoria leaf spot of tomato**. Bari: Dept. Agric. and Consumer Serv. Division of Plant Industry- Plant Disease, 1980. 2 p. (Circular, 210).

SHIN, H. D.; SAMEVA, E. F. **Septoria in Korea. Republic of Korea**: National Institute of Agricultural Science and Technology, 2004. 183 p.

SIAH, A.; ELBEKALI, A. Y.; RAMDANI, A.; REIGNAULT, P.; TORRIANI, S. F. F.; BRUNNER, P. C.; HALAMA, P. QoI Resistance and Mitochondrial Genetic Structure of *Zymoseptoria tritici* in Morocco, **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 8, 2014.

SIEROTZKI, H. **Respiration Inhibitors: Complex III**. In: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance in plant pathogens: Principles and a guide to practical management. Japan: Springer, 2015. p. 119-143.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. **Tomate para Processamento Industrial**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 16 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 20).

STEVENSON, W. R. *Septoria* Leaf Spot. In: JONES, J.B.; ZITTER, T.A.; MOMOL, T.M.; MILLER, S.A. **Compendium of Tomato Diseases and Pests**. 2nd Ed., St. Paul, APS PRESS, 2014. p.42-43.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

SUTTON, B. C.; HENNEBERT, G. L. Interconnections amongst anamorphs and their possible contribution to ascomycete systematics. In: HAWKSWORTH, D. L. **Ascomycete systematics: problems and perspectives in the nineties**. New York: Plenum Press, 1994. p. 77-98.

SUTTON, B. C.; PASCOE, I. G. *Septoria* species on Acacia. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 89, p. 521-532, 1987.

SUTTON, B. C.; PASCOE, I. G. Some *Septoria* species on native Australian plants. **Studies in Mycology**, Utrecht v. 31, p. 177-186, 1989.

TETEREVNIKOVA-BABAYAN, D. N. **Fungi of the genus *Septoria* in the U.S.S.R.** Erevan: Akademiya Nauk Armyanskoi SSR, 1987. 480 p.

TOMLIN, C. D. S. **The pesticide manual: a world compendium.** Surrey, Uk: British Crop Protection Council, 12 ed., 2002. 1344 p.

VENANCIO, W. S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E. L.; SOUZA, N. L. Novos fungicidas. I – Produtos naturais e derivados sintéticos: estrobilurinas e fenilpirroles. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão anual de patologia de plantas**, Passo Fundo, v.7, p. 103-55, 1999.

VERKLEY, G. J. M.; PRIEST, M. J. *Septoria* and similar coelomycetous anamorphs of *Mycosphaerella*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 45, n. 1, p. 123-128, 2000.

VERKLEY, G. J. M.; STARINK-WILLEMSE, M. A phylogenetic study of some *Septoria* species pathogenic to *Asteraceae* based on ITS ribosomal DNA sequences. **Mycological Progress**, Würzburg, v. 3, n. 1, p. 315–322, 2004a.

VERKLEY, G. J. M.; STARINK-WILLEMSE, M.; IPEREN, A VAN.; ABELN, E. C. A. Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear ribosomal DNA. **Mycologia**, New York, v. 96, n. 1, p. 558–571, 2004b.

VERKLEY, G. J. M.; QUAEDVLIEG, W.; SHIN, H. D.; CROUS, P.W. A new approach to species delimitation in *Septoria*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.75, p.213-305, 2013.

VON ARX, J. A. *Mycosphaerella* and its anamorphs. Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Series C - **Biological and Medical Sciences**, Orono, v. 86, n. 1, p. 15–54, 1983.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas de hortaliças.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 576 p.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, S.V.; OLIVEIRA, S. H. F. **Manejo da Resistência de Fungos a Fungicidas.** Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2007, 168p.

ZITTER, T. A. The Long List of Diseases Affecting Tomatoes and Peppers in a Wet Growing Season. Ithaca: Cornell University, 2001. Disponível em: <
<http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/WetSeason/Disease%20-%20Tomato1.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

CAPÍTULO II

Caracterização molecular, morfológica e patogênica do agente causal da septoriose do tomateiro no Brasil

1 **Caracterização molecular, morfológica e patogênica do agente causal da septoriose do**
2 **tomateiro no Brasil**

3
4 **C. A. da Costa¹, V. Lourenço Jr.², A. Reis².** ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco,
5 Recife, Pernambuco, Brasil. ²Embrapa Hortaliças, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
6 eng.christiane.a.costa@gmail.com; valdir.lourenco@embrapa.br; ailton.reis@embrapa.br.
7

8 **Resumo**

9 A mancha de Septoria é considerada uma das mais importantes doenças da cultura do
10 tomateiro. Segundo a literatura a doença tem como agente etiológico *Septoria lycopersici*,
11 fitopatógeno ainda pouco estudado. Diante disso, isolados coletados de diferentes regiões
12 produtoras de tomate do Brasil foram caracterizados por métodos moleculares, morfológicos e
13 culturais. Um conjunto de 104 isolados foi sequenciados para as regiões Tub, Cal e EF1- α .
14 Dez isolados foram selecionados, com base na região geográfica de origem e tipo de lesão
15 foliar (típica e atípica), para a caracterização morfocultural e para o experimento de avaliação
16 da agressividade em tomateiro da cultivar Santa Clara e em outras espécies de solanáceas. Os
17 isolados foram cultivados em meio farinha de aveia ágar (FAA). O crescimento micelial foi
18 avaliado nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C. Para a avaliação da gama de hospedeiras
19 de *Septoria*, plantas cultivadas e silvestres de solanáceas foram inoculadas com uma
20 suspensão de esporos, de 4 isolados selecionados do patógeno. Os resultados demonstraram
21 que, todos os isolados agruparam com o isolado tipo da espécie *S. lycopersici* nas árvore de
22 máxima verossimilhança construída para Tub, EF1- α e para análise concatenada. Verificou-se
23 também haver grande variabilidade entre e dentro dos isolados no quesito comprimento dos
24 conídios em meio FAA, além de se constatar que a temperatura ótima, para o crescimento da
25 colônia ficou em cerca de 18°C. Observou-se que os 10 isolados selecionados para o teste de
26 patogenicidade em tomateiro foram capazes de induzir sintomas típicos da doença, mas
27 diferiram em sua agressividade. Um total de 8 espécies de solanáceas foram identificadas
28 como potenciais hospedeiras alternativas de *S. lycopersici*. Todos esses conhecimentos
29 obtidos propiciarão uma avaliação mais precisa dos riscos envolvidos com a introdução de
30 novas culturas, em especial do gênero *Solanum*, em áreas onde *S. lycopersici* já está presente,
31 além de propiciarem um melhor subsídio para o estabelecimento de métodos mais eficientes
32 no manejo da Septoriose do tomateiro em condições naturais e nos diferentes sistemas de
33 produção desta olerícola.

34 **Palavras chave:** *Solanum lycopersicum*, *Septoria lycopersici*, morfologia, agressividade,
35 gama de hospedeiras.

36 **Molecular, morphological and pathogenic characterization of the causal agent of**
37 **Septoria leaf spot of tomato in Brazil.**

38
39 **Abstract**

40 Septoria leaf spot is considered one of the most important diseases of tomato crop. According
41 to the literature the disease has as etiologic agent *Septoria lycopersici*, to which there are few
42 studies. Therefore, isolates collected from different tomato producing regions of Brazil were
43 characterized by molecular, morphological and cultural methods as well as pathogenicity. A
44 set of 104 isolates was sequenced for the Tub, Cal and EF1- α regions. Ten isolates were
45 selected, based on the geographical region of origin and type of foliar lesion (typical and
46 atypical), for the morphocultural characterization and for the experiments of evaluation of the
47 aggressiveness on tomato of the cultivar Santa Clara and pathogenicity on Solanaceae plant
48 species. The isolates were cultured in oatmeal ágar medium (OA). The mycelial growth was
49 evaluated at temperatures of 10, 15, 20, 25 and 30° C. For the evaluation of the host range of
50 *Septoria*, cultivated and wild solanaceous plants were inoculated with a spore suspension of 4
51 selected isolates of the pathogen. The results showed that all isolates grouped with *S.*
52 *lycopersici* type species isolate in the maximum likelihood tree constructed for Tub, EF1- α
53 and for the concatenated analysis. There was also a great variability between and within the
54 isolates in the length of conidia in OA medium, and it was found that the optimal temperature
55 for the growth of the colony was about 18°C. We observed that the 10 isolates selected for the
56 tomato pathogenicity test were able to induce typical symptoms of the disease, but differed in
57 their aggressiveness. A total of 8 species of Solanaceae were identified as potential alternative
58 hosts of *S. lycopersici*. All this knowledge will provide a more accurate evaluation of the risks
59 involved with the introduction of new crops, especially of the *Solanum* genus, in areas where
60 *S. lycopersici* is already present, besides providing a better subsidy for the establishment of
61 more efficient methods in the management of Septoria leaf spot of tomato under natural
62 conditions and in the different systems of production of tomato.

63
64 **Keywords:** *Solanum lycopersicum*, *Septoria lycopersici*, morphology, aggressiveness, host
65 range.

66
67
68
69

70 **Introdução**

71

72 A septoriose ou mancha de *Septoria* do tomateiro é uma importante doença em épocas
73 chuvosas. O primeiro relato da doença foi feito em 1882 na Argentina, entretanto, hoje
74 existem relatos de ocorrência desta doença em quase todas as regiões produtoras de tomate,
75 do Brasil e do mundo (BARKSDALE, 1982; INOUE-NAGATA et al., 2016; STEVENSON,
76 2014; ZAMBOLIM et al., 2000).

77 A septoriose pode ocorrer em todos os estágios de desenvolvimento da cultura do
78 tomateiro (SEYMOUR; RIDINGS, 1980; ZITTER, 2001). Os sintomas iniciais são
79 observados nas folhas mais velhas, geralmente por ocasião da formação do primeiro cacho de
80 frutos, através de numerosas manchas circulares a elípticas, de 2 a 3 mm de diâmetro, com as
81 bordas escurecidas e o centro cor de palha (REIS; BOITEUX; LOPES, 2006). Entretanto, em
82 1996 na Zâmbia durante a estação chuvosa a doença foi caracterizada por apresentar dois
83 tipos de manchas foliares nas cultivares de tomateiro ‘Supermarglobe’ e ‘Heinz. A
84 identificação da espécie baseou-se apenas em caracteres morfológicos, sendo o isolado
85 classificado como tipo 1 (T1) causou manchas castanhas escuras com o diâmetro máximo de
86 5 mm. Contudo, o isolado tipo 2 (T2) causou lesões de cor castanha acinzentada com vários
87 anéis concêntricos e diâmetro de 4 a 12 mm, sendo os isolados distinguidos apenas com base
88 em diferenças morfológicas (KAPOORIA; NDUNGURU, 1998). No Brasil, tem-se
89 observado nas regiões produtoras de tomate sintomas similares aos descritos na Zâmbia.
90 Entretanto, inexitem estudos tanto a nível de Brasil quanto a nível mundial que visem
91 esclarecer se esses surtos epidêmicos da doença estão associados com mais de uma espécie de
92 *Septoria*.

93 A etiologia da mancha de *Septoria* do tomateiro tem sido atribuída ao fungo *Septoria*
94 *lycopersici*, espécie pertencente ao gênero *Septoria* Sacc., este com formas assexuais dentro
95 do filo Ascomycota (REIS; BOITEUX; LOPES, 2006; VERKLEY et al., 2013). O gênero
96 *Septoria* é extremamente grande e durante os últimos 150 anos mais de 3000 táxons têm sido
97 atribuídos a ele (VERKLEY et al. 2004a, b). Entretanto, durante muito tempo sua posição
98 filogenética permaneceu incerta até que alguns trabalhos envolvendo análises moleculares
99 esclareceram sua origem filogenética, além de suas relações com as chamadas *Septoria*-like,
100 nome que designa gêneros de fungos com características morfológicas próximas às de
101 *Septoria* (CROUS et al., 2001; CUNFER e YOUNG, 1999; GOODWIN et al., 2001;
102 SUTTON, 1980; VERKLEY et al., 2004a, b). Todavia através do sequenciamento da região
103 LSU nrDNA, região ITS e da β -tubulina, foi possível identificar com segurança as espécies

104 dentro desse gênero (FEAU et al., 2006). Todavia, ainda seriam necessários sequenciar mais
105 loci de DNA para resolver totalmente espécies próximas e espécies complexas dentro de
106 *Septoria* (VERKLEY et al., 2013). Assim sendo, mais tarde Verkeley et al. (2013) ao
107 analisarem a filogenia a partir da sequência de 7 loci, ITS, genes de RNA (parcial) LSU
108 ribossômicas, RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit), actina (Act), calmodulina
109 (Cal), Tub (β -tubulina), e EF1- α (fator de alongação 1- α), concluíram que as *Septoria*-like
110 estão distribuídas em 3 clados principais. Foram estabelecidos o gênero *Septoria*, o gênero
111 *Sphaerulina* e o novo gênero *Caryophylloseptoria*. Este estudo, somado aos estudos de
112 QUAEDVLIEG et al. (2013) estabeleceram 15 novos gêneros, diversas novas espécies, além
113 de novas combinações taxonômicas (a exemplo *S. avenae* transferida para o gênero
114 *Parastagonospora* e reconhecida atualmente como *P. avenae*), utilizando 370 isolados,
115 representando 170 espécies de taxa semelhantes ao gênero *Septoria*, em seus estudos.

116 Antes da classificação e identificação de fitopatógenos possuir o auxílio de aspectos
117 moleculares, a maioria dos taxonomistas adotava o conceito genérico para *Septoria*. Este
118 conceito incluía caracteres morfológicos como, a exemplo, conidiomata picnidial do tipo
119 holoblástica, marrom; conidióforos reduzidos a células conidiogênicas; células conidiogênicas
120 de paredes lisas, simpodiais e / ou proliferação percorrente; conídios hialinos, lisos, filiformes
121 a cilíndricos, multi-septados; micélio imerso, ramificado, septado, de coloração marrom
122 pálida (CONSTANTINESCU, 1984; FARR, 1992; SUTTON, 1980; SUTTON; PASCOE
123 1987, 1989). Entretanto, recentes estudos que envolveram o sequenciamento de DNA, têm
124 demonstrado que as características morfológicas que eram utilizadas para delimitar os gêneros
125 de coelomicetos no passado, em particular aquelas características relacionadas à estrutura dos
126 conidiomas e conidiogênese, não se correlacionavam bem com as sequências filogenéticas
127 inferidas (CROUS et al., 2001; QUAEDVLIEG et al., 2013).

128 Caracteres morfológicos em *Septoria* são geralmente conservados e características
129 morfológicas específicas para descrevê-las e identificá-las são limitadas e altamente variáveis.
130 Por isso, devido a essa falta de caracteres morfológicos específicos, a taxonomia do gênero
131 passou a depender de informações relacionadas à especificidade quanto ao hospedeiro. Isso
132 fez com que esse critério fosse considerado, durante muito tempo, como decisivo na
133 delimitação das espécies do gênero (JORSTAD 1965; SUTTON, 1980; QUAEDVLIEG et al.,
134 2013; VERKELEY et al., 2013). Entretanto, ao longo dos estudos com o referido gênero foi
135 constatado que diferentes espécies poderiam parasitar uma mesma espécie de planta e que
136 uma espécie poderia parasitar várias hospedeiras, inclusive de famílias botânicas diferentes.
137 No trabalho mais recente envolvendo o grupo das *Septoria*-like estas foram descritas

138 taxonomicamente e organizadas em uma seção final, de acordo com suas respectivas famílias
139 de hospedeiras (VERKELEY et al., 2013), contudo, nenhuma espécie associada à família
140 Solanaceae fora citada no referido trabalho. Como as solanáceas são uma família representada
141 por diversos gêneros e espécies de plantas, algumas com amplo cultivo na agricultura e outras
142 como plantas silvestres, e devido à escassez de trabalhos quanto à gama de possíveis
143 hospedeiras alternativas de *S. lycopersici*, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um estudo
144 mais abrangente a fim de elucidar possíveis fontes alternativas de inóculo para plantios de
145 tomateiro. Além disso, esclarecer se os surtos epidêmicos da doença no Brasil, e em especial
146 aqueles relacionados à ocorrência de lesões foliares atípicas, estão associados com mais de
147 uma espécie de *Septoria*.

148

149 **Material e métodos**

150

151 **Obtenção dos isolados**

152

153 Os isolados foram obtidos de folhas de tomateiro com sintomas típicos de septoriose.
154 As amostras de folhas foram coletadas em sete estados brasileiros mais o Distrito Federal. As
155 coletas foram feitas tanto em cultivos de tomate para o processamento industrial, quanto para
156 mesa (Tabela 1). Todas as amostras foliares foram acondicionadas em caixas Gerbox, sob
157 condições de câmara úmida para induzir a formação de estruturas do fungo (picnídios). Cirrus
158 (massas de esporos) produzidos sobre os picnídios foram transferidos, com auxílio de um
159 estilete esterilizado, para a extremidade de placas de Petri contendo meio Batata Dextrose
160 Agar (BDA) com tetraciclina (30mg/Litro). Após isto, com auxílio de uma alça de platina, os
161 esporos foram espalhados na superfície do meio, de modo semelhante ao que se faz com
162 bactérias, visando obter colônias oriundas de um único esporo. Os isolados monospóricos
163 obtidos foram incubados em BDA a 25°C em BOD. Todos os isolados, quando em plena
164 esporulação, foram preservados em tubos de criogenia contendo glicerol a 35% e mantidos na
165 coleção de fungos e oomicetos fitopatogênicos da Embrapa Hortaliças, em ultra freezer à
166 temperatura de -80C°.

167

168 **Extração de DNA, amplificação e sequenciamento**

169

170 Para identificação a nível molecular, os isolados foram cultivados em placas de Petri
171 de 90 mm de diâmetro, contendo meio BDA, por 15 dias a 25 °C com fotoperíodo de 12

172 horas. Usando uma espátula esterilizada, uma pequena quantidade de micélio foi raspada da
173 superfície da colônia e o DNA genômico foi extraído pelo protocolo modificado de Doyle e
174 Doyle (1990). A quantidade de DNA foi estimada em gel de agarose a 1,5% e comparada com
175 marcador Lambda (Invitrogen™) nas concentrações de 20, 50, 100 e 200% e a qualidade
176 estimada em Nanodrop.

177 Um total de 104 isolados foram sequenciados para três loci, Tub, EF1- α e Cal. (Tabela
178 2.). As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 50 μ L contendo 2 μ L
179 de DNA, 28,2 μ L de água, 2,5 μ L de cada primer, 5 μ L do tampão 10x, 3 μ L de MgCl₂, 0,3
180 μ L de Taq DNA Polimerase (Invitrogen™) e 1,5 μ L de DMSO₂ (99,2%) e 5,0 μ l de dNTP
181 (Invitrogen™).

182 As reações de PCR foram realizadas no termociclador Bio-Rad T100TM. O parâmetro
183 de ciclagem consistiu em uma etapa de desnaturação a 96° C por 2 min, seguida por 40 ciclos
184 de amplificação (desnaturação a 96° C por 45 s, temperatura de anelamento (Tabela 2) por 45
185 s, extensão a 72° C por 90 s), e extensão final a 72° C por 2 min. Os produtos de amplificação
186 da PCR foram submetidos à eletroforese em géis de agarose a 1,5%, em tampão Tris-borato
187 (TBE), corados em brometo de etídio e visualizados em fotodocumentador (BioRad). Os
188 produtos de PCR foram purificados usando o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard®
189 (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento de DNA foi realizada
190 pela Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

191

192 **Análise Filogenética**

193

194 As sequências direta e reversa de cada região genômica foram montadas usando o
195 pacote Staden (STADEN et al., 1998). Sequências de consenso foram comparadas, com
196 sequências de espécies pertencentes ao gênero *Septoria*, do banco de dados GenBank. Um
197 alinhamento foi feito pela primeira vez usando o MAFFT v.7 (KATOY; STANDLEY, 2013).
198 Ajustes foram feitos manualmente no MEGA 7.0.14 (KUMAR; STECHER; TAMURA,
199 2016) quando necessário. As sequências foram concatenadas no programa Sequence Matrix
200 1.8 (VAIDYA; LOHMAN; MEIER, 2011). A árvore filogenética foi construída pelo método
201 da máxima verossimilhança (ML), sendo que as análises ML foram realizadas no soft
202 RAxML - HPC2 (STAMATAKIS, 2014) implementadas no portal Science Gateway da
203 CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>). Pesquisas de árvore ML foram
204 realizadas sob o modelo GTRGAMMA com 1000 pseudoreplicatas. O conjunto de sequências
205 de DNA de *Septoria* do tomateiro foi analisado no programa DnaSP v5. (LIBRADO;

206 ROZAS, 2009), para se inferir o número de haplótipos e assim estimar a diversidade genética
207 dentro da população. As análises foram feitas separadamente para cada região genômica.

208

209 **Caracterização morfológica e cultural de *Septoria lycopersici* em diferentes temperaturas**

210

211 A caracterização morfológica foi realizada com o fungo cultivado *in vitro*. Foram
212 utilizados 10 isolados (Tabela 1), selecionados de acordo com a origem geográfica e de
213 acordo com a sintomatologia nas folhas (típica e atípica). Estes isolados foram repicados para
214 meio de farinha de aveia ágar (FAA), e posteriormente, discos com 3mm de diâmetro foram
215 retirados destas colônias, com 20 dias de idade, e transferidos para o centro de placas de Petri
216 descartáveis de 90 mm de diâmetro, contendo FAA. Foram utilizadas cinco repetições para
217 cada isolado. Todos os isolados foram acondicionados em câmara BOD, nas temperaturas de
218 10, 15, 20, 25 e 30°C e fotoperíodo de 12 horas.

219 Os isolados foram avaliados quanto ao diâmetro do crescimento micelial da colônia
220 nas temperaturas citadas acima, enquanto, a mensuração das dimensões dos esporos foi
221 avaliada apenas na temperatura de 25 °C, que é considerada a temperatura ótima para o
222 desenvolvimento de *S. lycopersici* e estabelecimento da doença no campo. A avaliação foi
223 realizada após 4 semanas de incubação. O diâmetro da colônia (mm) foi medido em duas
224 direções perpendiculares, com o auxílio de paquímetro digital. Após finalizadas as medições
225 das colônias, os conídios produzidos foram recolhidos e fixados em lâminas microscópicas
226 contendo lactofenol. Um conjunto de conídios de cada isolado foi fotografado e imagens
227 digitais obtidas com a câmera Cannon PowerShot A650 (Cannon Co., Tóquio, Japão) no
228 microscópio Zeiss Primo Star Zeiss Co., Jena, Alemanha). O comprimento, a largura de 30
229 conídios por isolado foram medidos com o software de análise de imagem Motic Image Plus
230 v. 2.0 (Motic Group Co., Pequim, China).

231 Os diâmetros das colônias foram plotados contra a temperatura e uma curva foi
232 ajustada por regressão polinomial quadrática ($y = a + bx + cx^2$). Análise de variância
233 (ANOVA) foi conduzida para determinar a significância das diferenças nas dimensões dos
234 conídios de cada isolado e as médias foram comparadas pelo teste de diferença mínima
235 significativa (LSD) de Fisher ao nível de significância de 5% usando STATISTIX v. 9.0
236 (Analytical Software, Tallahassee, EUA).

237

238 **Agressividade de isolados de *S. lycopersici* em plantas de tomateiro**

239

240 Para avaliação da agressividade dos isolados em casa de vegetação, sementes de
241 tomate da cultivar Santa Clara foram semeadas em bandejas de isopor com 128 células,
242 preenchidas com substrato estéril Plantmax®. Vinte dias após a semeadura, as mudas foram
243 transplantadas para vasos plásticos (0,5 L) contendo o substrato estéril Plantmax®, mais solo e
244 adubo Basacote®. As plantas foram inoculadas 30 dias após a semeadura (DAS).

245 Para o preparo da suspensão de esporos, os isolados foram cultivados em placas de
246 Petri contendo FAA, as quais posteriormente foram acondicionadas em BOD na temperatura
247 de 25 °C, durante 15 dias. O preparo da suspensão do inóculo foi feito com o auxílio de
248 escova de cerdas finas, para cada isolado, e água destilada esterilizada (ADE), que auxiliaram
249 na remoção das massas de esporos contidas nas placas. A suspensão foi filtrada através de
250 gaze e calibrada para a concentração de 2×10^5 conídios/mL, com o auxílio de Câmara de
251 Neubauer. À suspensão calibrada foi adicionado 1 gota por litro de Tween 20, para promover
252 a adesão dos esporos nas folhas inoculadas. Os isolados foram inoculados via pulverização
253 até o início do escorrimento foliar. Após a inoculação, as plantas foram mantidas sob
254 condição de câmara úmida, com temperatura de $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante 48 horas. Pulverização
255 apenas com água, nas plantas, serviram como controle negativo. Para esse teste foram
256 utilizados os mesmos 10 isolados do experimento anterior.

257 O aparecimento dos primeiros sintomas ocorreu sete dias após a inoculação (plantas
258 com 37 DAS), dando-se início às avaliações. Concomitantemente, foram coletados folíolos
259 com sintomas característicos de septoriose e acondicionados em Gerbox por até 48 horas sob
260 condições de câmara úmida, com o objetivo de visualizar as estruturas do patógeno em
261 microscópio estereoscópico e ótico para seu reisolamento e confirmação do agente etiológico.
262 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. Cada unidade
263 experimental foi constituída por 1 vaso contendo 1 planta. O experimento foi repetido uma
264 vez. Os sintomas foram avaliados nos 3 terços da planta, em 1 folíolo terminal de 1 folha para
265 cada terço, totalizando 3 folíolos por planta, com auxílio da escala diagramática adaptada de
266 Boff; Zambolim e Vale (1991). As avaliações foram realizadas em dias alternados, ou seja,
267 com intervalo de um dia a partir da primeira avaliação, totalizando 6 avaliações. Curvas de
268 progresso da doença foram obtidas a partir dos dados da porcentagem de área foliar doente
269 para cada isolado, no tempo. Com os dados de progresso da septoriose foi calculado o valor
270 da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Os valores obtidos foram
271 submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de diferença
272 mínima significativa (LSD) de Fisher ao nível de significância de 5% usando o programa
273 STATISTIX v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, EUA).

274 **Patogenicidade e agressividade de isolados de *S. lycopersici* em espécies cultivadas e**
275 **silvestres de solanáceas**

276

277 Sementes de solanáceas cultivadas e silvestres (Tabela 4) foram semeadas nas mesmas
278 condições do experimento anterior. Trinta a 50 dias após a semeadura, dependendo do ciclo
279 da espécie de planta, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos (2 L). Foram
280 selecionados 4 isolados para o teste (Tabela 1). O preparo de inóculo, o método de inoculação
281 e a condução do experimento foram similares aos procedimentos adotados no experimento
282 anterior. Pulverização com água ou com o inóculo de *S. lycopersici* em plantas de tomateiro
283 serviram como controle negativo e positiva, respectivamente. Foram consideradas suscetíveis
284 ao patógeno, plantas que apresentavam manchas foliares com presença de picnídios e esporos
285 do fungo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada unidade
286 experimental foi constituída por um vaso contendo duas plantas, sendo utilizadas 4 repetições
287 por tratamento. Plantas que apresentaram sintomas de septoriose foram posteriormente
288 utilizadas para um segundo experimento, que consistiu na quantificação da severidade da
289 doença.

290 A severidade da doença foi avaliada aos 15 dias após a inoculação, com auxílio de
291 uma escala de notas de 0 a 5, adaptada de Maluf et al., (1985): 0 = sem sintomas aparentes; 1
292 = dano restrito ao terço inferior das plantas, lesões nas folhas baixas numerosas, mas não
293 coalescentes; 2 = dano não atingindo o terço superior das plantas, lesões nas folhas baixas
294 numerosas, mas raramente coalescentes; 3 = danos não atingindo o terço superior das plantas,
295 lesões nas folhas baixas numerosas, frequentemente coalescentes; 4 = danos não atingindo
296 o terço superior da planta, lesões nas folhas baixas numerosas, coalescentes, mas raramente
297 atingindo 50% da área foliar; 5 = danos atingindo o terço superior das plantas, lesões nas
298 folhas baixas e intermediárias numerosas e coalescentes, atingindo mais de 50% da área
299 foliar e/ou causando desfolha da planta.

300 Foi avaliado o período de incubação e com a média das notas obtidas em cada
301 repetição, o índice de severidade da doença foi calculado de acordo com McKinney (1923),
302 pela expressão: $SV = [\sum (\text{taxa de doença} \times \text{número de plantas em cada taxa}) / (\text{número total de}$
303 $\text{plantas avaliadas} \times \text{taxa máxima doença})] \times 100$. Os dados de SV foram submetidos a análise
304 de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de diferença mínima significativa (LSD)
305 de Fisher ao nível de significância de 5% usando o programa STATISTIX v. 9.0 (Analytical
306 Software, Tallahassee, EUA).

307

308 **Resultados**

309 **Análise Filogenética**

310

311 A análise inicial da sequência dos genes Tub, EF1- α e Cal dos 104 isolados revelou a
312 presença de apenas um haplótipo no programa DnaSP v5, e alto grau de similaridade (>98%)
313 com sequências de isolados da espécie *S. lycopersici* depositadas no GenBank. Dez isolados
314 representando as regiões geográficas de origem e o tipo de lesão foram posteriormente
315 utilizados para inferência filogenética (Tabela 1). *Sphaerulina amelanchier* foi usada como
316 grupo externo (Tabela 3). Tanto o conjunto de sequências combinadas, quanto as sequências
317 (Tub, EF1- α) analisadas separadamente demonstraram que todos os isolados selecionados
318 agruparam com a espécie *S. lycopersici*, com mais de 99% de bootstrap, na análise de
319 Máxima Verossimilhança (Figuras 1, 2 e 3).

320

321 **Caracterização morfológica e cultural de *S. lycopersici* em diferentes temperaturas**

322

323 Com relação ao aspecto das colônias, todos os isolados de *S. lycopersici*,
324 independentemente da faixa de temperatura, apresentaram micélio imerso e de coloração
325 escura. Conídios hialinos, lisos, filiformes, alguns com curvatura leve, e pluriseptados. Com
326 relação às dimensões dos conídios, verificou-se haver diferença estatística entre os isolados,
327 no quesito comprimento, pelo Teste de LSD ($P \leq 0,05$). Sete entre os 10 isolados apresentaram
328 esporos ligeiramente menores, quando comparados ao descrito na literatura para a referida
329 espécie, e apenas 1 isolado apresentou esporos com comprimento superior, embora a média de
330 todos os isolados esteja dentro do intervalo descrito para *S. lycopersici*. Oito isolados
331 apresentaram conídios ligeiramente mais largos, mas não houve diferença estatística entre os
332 isolados (Tabela 5).

333

334 Quanto ao teste de crescimento micelial, verificou-se que todos os isolados cresceram
335 dentro de uma faixa de temperatura entre 10 e 25°C. Na temperatura de 30°C o pequeno
336 crescimento ocorreu apenas sobre o disco de micélio, portanto, não podendo ser estimado.
337 Para obter a temperatura de máximo crescimento micelial, foi calculada a derivada primeira
338 da equação de crescimento micelial e verificou-se que o máximo crescimento foi de 18,33
339 mm na temperatura de 18,30°C (Figura 4).

339

340 **Agressividade de isolados de *S. lycopersici* em plantas de tomateiro**

341

342 Todos os isolados avaliados foram patogênicos em plantas de tomateiro da cultivar
343 Santa Clara, resultando em sintomas a partir de 7 dias após a inoculação, embora tenha havido
344 diferença significativa ($P \leq 0,05$) na agressividade entre eles. Os isolados Sep 317 e Sep 319
345 proporcionaram menor valor de AACPD e não diferiram estatisticamente entre si, ao contrário
346 do isolado Sep 81 que apresentou maior valor, seguido dos isolados Sep 312 e Sep 313 que
347 diferiram entre si. Os demais isolados apresentaram um comportamento intermediário e não
348 diferiram entre si (Tabela 6). As curvas de progresso da doença indicam visualmente as
349 diferenças da dinâmica de progresso para cada isolado. De um modo geral, até os 39 DAS (9
350 dias após a inoculação), a maioria dos isolados apresentou um nível semelhante de
351 agressividade nas folhas. A partir dos 39 DAS houve um aumento diferenciado na
352 percentagem de área foliar infectada, permitindo a distinção dos isolados quanto à
353 agressividade (Figura 5).

354

355 **Patogenicidade e agressividade de isolados de *S. lycopersici* em espécies cultivadas e** 356 **silvestres de solanáceas**

357

358 Embora a maioria das espécies do gênero *Septoria* seja patogênica apenas a seu
359 hospedeiro de origem, nossos resultados detectaram que, oito espécies dentre as plantas
360 inoculadas apresentaram sintomas de manchas e sinais da doença (Tabela 4). Os sintomas
361 eram caracterizados como pequenas manchas foliares, circulares e de bordos castanhos com
362 centro cor de palha, além de coalescência para algumas espécies, sintomas similares aos
363 típicos da doença em plantas de tomateiro. Além disso, havia presença de picnídios com
364 cirrus de esporos do patógeno. *Solanum gilo* (cultivar Verde Claro e CNPH 222), *S. viarum*
365 (CNPH 44), *S. sessiliflorum* (CNPH 67), *S. mammosum* (CNPH 36), *S. paludosum* (CNPH
366 205) e *D. metel* apresentaram sintomas após 6 dias de inoculação, enquanto, *S. melongena*
367 (CNPH 788) e *S. acanthodes* (CNPH 145) após 8 dias. Este é o primeiro registro das espécies
368 de solanáceas *S. viarum*, *S. sessiliflorum*, *S. paludosum* e *D. metel* como potenciais plantas
369 hospedeiras de *S. lycopersici* a partir de inoculação artificial. Em *S. melongena*, os sintomas
370 apareceram apenas no acesso CNPH 788, com ausência de sintomas na cultivar Ciça. Para a
371 espécie *S. gilo*, ambas cultivares, Jiló Verde Claro e o acesso CNPH 222 foram suscetíveis
372 (Prancha 1).

373

374 No segundo experimento de gama de hospedeiras foram realizadas duas análises. A
375 primeira análise consistiu em comparar a severidade da doença, entre as plantas inoculadas,
em função de cada isolado separadamente. E na segunda análise foi comparada a

376 agressividade, entre os isolados, em função de cada planta inoculada. Na primeira análise,
377 embora todos os isolados demonstrassem capacidade de infectar as nove hospedeiras, a
378 severidade da doença variou entre as plantas para apenas um isolado, ou seja, apenas para o
379 isolado Sep 211 houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) da severidade entre o conjunto de
380 plantas (para os outros isolados os dados não são demonstrados). Portanto, tomando-se como
381 referência apenas o isolado Sep 211 constatou-se que, *S. paludosum* (CNPH 205), *S.*
382 *mamosum* (CNPH 36), *S. acanthodes* (CNPH 145) e *S. gilo* (Cultivar Verde Claro)
383 apresentaram maior severidade da doença e não diferiram estatisticamente entre si, enquanto,
384 *S. viarum* (CNPH 44), *S. melongena* (CNPH 788), *S. sessiliflorum* (CNPH 67) e *D. metel*
385 apresentaram menor severidade também não diferindo estatisticamente entre si. *S. gilo*
386 (CNPH 222) apresentou valor intermediário entre os grupos de plantas (Tabela 7). Na
387 segunda análise, verificou-se haver diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os isolados apenas
388 para *S. acanthodes* (CNPH 145) e *S. gilo* (CNPH 222 e cultivar Verde Claro) (para as outras
389 espécies de plantas inoculadas os dados não são demonstrados). Quando inoculados em *S.*
390 *acanthodes* (CNPH 145), os isolados Sep 211 e Sep 352 apresentaram maior valor de
391 agressividade, enquanto, os isolados Sep 81 e Sep 312 menor valor, ambos diferindo
392 estatisticamente entre si. Com relação a *S. gilo* (CNPH 222 e Verde Claro), em ambos acessos
393 o isolado Sep 81 apresentou agressividade muito superior aos demais isolados, embora, para
394 CNPH 222 apenas dois grupos de isolados agressivos tenham se formado, enquanto para a
395 cultivar Verde Claro formaram-se três grupos (Tabela 8).

396

397 **Discussão**

398

399 Neste trabalho a espécie *S. lycopersici* foi identificada preliminarmente apenas com a
400 região Tub com 99% de bootstrap, e com a região EF1- α com 100 % de bootstrap na árvore
401 de máxima verossimilhança. O mesmo resultado não foi obtido para a região Cal, a qual
402 apresentou-se pouco informativa em termos de identificação da espécie (dados não
403 demonstrados). Em outros trabalhos ao ser analisada a filogenia de *Septoria* e *Septoria-like* a
404 partir de sequências de 7 loci: região ITS, genes de RNA (parcial) LSU ribossômicas, RPB2
405 (RNA polymerase II second largest subunit), Act, Cal, Tub e EF1- α , concluiu-se que os cinco
406 últimos loci foram capaz de distinguir as espécies do conjunto de dados utilizados, porém com
407 diferenças na distinção para algumas espécies (VERKELEY et al., 2013). Um bom conjunto
408 de locus não deve apresentar sobreposição entre as distâncias inter e intraespecífica no
409 modelo Kimura-2-prâmetro (K2P), e deve apresentar uma distância interespecífica pelo

410 menos dez vezes mais alta que a distância intraespecífica do locus (HEBERT et al., 2003).
411 Diante disso, ainda no trabalho de Verkeley et al. (2013) foram realizadas análises baseadas
412 no cálculo da distância entre e dentro das espécies de *Septoria*-like, para cada região
413 genômica usando o modelo K2P, e os autores concluíram com base no dataset estudado que,
414 Tub apresentou relação 29:1, EF1- α 26:1 e Cal 14:1, este último apresentando a menor
415 relação dentre os melhores loci estudados. Resultados estes que puderam ser confirmados em
416 nosso estudo, com a alta eficiência de Tub e EF1- α e a baixa eficiência de Cal para uma boa
417 resolução filogenética de *Septoria*. O mesmo resultado foi obtido para espécies de
418 *Mycosphaerella* e outras espécies próximas a esta, incluindo algumas espécies de *Septoria*
419 (QUAEDVLIEG et al., 2012). Entretanto, os resultados deste trabalho demonstraram a
420 presença de apenas 1 haplótipo dentro de *S. lycopersici*, o que poderia ser entendido de duas
421 formas, como uma baixa eficiência destas regiões genômicas para estudos mais aprofundados,
422 como o de biologia de populações de uma espécie fúngica ou que um mesmo isolado deste
423 patógeno tenha sido disseminado para as diferentes regiões produtoras de tomate a partir de
424 sementes. Portanto, *S. lycopersici* foi a única espécie identificada como agente etiológico de
425 septoriose em tomateiro no Brasil, independentemente do tipo de lesão (típica ou atípica) da
426 qual foi obtido o isolado, confirmando o que já havia sido relatado na literatura (INOUE-
427 NAGATA et al., 2016; STEVENSON, 2014; ZAMBOLIM et al., 2000).

428 Na caracterização morfológica e cultural, os 10 isolados selecionados apresentaram
429 independentemente da faixa de temperatura, características similares às características típicas
430 descritas para *S. lycopersici* (SUTTON; WATERSTON, 1966). Embora tenhamos observado
431 no quesito dimensões dos conídios, na temperatura ótima de 25 °C, um comprimento
432 ligeiramente menor e largura ligeiramente maior quando comparados ao descrito na literatura.
433 Entretanto, é possível que o meio de cultura, no nosso caso o de farinha aveia ágar e as
434 condições de cultivo, tenham influenciado estes resultados quando comparados aos obtidos
435 diretamente de material vegetal. Dentre os caracteres comprimento, largura e septação do
436 conídio para a identificação suplementar das espécies do referido gênero, a largura do conídio
437 é considerada a mais estável, ou seja, a que apresentaria a menor variação intraespecífica
438 (PRIEST, 2006). Por tanto, confirmamos a grande variabilidade intraespecífica no quesito
439 comprimento de conídios, não só existente entre os isolados de *S. lycopersici* mas dentro de
440 um mesmo isolado. Diante desta inconsistência de resultados ressaltamos que o critério de
441 identificação morfológica não deve ser único para separar espécies, pois fornece informações
442 insuficientes e pode variar, já que também obtivemos medidas de largura maiores quando
443 comparadas às medidas de referência para *S. lycopersici*.

444 Quanto a avaliação do crescimento micelial, o máximo crescimento foi de 18,33 mm
445 na temperatura de 18,30°C, resultados próximos àqueles apontados como favoráveis (15°C a
446 27°C, ótima de 25°C) ao desenvolvimento da mancha de Septoria em tomateiro (PEREIRA;
447 CARVALHO; PINHEIRO, 2013; STEVENSON, 2014), embora, nossos resultados *in vitro*
448 tenham também demonstrado a possibilidade do crescimento micelial em temperatura abaixo
449 do limite mínimo relatado pela literatura. Entretanto, apenas testes *in vivo* em temperatura de
450 10°C, somadas a boas condições de umidade, poderiam confirmar a possibilidade de o
451 patógeno infectar e causar doença em tomateiro.

452 Os sintomas foliares foram semelhantes para todos os isolados, com o
453 desenvolvimento de manchas circulares de bordas escurecidas, centro cor de palha e posterior
454 produção de picnídios, sintomas esses independentes da característica do tipo de mancha
455 (típica ou atípica) da qual esses isolados foram obtidos. Entretanto, observou-se diferença na
456 agressividade entre os isolados, o que pode ser reflexo de uma variabilidade na população de
457 *S. lycopersici* no Brasil. Este fato foi observado também ao se avaliar a reação de 8 isolados
458 de *S. lycopersici* provenientes de diferentes regiões dos Estados Unidos, em uma série de
459 cultivares de tomateiro, e também em híbridos de tomateiro versus *S. peruvianum*. Os
460 resultados obtidos demonstraram a presença de 3 grupos de isolados, baseados na virulência
461 (COOK, 1954).

462 A maioria das solanáceas que foi suscetível à *S. lycopersici* neste estudo pertence ao
463 gênero *Solanum*, com exceção de uma espécie (*D. metel*). Esse fato parece demonstrar uma
464 faixa mais estreita de hospedeiras, dentro do gênero *Solanum*, para *S. lycopersici*. Ao se
465 inocular quatro isolados de *S. lycopersici*, dois de berinjela e dois de tomateiro, observou que
466 todos os isolados foram patogênicos ao *S. gilo* e à *S. melongena* (REIS, 2010). Entretanto,
467 neste estudo os isolados selecionados causaram sintomas apenas no acesso CNPH 788 e
468 ausência de sintomas na cultivar Ciça de berinjela. Este fato sugere uma possível relação gene
469 a gene entre isolados de *S. lycopersici* e cultivares de berinjela, conforme já foi observado em
470 tomateiro (ANDRUS; REYNARD, 1945; BARKSDALE; STONER, 1978). As espécies *S.*
471 *gilo* e *S. melongena* são culturas amplamente cultivadas no Brasil e, portanto, podem fornecer
472 inóculo primário de *S. lycopersici* para cultivos de tomateiro, principalmente para o tomateiro
473 estaqueado, uma vez que este costuma ser plantado nas mesmas regiões que as espécies
474 citadas. Ao ser estudada a gama de hospedeiras de *S. tritici* (*Zimoseptoria tritici*), agente
475 etiológico da mancha foliar do trigo, observou-se que sob certas condições artificiais este
476 fungo poderia ser patogênico às espécies *Secale cereale* e *Lolium rigidum*, todavia não foi
477 possível estabelecer a doença nas condições naturais de campo (HAGHDEL;

478 BANIHASHEMI, 2005). Logo com relação às espécies de plantas *S. gilo*, *S. viarum*, *S.*
479 *sessiliflorum*, *S. paludosum* e *D. metel*, não sabemos se a doença é reproduzível em condições
480 de campo, pois isto não foi testado neste trabalho. Entretanto, caso sejam hospedeiras naturais
481 do patógeno, isto também teria implicações epidemiológicas, pois estas espécies também
482 poderiam servir de fontes de inóculo para cultivos de tomateiro.

483 No segundo experimento de avaliação da gama de hospedeiras, foram quantificados o
484 parâmetro severidade da doença entre as plantas e o parâmetro agressividade entre os
485 isolados. Com relação ao primeiro parâmetro, verificou-se que as plantas apresentaram a
486 mesma porcentagem de doença, para 3 dos 4 isolados analisados separadamente, não
487 diferindo entre si. Entretanto, quando analisado o isolado Sep 211 pode-se constatar que, *S.*
488 *paludosum* (CNPH 205), *S. mammosum* (CNPH 36), *S. acanthodes* (CNPH 145) e *S. gilo*
489 (cultivar Verde Claro) foram mais suscetíveis a doença. No segundo parâmetro, observou-se
490 que a agressividade entre isolados diferiu estatisticamente apenas quando inoculados em *S.*
491 *acanthodes* (CNPH 145) e *S. gilo* (CNPH 222 e cultivar Verde Claro). Contudo, estes
492 resultados divergem do obtido por Reis (2010), que ao inocular isolados de *S. lycopersici* em
493 diferentes Solanáceas, entre elas *S. melongena* e *S. gilo*, não observou diferença significativa
494 quanto à agressividade dos isolados.

495 Neste trabalho identificou-se *S. lycopersici* como único agente etiológico da mancha
496 de Septoria, em tomateiro cultivado nas principais regiões produtoras no Brasil. Entretanto,
497 foi constatada a presença de isolados que diferiram em agressividade, tanto em tomateiro
498 quanto em outras plantas do gênero *Solanum*. No teste de patogenicidade nas demais
499 Solanáceas foram identificadas novas e potenciais hospedeiras alternativas de *S. lycopersici*.
500 Pesquisas combinando a caracterização molecular, morfocultural e a gama de hospedeiras
501 para *S. lycopersici* ainda são relativamente escassas na literatura, diante disso, esse trabalho
502 representa um complemento à estas informações. Entretanto, constatou-se a necessidade de
503 estudos mais aprofundados, a fim de se obter conhecimentos básicos sobre a estrutura
504 populacional deste patógeno, a partir de marcadores que sejam mais sensíveis para mensurar a
505 variabilidade genética da população do patógeno. Todas essas informações em conjunto
506 propiciarão uma avaliação mais precisa dos riscos envolvidos com a introdução de novas
507 culturas, em especial do gênero *Solanum*, em áreas onde *S. lycopersici* já está presente. Em
508 adição, estas informações servem de subsídio para o estabelecimento de métodos mais
509 eficientes de manejo da septoriose nos diferentes sistemas de produção de tomate.

510

511

512 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

513

514 ANDRUS, C. F.; REYNARD, C. B. Resistance to *Septoria* leaf spot and its inheritance in
515 tomatoes. **Phytopathology**, Saint Paul, v.35, p.16-24, 1945.

516

517 BAKHSHI, M.; ARZANLOU, M. Multigene phylogeny and morphotaxonomy of *Septoria*
518 spp. from Iran along with a checklist of *Septoria*-like taxa, **Rostaniha**, Tehran, v. 18, n. 2, p.
519 122-141, 2017.

520

521 BARKSDALE, T. H. Control of an epidemic of *Septoria* leaf spot of tomato by resistance.
522 **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, n. 1, p. 239-240, 1982.

523

524 BARKSDALE, T. H.; STONER, A. K. Resistance in tomato to *Septoria lycopersici*. **Plant**
525 **Disease Reporter**, Saint Paul, v.62, p.814-817, 1978.

526

527 BOFF P; ZAMBOLIM L; RIBEIRO DO VALE FX. Escalas para avaliação de severidade da
528 mancha de estenfílio (*Stemphylium solani*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro.
529 **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 280-283, 1991.

530

531 CARBONE I.; KOHN LM. A method for designing primer sets for speciation studies in
532 filamentous ascomycetes. **Mycologia**, New York, v. 91, n.1, p. 553-556, 1999.

533

534 COOK, A. A. Reaction of *Lycopersicon* species to regional isolates of *Septoria lycopersici*.
535 **Phytopathology**, Saint Paul, v. 44, p. 374-377, 1954.

536

537 CONSTANTINESCU, O. Taxonomic revision of *Septoria*-like fungi parasitic on
538 Betulaceae. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge v. 83, p. 383-398,
539 1984.

540 CROUS, P. W.; KANG, J-C.; BRAUN, U. A phylogenetic redefinition of anamorph
541 genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequences and morphology.

542 **Mycologia**, New York, v. 93, n. 1, p. 1081-1101, 2001.

543 CUNFER, B. M.; UENG, P. P. Taxonomy and identification of *Septoria* and *Stagonospora*
544 species on small-grain cereals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 267-
545 284, 1999.

546

- 547 DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15,
548 1990.
- 549
550 FARR, D. F. Species of *Septoria* on the *Fabaceae*, subfamily *Faboideae*, tribe *Genistae*.
551 **Sydowia**, Viena, v. 44, n. 1, p. 13–31, 1992.
- 552 GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora*
553 and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA.
554 **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. p. 648–658, 2001.
- 555 GROENEWALD, J. Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J.; SHIN, H-D.; PARK, J-H, et al.
556 Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**,
557 Utrecht, v. 75, p. 115–170, 2013.
- 558
- 559 HAGHDEL, M.; BANIHASHEMI, Z. A. D. Survival and host range of *Mycosphaerella*
560 *graminicola* the causal agent of Septoria leaf blotch of wheat. **Iranian Journal of Plant**
561 **Pathology**, Tehran, v. 41, n. 4; p. 613- 630, 2005.
- 562
- 563 HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological
564 identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series**
565 **B**, London, v. 270, p. 313–321, 2003.
- 566
- 567 INOUE-NAGATA, A. K.; LOPES, C, A.; REIS, A.; PEREIRA, R. B.; QUEZADO-DUVAL,
568 A. M.; PINHEIRO, J. B.; LIMA, M. F. **Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*)**.
569 In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.
570 (Eds.). **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. São Paulo:
571 Agronômica Ceres, 2016 v. 2, p. 697-732.
- 572
- 573 JORSTAD, I. *Septoria* and septoroid fungi on dicotyledones in Norway. Oslo: Oslo
574 University Press,1965. 110 p.
- 575 KAPOORIA, R.G.; NDUNGURU, J. Rare symptoms and conidial variation in *Septoria*
576 *lycopersici* in Zambia. **Mycopathologia**, Haia, v. 142, n.1, p. 101-105, 1998.
- 577 KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version
578 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford,
579 v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

- 580 KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics
581 Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 33,
582 n. 7, p. 1870-1874, 2016
583
- 584 LIBRADO, P.; ROZAS; J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA
585 polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.
- 586 MALUF, W. R.; MIRANDA, J. E. C.; BITTENCOURT, C. Avaliação da resistência a
587 septoriose em introduções de *Lycopersicon* spp. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 3, n. 1,
588 p. 9-11, 1985.
- 589
- 590 MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat
591 seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Punjab, v. 26,
592 p. 195-218, 1923.
- 593
- 594 O'DONNELL K; CIGELNIK E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a
595 monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular phylogenetics
596 and evolution**, San Diego v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.
- 597 O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary
598 origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear
599 and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the
600 United States of America*, v. 95, p. 2044-2049, 1998.
- 601 PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. **Recomendações para o manejo
602 da septoriose em tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013a. 4 p. (Comunicado
603 Técnico, 96).
- 604 PRIEST, M. J. *Fungi of Australia. Septoria*. Melbourne: ABRS, Canberra: CSIRO
605 Publishing, 2006. 259 p.
- 606 QUAEDVLIEG, W.; GROENEWALD, J. Z.; DE JESÚS YÁÑEZ-MORALES, M.; CROUS,
607 P. W. DNA barcoding of *Mycosphaerella* species of quarantine importance to Europe.
608 **Persoonia**, Beit Dagan, v. 29, p. 101-115, 2012.
- 609 QUAEDVLIEG, W.; VERKLE, G. J. M.; SHIN, H-D.; BARRETO, R. W.; ALGENAS, A. C,
610 SWART, W. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P.W. Sizing up *Septoria*. **Studies in
611 Mycology**, Utrecht, v. 75, n. 1, p. 307–390, 2013.

- 612 REIS, A.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. **Mancha-de-Septoria**: doença limitante do
613 tomateiro no período de chuvas. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 6 p. (Comunicado
614 Técnico, 37).
- 615 REIS, A. **Patogenicidade de isolados de *Septoria lycopersisi* e resistência de espécies de**
616 ***Solanum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2010. 16 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento,
617 70)
- 618 SEYMOUR, C. P.; RIDINGS, W. H. ***Septoria leaf spot of tomato***. Bari: Dept. Agric. &
619 Consumer Serv. Division of Plant Industry- Plant Disease, 1980. 2 p. (Circular, 210).
- 620 STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. **The Staden package**. In: MISENER, S.;
621 KRAWETZ, S. A. (Eds.). *Bioinformatics methods and protocols*. New York: Humana, 1998,
622 p. 115-130.
- 623 STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of
624 large phylogenies. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.
- 625 STEVENSON, W. R. *Septoria Leaf Spot*. In: JONES, J.B.; ZITTER, T.A.; MOMOL, T.M.;
626 MILLER, S.A. **Compendium of Tomato Diseases and Pests**. 2nd Ed., St. Paul, APS PRESS,
627 2014. p.42-43.
- 628 STUKENBROCK, E. H.; QUAEDVLIEG, W.; JAVAN-NIKHAH, M.; ZALA, M.; CROUS,
629 P. W.; MCDONALD, B. A. *Zymoseptoria ardabilia* and *Z. pseudotritici*, two progenitor
630 species of the *Septoria tritici* leaf blotch fungus *Z. tritici* (synonym: *Mycosphaerella*
631 *graminicola*). **Mycologia**, New York, v. 104, p. 1397–1407, 2012.
- 632 SUTTON, B. C. *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*.
633 Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.
- 634
- 635 SUTTON, B. C.; PASCOE, I. G. *Septoria* species on Acacia. *Transactions of the British*
636 *Mycological Society*, v. 89, p. 521-532, 1987.
- 637
- 638 SUTTON, B. C.; PASCOE, I. G. Some *Septoria* species on native Australian plants. **Studies**
639 **in Mycology**, Utrecht, v. 31, p. 177-186, 1989.
- 640
- 641 TETEREVNIKOVA-BABAYAN, D. N. **Fungi of the genus *Septoria* in the U.S.S.R.**
642 Erevan: Akademiya Nauk Armyanskoi SSR, 1987. 480 p.

- 643 VAIDYA, GAURAV.; LOHMAN, D. J.; MEIER, R. SequenceMatrix: concatenation
644 software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon
645 information, **Cladistics**, Londres, v. 27, p. 171–180, 2011.
- 646
- 647 VERKLEY, G. J. M.; STARINK-WILLEMSE, M. A phylogenetic study of some *Septoria*
648 species pathogenic to *Asteraceae* based on ITS ribosomal DNA sequences. **Mycological**
649 **Progress**, Würzburg, v. 3, n. 1, p. 315–322, 2004a.
- 650
- 651 VERKLEY, G. J. M.; STARINK-WILLEMSE, M.; IPEREN, A VAN.; ABELN, E. C. A.
652 Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear
653 ribosomal DNA. **Mycologia**, New York, v. 96, n. 1, p. 558–571, 2004b.
- 654
- 655 VERKLEY, G. J. M.; QUAEDVLIEG, W.; SHIN, H.-D.; CROUS, P.W. A new approach to
656 species delimitation in *Septoria*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.75, p.213-305, 2013.
- 657
- 658 ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas de**
659 **hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. v. 1, 576 p.
- 660 ZITTER, T. A. The Long List of Diseases Affecting Tomatoes and Peppers in a Wet Growing
661 Season. Ithaca: Cornell University, 2001. Disponível em: <
662 [http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/WetSeason/Disease%20-](http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/WetSeason/Disease%20-%20Tomato1.pdf)
663 [%20Tomato1.pdf](http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/WetSeason/Disease%20-%20Tomato1.pdf)>. Acesso em: 20 jun. 2018.
- 664
- 665
- 666
- 667
- 668
- 669
- 670
- 671
- 672
- 673
- 674
- 675
- 676
- 677
- 678
- 679
- 680

681 **Tabela 1-** Isolados de *Septoria lycopersici* usados neste estudo, com a origem geográfica.

Isolado	Sistema de Cultivo	Cidade	Origem ¹	n° Acesso GenBank ²		
				EF1- α	Tub	Cal
Sep1	Indústria	Luziânia	GO			
Sep2	Indústria	Luziânia	GO			
Sep99	Indústria	Luziânia	GO			
Sep100	Indústria	Luziânia	GO			
Sep158	Indústria	Luziânia	GO			
Sep160	Indústria	Luziânia	GO			
Sep162	Indústria	Luziânia	GO			
Sep164	Indústria	Luziânia	GO			
Sep170	Indústria	Cristalina	GO			
Sep187	Indústria	Cristalina	GO			
Sep207	Indústria	Cristalina	GO			
Sep240	Mesa	Goianápolis	GO			
Sep241	Mesa	Goianápolis	GO			
Sep243	Mesa	Goianápolis	GO			
Sep12	Mesa	Formosa	GO			
Sep172	Mesa	Formosa	GO			
Sep13	Mesa	Taguatinga	DF			
Sep14	Mesa	Taguatinga	DF			
Sep15	Mesa	Taguatinga	DF			
Sep193	Mesa	Taguatinga	DF			
Sep204	Mesa	Taguatinga	DF			
Sep17	Mesa	Brasília	DF			
Sep116	Planta espontânea	Brasília	DF			
Sep159	Mesa	Brasília	DF			
Sep161	Mesa	Brasília	DF			
Sep171	Mesa	Brasília	DF			
Sep192	Mesa	Brasília	DF			
Sep206	Mesa	Brasília	DF			
Sep227	Indústria	Brasília	DF			
Sep334	Mesa	Brasília	DF			
Sep41	Mesa	Vicente Pires	DF			
Sep96	Mesa	Ceilândia	DF			
Sep154	Mesa	Ceilândia	DF			
Sep220³	Mesa	Ceilândia	DF			
Sep223³	Mesa	Ceilândia	DF			
Sep341⁴	Mesa	Ceilândia	DF			
Sep342	Mesa	Ceilândia	DF			
Sep59	Mesa	Brazlândia	DF			
Sep165	Mesa	Brazlândia	DF			
Sep257³	Mesa	Brazlândia	DF			
Sep290	Mesa	Brazlândia	DF			
Sep312^{4,5}	Mesa	Brazlândia	DF			
Sep323	Mesa	Brazlândia	DF			

Tabela 1-(Continuação).

Isolado	Sistema de Cultivo	Cidade	Origem ¹	n° Acesso GenBank ²		
				EF1- α	Tub	Cal
Sep313 ^{3,4}	Mesa	Planaltina	DF			
Sep317 ^{3,4}	Mesa	Planaltina	DF			
Sep339	Mesa	Samambaia	DF			
Sep256	Mesa	Planaltina	DF			
Sep16	Mesa	Gama	DF			
Sep20	Mesa	Três Cachoeiras	RS			
Sep21	Mesa	Três cachoeiras	RS			
Sep75	Mesa	Três Cachoeiras	RS			
Sep81 ^{4,5}	Mesa	Três Cachoeiras	RS			
Sep144	Mesa	Três Cachoeiras	RS			
Sep186	Mesa	Três Cachoeiras	RS			
Sep22	Mesa	São Lourenço do Sul	RS			
Sep26	Mesa	São Lourenço do Sul	RS			
Sep129	Mesa	São Lourenço do Sul	RS			
Sep146	Mesa	São Lourenço do Sul	RS			
Sep110	Mesa	São Lourenço do Sul	RS			
Sep52	Cereja/Mesa	Maquiné	RS			
Sep174	Cereja/Mesa	Maquiné	RS			
Sep65	Mesa	Rio grande	RS			
Sep60	Mesa	Rio grande	RS			
Sep109	Mesa	Rio grande	RS			
Sep191	Mesa	Rio grande	RS			
Sep40	Mesa	Pelotas	RS			
Sep84	Mesa	Pelotas	RS			
Sep93	Mesa	Pelotas	RS			
Sep199	Mesa	Pelotas	RS			
Sep107	Mesa	Turuçú	RS			
Sep98	Indústria	Guaíra	SP			
Sep352 ^{4,5}	Indústria	Guaíra	SP			
Sep353	Mesa	Holambra	SP			
Sep198	Mesa	Holambra	SP			
Sep260	Indústria	Patos de Minas	MG			
Sep261	Mesa	Araguari	MG			
Sep262	Mesa	Araguari	MG			
Sep264	Mesa	Araguari	MG			
Sep268	Mesa	Araguari	MG			
Sep235	Mesa	Araguari	MG			
Sep271	Mesa	Cascalho Rico	MG			
Sep272	Mesa	Cascalho Rico	MG			
Sep297	Mesa	Cascalho Rico	MG			
Sep311 ⁴	Mesa	Estrela do Sul	MG			
Sep247	Mesa	Rancho Queimado	SC			
Sep248	Mesa	Angelina	SC			

Tabela 1-(Continuação).

Isolado	Sistema de Cultivo	Cidade	Origem ¹	n° Acesso GenBank ²		
				EF1- α	Tub	Cal
Sep249	Mesa	Angelina	SC			
Sep311⁴	Mesa	Estrela do Sul	MG			
Sep211^{4,5}	Mesa	Caçador	SC			
Sep214	Cereja/Mesa	Venda Nova do Imigrante	ES			
Sep217	Cereja/Mesa	Venda Nova do Imigrante	ES			
Sep344	Cereja/Mesa	Venda Nova do Imigrante	ES			
Sep345	Mesa	Venda Nova do Imigrante	ES			
Sep346⁴	Mesa	Venda Nova do Imigrante	ES			
Sep319⁴	Mesa	Faxinal	PR			
Sep326	Mesa	Faxinal	PR			
Sep329	Mesa	Faxinal	PR			
Sep330	Mesa	Mauá da Serra	PR			
Sep331	Mesa	Mauá da Serra	PR			
Sep287	Mesa	Mauá da Serra	PR			

682 ¹ Origem: DF-Distrito Federal; ES- Espírito Santo; GO-Goiás; MG- Minas Gerais; RS- Rio
683 Grande do Sul; SC- Santa Catarina; SP- São Paulo; PR- Paraná.² Acesso GenBank. ³ Plantas
684 com lesões atípicas de *Septoria*. ⁴ Isolados selecionados para os experimentos de
685 caracterização morfológica e cultural de *Septoria* e quantificação da severidade da doença em
686 plantas de tomateiro. ⁵ Isolados selecionados para o experimento da gama de hospedeiros.

687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708

709 **Tabela 2-** Primers usados nas reações de PCR e sequenciamento.

Locus	Primer	Orientação	Temperatura de anelamento (°C)	Sequência Primer (5' - 3')	Referência
Calmodulina	CAL-235F	Forward	50	TTCAAGGAGGCCTTCTCCCTCTT	Quaedvlieg et al. (2012)
	CAL2Rd	Reverse		TGRTCNGCCTCDCGGATCATCTC	Groenewald et al. (2012)
β -tubulina	T1	Forward	55	AACATGCGTGAGATTGTAAGTT	O'Donnell e Cigelnik (1997)
	B-Sandy-R	Reverse		GCRCGNGGVACRTACTTGTT	Stukenbrock et al. (2012)
Fator de alongação -1 α	EF1-728F	Forward	52	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbone e Kohn (1999)
	EF-2	Reverse		GGARGTACCAGTSATCATGTT	O'Donnell et al. (1998)

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737 **Tabela 3-** Isolados referência de *Septoria*, obtidas do Genbank e usados nas análises
738 filogenéticas.

Espécie	Hospedeira	n° isolado ¹	n° Acesso GenBank ²		
			EF1- α	Tub	Cal
<i>Septoria abei</i>	<i>Hibiscus syriacus</i>	CBS128598	KF253280	KF252805	KF253985
<i>S. aegopodina</i>	<i>Aegopodium podagraria</i>	CBS123740	KF253281	KF252806	KF253986
<i>S. anthrisci</i>	<i>Anthriscus</i> sp.	CBS109019	KF253285	KF252810	KF253090
<i>S. anthurii</i>	<i>Anthurium</i> sp.	CBS148.41	KF253287	KF252812	KF253992
<i>S. apícola</i>	<i>Apium graveolens</i>	CBS116465	KF253289	KF252814	KF253994
<i>S. asthericola</i>	<i>Aster tataricus</i>	CBS128587	KF253293	KF252818	KF253998
<i>S. astragali</i>	<i>Astragalus glycyphyllos</i>	CBS109117	KF253296	KF252821	KF254001
<i>S. atropurpurea</i>	<i>Aster canus</i>	CBS348.58	KF253299	KF252824	KF254004
<i>S. bothriospermi</i>	<i>Bothiospermum tenellum</i>	CBS128592	KF253300	KF252825	KF254005
<i>S. bupleuricola</i>	<i>Bupleurum longiradiatum</i>	CBS128601	KF253302	KF252827	KF254007
<i>S. calendulae</i>	<i>Calendula arvensis</i>	CBS349.58	KF253304	KF252829	KF254009
<i>S. callistephi</i>	<i>Callistephus chinensis</i>	CBS128590	KF253305	KF252830	KF254010
<i>S. campanulae</i>	<i>Campanula takesimana</i>	CBS128589	KF253307	KF252832	KF254012
<i>S. cerastii</i>	<i>Cerastium fontanum</i>	CBS102323	KF253309	KF252834	KF254014
<i>S. cf. rubi</i>	<i>Rubus crataegifolius</i>	CPC12331	KF253317	KF252842	KF254022
<i>S. cf. sonchi</i>	<i>Sonchus asper</i>	CBS128757	KF253500	KF253020	KF254204
<i>S. chamaecistii</i>	<i>Helianthemum hybridum</i>	CBS350.58	KF253318	KF252843	KF254023
<i>S. chelidonii</i>	<i>Chelidonium majus</i>	CBS128607	KF253319	KF252844	KF254024
<i>S. chromolaenae</i>	<i>Chromoalema odorata</i>	CBS113373	KF253321	KF252846	KF254026
<i>S. chrysanthemella</i>	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	CBS128617	KF253322	KF252847	KF254027
<i>S. cirsii</i>	<i>Cirsium setidens</i>	CBS128621	KF253328	KF252853	KF254033
<i>S. citri (S. lobeliae)</i>	<i>Lobelia erinus</i>	CBS113392	KF253460	KF252981	KF254164
<i>S. citri (S. aciculosa)</i>	<i>Fragria</i> sp.	CBS177.77	KF253460	KF252981	KF254167
<i>S. citri (S. ederae)</i>	<i>Hedera Helix</i>	CBS566.88	KF253470	KF252990	KF254174
<i>S. citrícola</i>	<i>Citrus sinensis</i>	CBS356.36	KF253329	KF252854	KF254034
<i>S. clematidis</i>	<i>Clematis vitalba</i>	CBS108983	KF253330	KF252855	KF254035
<i>S. convolvuli</i>	<i>Calystegia soldanella</i>	CBS102325	KF253334	KF252859	KF254039
<i>S. coprosmae</i>	<i>Coprosma robusta</i>	CBS 113391	KF253255	KF252787	KF253971
<i>S. crepidis</i>	<i>Crepis japônica</i>	CPC 12539	KF253339	KF252864	KF254044
<i>S. cruciatae</i>	<i>Galium odorata</i>	CBS 123747	KF253340	KF252865	KF254045

Tabela 3-(Continuação).

Espécie	Hospedeira	n° Acesso GenBank			
		n° isolado ¹	EF1- α	Tub	Cal
<i>S. cucubali</i>	<i>Cucubalus baccifer</i>	CBS 102367	KF253342	KF252867	KF254047
<i>S. dearnessii</i>	<i>Angelica dahurica</i>	CBS 128624	KF253347	KF252871	KF254052
<i>S. digitalis</i>	<i>Digitalis lanata</i>	CBS 328.67	KF253348	KF252872	KF254053
<i>S. dolichospora</i>	<i>Solidago virgaurea</i>	CBS 129152	KF253350	KF252874	KF254055
<i>S. dysentericae</i>	<i>Inula britannica</i>	CBS 128637	KF253351	KF252875	KF254056
<i>S. ekmaniana</i>	<i>Chromolaena odorata</i>	CBS 113385	KF253354	KF252877	KF254059
<i>S. epambrosiae</i>	<i>Ambrosia trifida</i>	CBS 128629	KF253356	KF252882	KF254061
<i>S. epilobii</i>	<i>Epilobium fleischeri</i>	CBS 109084	KF253358	KF252881	KF254063
<i>S. erigerontis</i>	<i>Erigeron annuus</i>	CBS 109094	KF253360	KF252884	KF254065
<i>S. eucalyptorum</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	CBS 118505	KF253365	KF252889	KF254069
<i>S. exótica</i>	<i>Hebe speciosa</i>	CBS 163.78	KF253366	KF252890	KF254070
<i>S. galeopsidis</i>	<i>Galeopsis</i> sp.	CBS123744	KF253367	KF252891	KF254071
<i>S. gentianae</i>	<i>Gentiana scabra</i>	CBS128633	KF253374	KF252898	KF254078
<i>S. gladioli</i>	-	CBS121.20	KF253375	KF252899	KF254079
<i>S. glycines</i>	<i>Glycine max</i>	CBS336.53	KF253377	KF252901	KF254081
<i>S. glycinicola</i>	<i>Glycine max</i>	CBS128618	KF253378	KF252902	KF254082
<i>S. helianthi</i>	<i>Helianthus annuus</i>	CBS123.81	KF253379	KF252903	KF254083
<i>S. helianthicola</i>	<i>Helianthus annuus</i>	CBS122.81	KF253380	KF252904	KF254084
<i>S. hibiscicola</i>	<i>Hibiscus syriacus</i>	CBS128611	KF253381	KF252905	KF254085
<i>S. hippocastani</i>	<i>Aesculus hippocastanum</i>	CBS411.61	KF253383	KF252907	KF254087
<i>S. justiciae</i>	<i>Justicia procumbens</i>	CBS128610	KF253384	KF252908	KF254088
<i>S. lactucae</i>	<i>Lactuca sativa</i>	CBS108943	KF253387	KF252911	KF254091
<i>S. laminicola</i>	<i>Lamim álbum</i>	CBS102328	KF253389	KF252913	KF254093
<i>S. lepidiicola</i>	<i>Lepidium virginicum</i>	CBS128635	KF253398	KF252922	KF254102
<i>S. leptostachya</i>	<i>Phyrma leptostachya</i>	CBS128613	KF253399	KF252923	KF254103
<i>S. limonum</i>	<i>Citrus limonium</i>	CBS419.51	KF253407	KF252931	KF25411
<i>S. linicola</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	CBS316.37	KF253408	KF252932	KF25412
<i>S. lycotoctoni</i>	<i>Aconitum vulparia</i>	CBS109089	KF253409	KF252933	KF25413
<i>S. lycopersici</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	CBS128654	KF253410	KF252934	KF25414

Tabela 3-(Continuação).

Espécie	Hospedeira	n° Acesso GenBank			
		n° isolado ¹	EF1- α	Tub	Cal
<i>S. lycopersici</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	CBS354.49	KF253411	KF252935	KF25415
<i>S. matricariae</i>	<i>Matricaria discoidea</i>	CBS109000	KF253419	KF252942	KF254123
<i>S. mazi</i>	<i>Mazus japonicus</i>	CBS128656	KF253421	KF252944	KF254125
<i>S. melissae</i>	<i>Melissa officinalis</i>	CBS109097	KF253423	KF252946	KF254127
<i>S. menthae</i>	-	CBS404.34	KF253424	KF252947	KF254128
<i>S. napelli</i>	<i>Aconitum napellus</i>	CBS109104	KF253425		
<i>S. obesa</i>	<i>Artemisia lavandulaefolia</i>	CBS128588	KF253428	KF252951	KF254132
<i>S. orchidearum</i>	<i>Cyclamen fatrese</i>	CBS128631	KF253434	KF252957	KF254138
<i>S. oudemansii</i>	<i>Poa pratensis</i>	CBS619.72	KF253439	KF252962	KF254143
<i>S. paridis</i>	<i>Paris quadrifolia</i>	CBS109111	KF253438	KF252959	KF254142
<i>S. passifloricola</i>	<i>Passiflora edulis</i>	CBS102701	KF253442	KF252963	KF254146
<i>S. perillae</i>	<i>Perilla frutescens</i>	CBS128655	KF253444	KF252965	KF254148
<i>S. petroselini</i>	<i>Petroselinum sativum</i>	CBS109521	KF253445	KF252966	KF254149
<i>S. phlogis</i>	<i>Plox</i> sp.	CBS102317	KF253447	KF252968	KF254151
<i>S. polygonorum</i>	<i>Polygonum persicaria</i>	CBS102330	KF253450	KF252971	KF254154
<i>S. posoniensis</i>	<i>Chrysosplenium japonicum</i>	CBS128645	KF253456	KF252977	KF254160
<i>S. protearum</i>	<i>Zantheschia aethiopica</i>	CPC19691	KF253474	KF252994	KF254178
<i>S. pseudonapelli</i>	<i>Aconitum pseudolaeve</i>	CBS128664	KF253475	KF252995	KF254179
<i>S. pútrida</i>	<i>Senecio nemorensis</i>	CBS109087	KF253476	KF252996	KF254180
<i>S. rumicum</i>	<i>Rumex acetosa</i>	CBS503.76	KF253478	KF252998	KF254182
<i>S. saccardoii</i>	<i>Lysimachia vulgaris</i>	CBS128756	KF253479	KF252999	KF254183
<i>S. scabiosicicola</i>	<i>Knautia arvensis</i>	CBS102333	KF253480	KF253000	KF254184
<i>S. senecionis</i>	<i>Senecio fluviatilis</i>	CBS102366	KF253492	KF253012	KF254196
<i>S. siegesbeckiae</i>	<i>Siegesbeckia glabrescens</i>	CBS128659	KF253494	KF253014	KF254198
<i>S. sii</i>	<i>Berula erecta</i>	CBS102369	KF253496	KF253016	KF254200
<i>S. sisyrinchii</i>	<i>Sisyrinchium</i> sp.	CBS112096	KF253499	KF253019	KF254203
<i>S. stachydicola</i>	<i>Stachys riederi</i>	CBS128668	KF253512	KF253033	KF254217
<i>S. stellariae</i>	<i>Stellaria media</i>	CBS102376	KF253521	KF253042	KF254226
<i>S. taraxaci</i>	<i>Taraxacum</i> sp.	CBS567.75	KF253524	KF253045	KF254229
<i>S. tinctoriae</i>	<i>Serratula coronata</i>	CBS129154	KF253525	KF253046	KF254230
<i>S. tormentillae</i>	<i>Potentilla fragarioides</i>	CBS128643	KF253526	KF253047	KF254231
<i>S. urticae</i>	<i>Glechoma hederacea</i>	CBS102316	KF253528	KF253049	KF254233

Tabela 3-(Continuação).

Espécie	Hospedeira	n° Acesso GenBank			
		n° isolado ¹	EF1- α	Tub	Cal
<i>S. verbascicola</i>	<i>Verbascum nigrum</i>	CBS102401	KF253531	KF253052	KF254236
<i>S. verbenae</i>	<i>Verbena officinalis</i>	CBS113438	KF253532	KF253053	KF254237
<i>S. villarsiae</i>	<i>Nymphoides peltata</i>	CBS514.78	KF253534	KF253055	KF254239
<i>S. violae-palustris</i>	<i>Viola selkirkii</i>	CBS128644	KF253537	KF253058	KF254242
<i>Sphaerulina amelanchier</i>	<i>Amelanchier</i> sp.	CBS 135110	KF253538	KF253059	KF254243

739 ¹CBS: CBS Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The
740 Netherlands; CPC: Collection Pedro Crous. ²EF1- α : Fator de alongação 1- α ; Tub: β -tubulina;
741 Cal: Calmodulina.

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754 **Tabela 4-** Patogenicidade de isolados de *Septoria lycopersici* a diferentes espécies de plantas
 755 cultivadas e não cultivadas da família Solanaceae.

Nome Científico	Hospedeira		Isolado			
	Nome Comum	Cultivar ¹	SEP81	SEP211	SEP312	SEP352
<i>Solanum acanthodes</i>	Jurubebão	CNPH 145	P ²	p	p	P
<i>S. americanum</i>	Maria Pretinha		-	-	-	-
<i>S. crinitum</i>	Lobeirinha	CNPH 190	-	-	-	-
<i>S. gilo</i>	Jiló	CNPH 222	p	p	p	P
<i>S. gilo</i>	Jiló	Jiló Verde Claro	p	p	p	P
<i>S. jamaicense</i>		CNPH 33	-	-	-	-
<i>S. lycopersicum</i>	Tomate	Santa Clara	-	-	-	-
<i>S. mammosum</i>	Teta de Vaca	CNPH 36	p	p	p	P
<i>S. melongena</i>	Berinjela	CNPH 172	-	-	-	-
<i>S. melongena</i>	Berinjela	CNPH 778	-	-	-	-
<i>S. melongena</i>	Berinjela	CNPH 788	p	p	p	P
<i>S. melongena</i>	Berinjela	Çiça	-	-	-	-
<i>S. palinacanthum</i>	Joá Bagudo	CNPH174	-	-	-	-
<i>S. paludosum</i>	Jurubeba Roxa	CNPH 205	p	p	p	P
<i>S. scuticum</i>	Jurubeba de Conserva	CNPH 52	-	-	-	-
<i>S. sessiliflorum</i>	Cubiu	CNPH 67	p	p	p	P
<i>S. stramoniiifolium</i>	Jurubeba Doce	CNPH 19	-	-	-	-
<i>S. stramoniiifolium</i>	Jurubeba	CNPH 38	-	-	-	-
<i>S. subinerme</i>		CNPH 125	-	-	-	-
<i>S. torvum</i>		CNPH 610	-	-	-	-
<i>S. tuberosum</i>	Batata	Ágata	-	-	-	-
<i>S. tuberosum</i>	Batata	Atlântico	-	-	-	-
<i>S. viarum</i>	Joá Miúdo	CNPH 44	p	p	p	P
<i>Capsicum annuum</i>	Pimentão	CNPH 148	-	-	-	-
<i>C. annuum</i>	Pimentão	Casca Dura Ikeda (Feltrin)	-	-	-	-
<i>C. annuum</i>	Pimentão	Tico	-	-	-	-

Tabela 4-(Continuação).

Hospedeira Nome Científico	Isolado Nome Comum	Cultivar¹	SEP81	SEP211	SEP312	SEP352
<i>C. baccatum</i>	Pimenta Cambuci	Sakata	-	-	-	-
<i>C. baccatum</i>	Pimenta Cambuc	Top Seed	-	-	-	-
<i>Capsicum chinense</i>	Pimenta Dedo de Moça	BRS Mari	-	-	-	-
<i>C. chinense</i>	Pimenta tipo bode	BRS Seriema	-	-	-	-
<i>C. chinense</i>	Pimenta Biquinho Amarelo	Top Seed	-	-	-	-
<i>C. chinense</i>	Pimenta de Cheiro	Top Seed	-	-	-	-
<i>C. chinense</i>	Pimenta Biquinho	BRS Moema	-	-	-	-
<i>C. chinense</i>	Pimenta Habanero	BRS Juruti	-	-	-	-
<i>C. chinense</i>	Pimenta Habanero	BRS Nandaia	-	-	-	-
<i>Capsicum frutescens</i>	Pimenta Tabasco	Top Seed	-	-	-	-
<i>C. frutescens</i>	Pimenta Malagueta	Sakata	-	-	-	-
<i>C. frutescens</i>	Pimenta Malagueta	Top Seed	-	-	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco		-	-	-	-
<i>N. benthamiana</i>			-	-	-	-
<i>Datura metel</i>			p	p	p	P
<i>D. stramonium</i>	Estramônio		-	-	-	-
<i>Leonotis nepetifolia</i>	Cordão-de- Frade		-	-	-	-

756 ¹ Cultivar, acesso ou nome comercial. ²Plantas que apresentaram sintomas e sinais de *S.*
757 *lycopersici*.

758

759

760

761

762

763 **Tabela 5-** Caracterização morfológica de isolados de *Septoria lycopersici* oriundos do
764 tomateiro.

Isolado ¹	Comprimento (μm) ²	Largura (μm)
81RS	73,42 \pm 8,39a (58,80-87,96)	2,34 \pm 0,54 (1,52-2,57)
211SC	69,71 \pm 8,38a (51,96-82,16)	2,38 \pm 0,06 (2,33-2,45)
311MG	60,24 \pm 7,45bc (41,81-71,63)	2,34 \pm 0,54 (1,51-2,58)
312DF	63,64 \pm 7,29b (51,74-79,20)	2,38 \pm 0,05 (2,33-2,45)
313DF	58,27 \pm 8,30c (46,59-68,93)	2,35 \pm 0,04 (2,33-2,45)
317DF	57,11 \pm 9,14c (42,73-87,26)	2,33 \pm 0 (2,33-2,33)
319PR	60,80 \pm 5,76bc (50,04-75,04)	2,33 \pm 0 (2,33-2,33)
341DF	58,51 \pm 5,07c (50,63-71,25)	2,33 \pm 0 (2,33-2,33)
346ES	69,45 \pm 12,35a (54,14-107,70)	2,33 \pm 0 (2,33-2,33)
352SP	70,19 \pm 7,75a (59,30-84,06)	2,33 \pm 0 (2,33-2,33)

765 ¹Código do isolado e sigla da localidade de origem.²Média de 30 repetições. Médias
766 seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Fisher LSD ($P \leq 0,05$). Na
767 tabela as informações representam (Média \pm Desvio padrão/ mínimo-máximo).
768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780 **Tabela 6-** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para 10 isolados de *S.*
 781 *lycopersici* inoculados em tomateiro cv. Santa Clara, em condições de casa de vegetação.
 782

Isolado ¹	AACPD ²
Sep81 - RS	380,10 ^a
Sep313 - DF	299,60 ^b
Sep312 - DF	247,63 ^c
Sep352 - SP	184,10 ^d
Sep346 - ES	162,75 ^{ed}
Sep311 - MG	145,50 ^e
Sep211 - SC	140,79 ^{ef}
Sep341 - DF	121,26 ^{gf}
Sep319 - PR	103,58 ^{gh}
Sep317 - DF	86,43 ^h

783 ¹Código do isolado e localidade de origem.²Média de 4 repetições. Médias seguidas pela
 784 mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Fisher LSD ($P \leq 0,05$).
 785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808 **Tabela 7-** Índice médio de severidade da doença dentro do conjunto de plantas hospedeiras
 809 inoculadas com o isolado Sep 211 de *S. lycopersici*.

Espécie	Severidade¹
<i>Solanum paludosum</i> (CNPH 205)	40 ^a
<i>S. mammosum</i> (CNPH36)	40 ^a
<i>S. acanthodes</i> (CNPH145)	35 ^a
<i>S. gilo</i> (JILÓ VERDE)	35 ^a
<i>S. gilo</i> (CNPH222)	30ab
<i>S. viarum</i> (CNPH44)	20b
<i>S. melongena</i> (CNPH788)	20b
<i>S. sessiliflorum</i> (CNPH 67)	20b
<i>Datura metel</i>	20b

CV (%) = 28,26

810 ¹Média de 4 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de
 811 Fisher LSD (P≤0,05).
 812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

Tabela 8- Agressividade dos isolados de *Septoria*, em função do índice médio de severidade da doença em cada hospedeira.

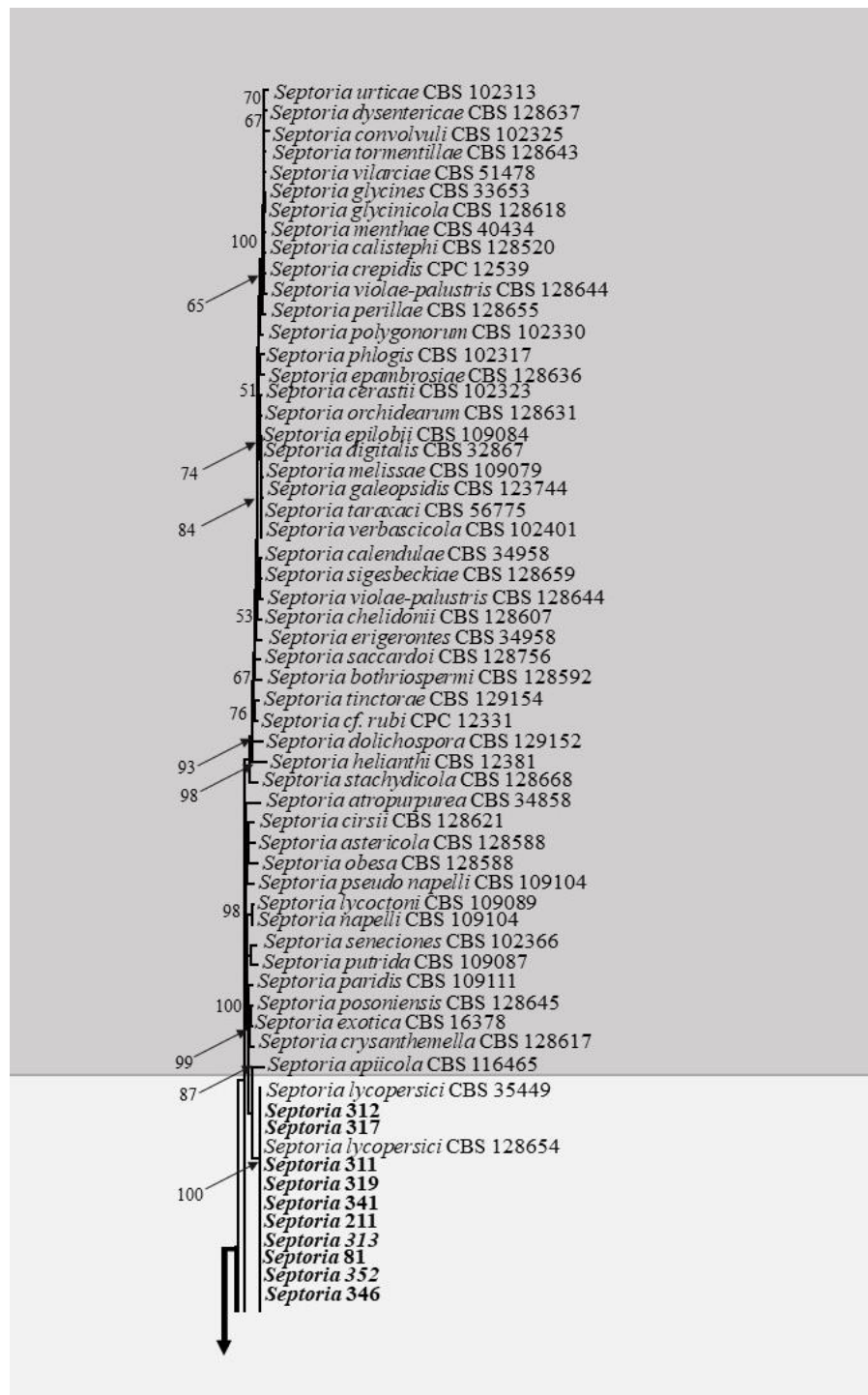
Isolado	<i>S. acanthodes</i> (CNP145)	<i>S. gilo</i> (CNP222)	<i>S. gilo</i> (Verde Claro)
Sep81	20b	80a	60 ^a
Sep211	35a	30b	35b
Sep312	20b	20b	20c
Sep352	40a	20b	40b
CV (%) =	17,39	26,67	12,90

¹Média de 4 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

845

846

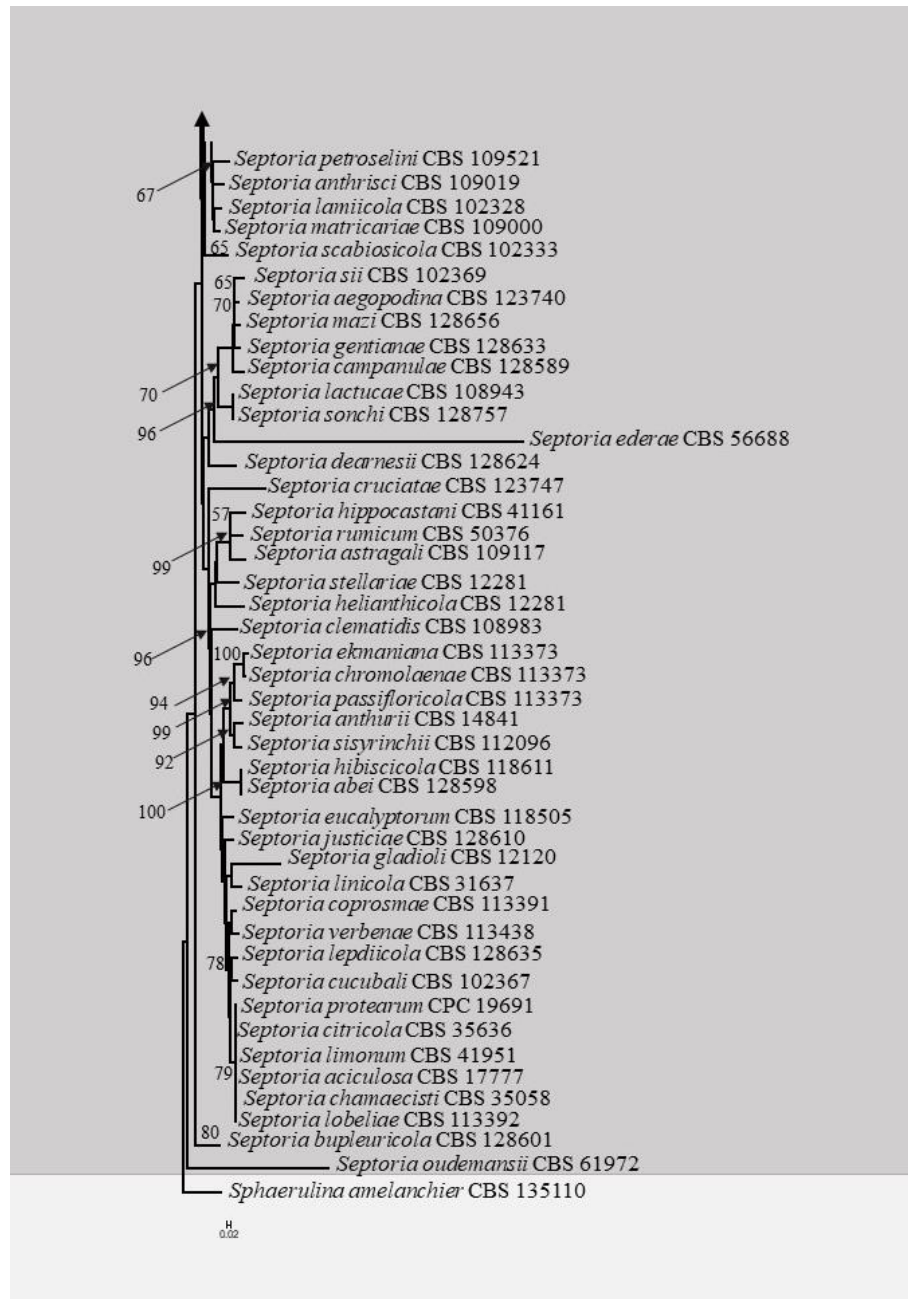
847



848

849 **Figura 1-** Árvore de máxima verossimilhança de 10 isolados de *Septoria* (representando o
 850 conjunto de 104 isolados) de tomateiro, baseada em um conjunto de dados multilocus (Tub,
 851 Cal e EF1- α). *Sphaerulina amelanchier* é usado como grupo externo. Os valores de suporte do
 852 Bootstrap acima de 50% (à esquerda) são mostrados nos nós. A barra de escala indica o
 853 número de substituições por posição de nucleotídeo.

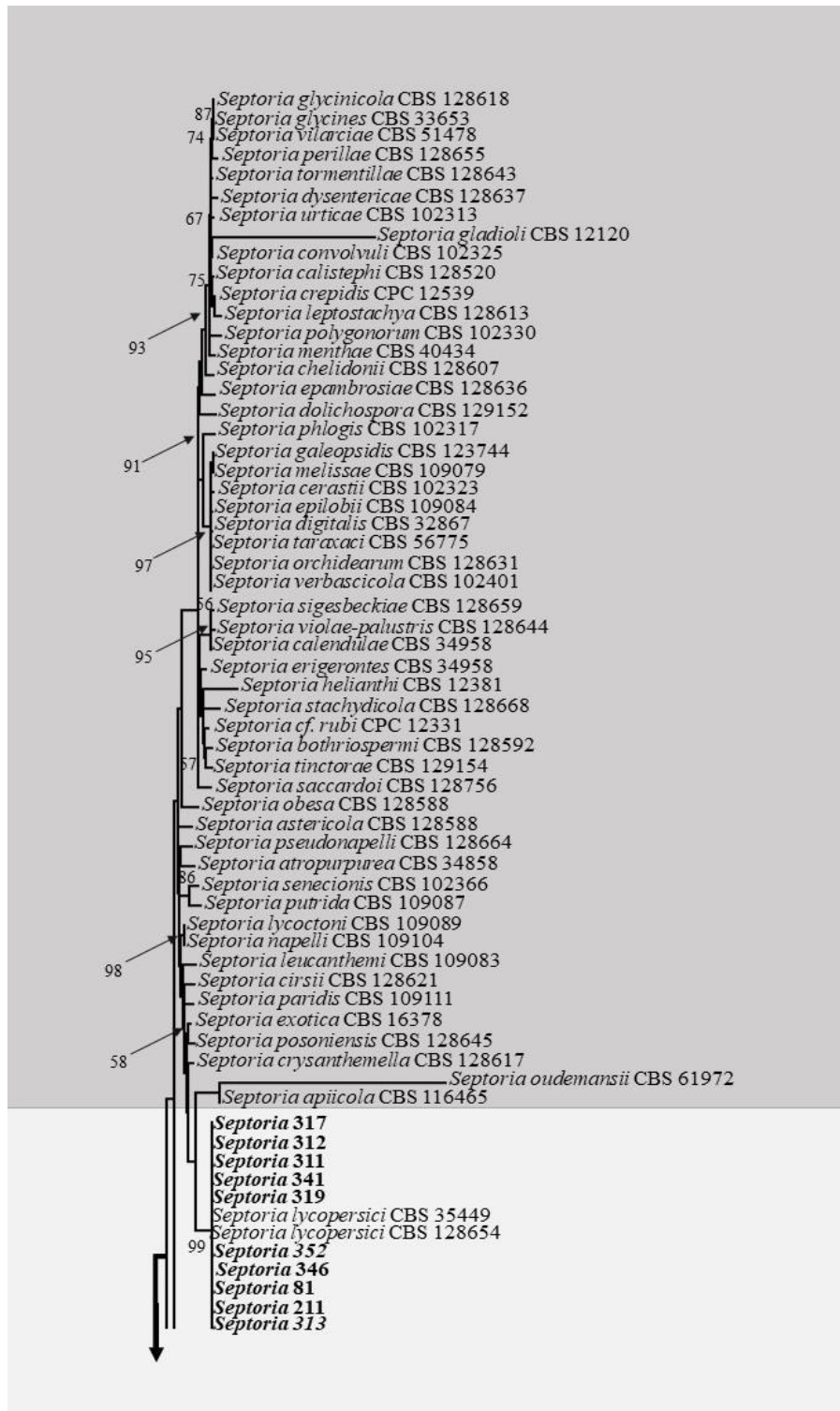
854



855

856 **Figura 1-** Continuação.

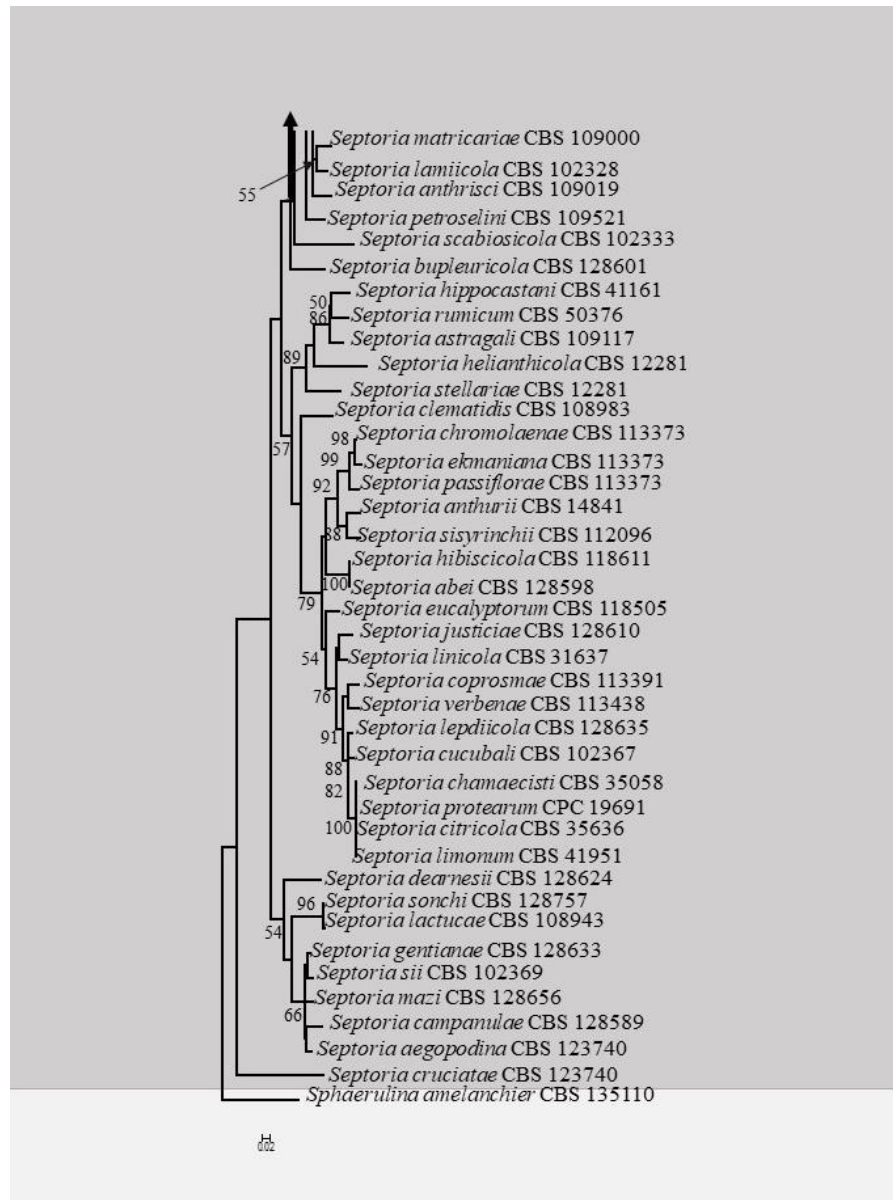
857



858

859 **Figura 2-** Árvore de máxima verossimilhança de 10 isolados de *Septoria* (representando o
860 conjunto de 104 isolados) de tomateiro, baseada na região Tub. *Sphaerulina amelanchier* é
861 usado como grupo externo. Os valores de suporte do Bootstrap acima de 50% (à esquerda)
862 são mostrados nos nós. A barra de escala indica o número de substituições por posição de
863 nucleotídeo.

864



865

866 **Figura 2-** Continuação.

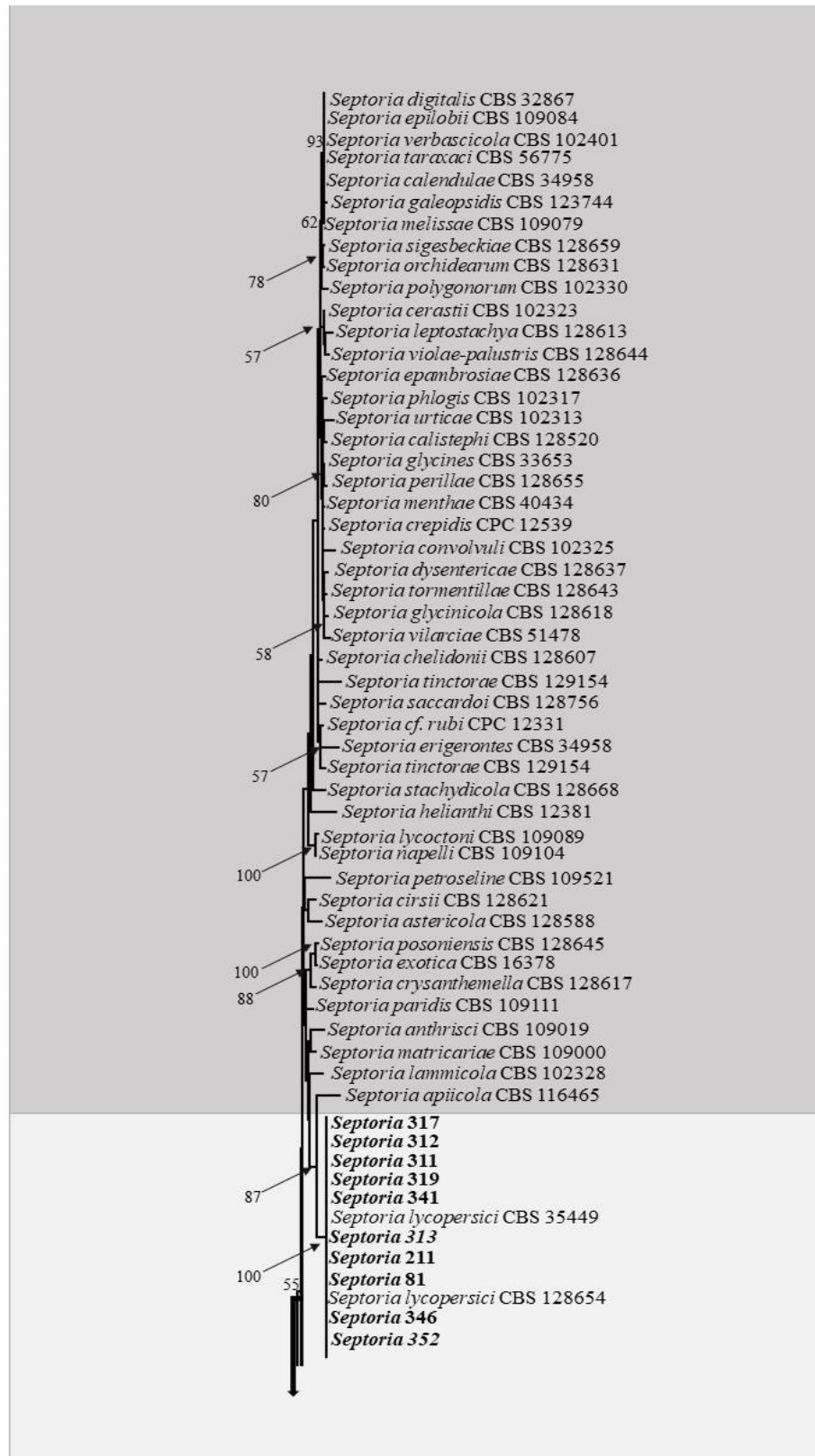
867

868

869

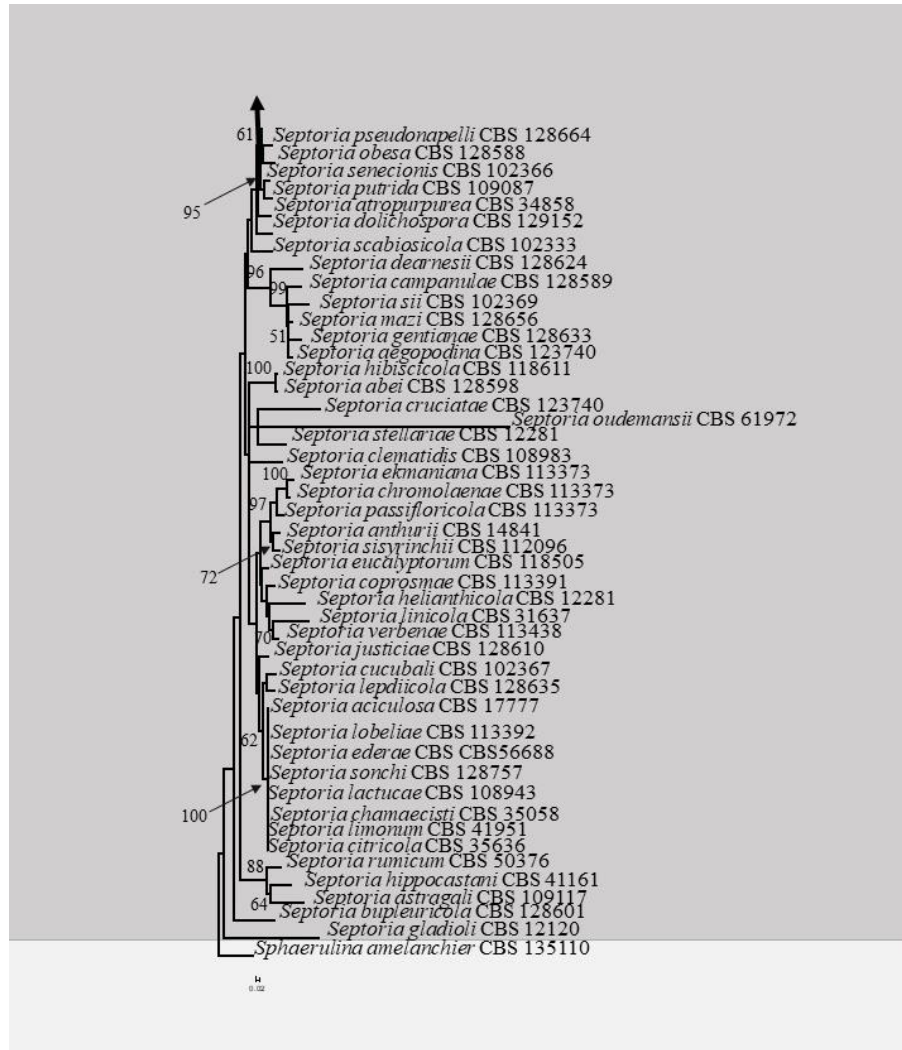
870

871



872
 873 **Figura 3-** Árvore de máxima verossimilhança de 10 isolados de *Septoria* (representando o
 874 conjunto de 104 isolados) de tomateiro, baseada na região EF1- α . *Sphaerulina amelanchier* é
 875 usado como grupo externo. Os valores de suporte do Bootstrap acima de 50% (à esquerda)
 876 são mostrados nos nós. A barra de escala indica o número de substituições por posição de
 877 nucleotídeo.

878



879

880 **Figura 3-** Continuação.

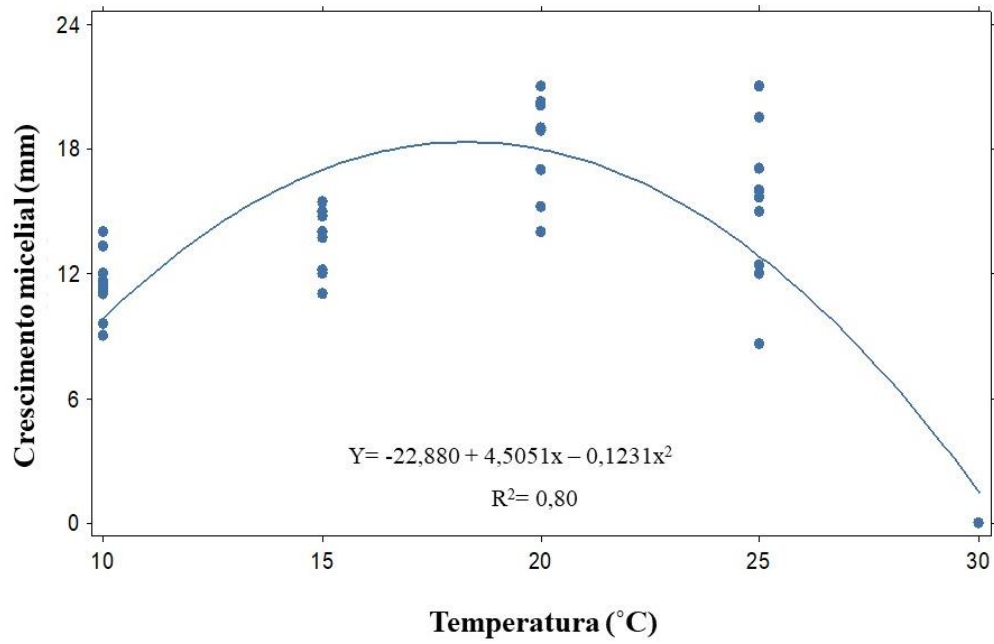
881

882

883

884

885



886

887 **Figura 4-** Influência da temperatura no crescimento micelial de *S. lycopersici* do tomateiro.

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

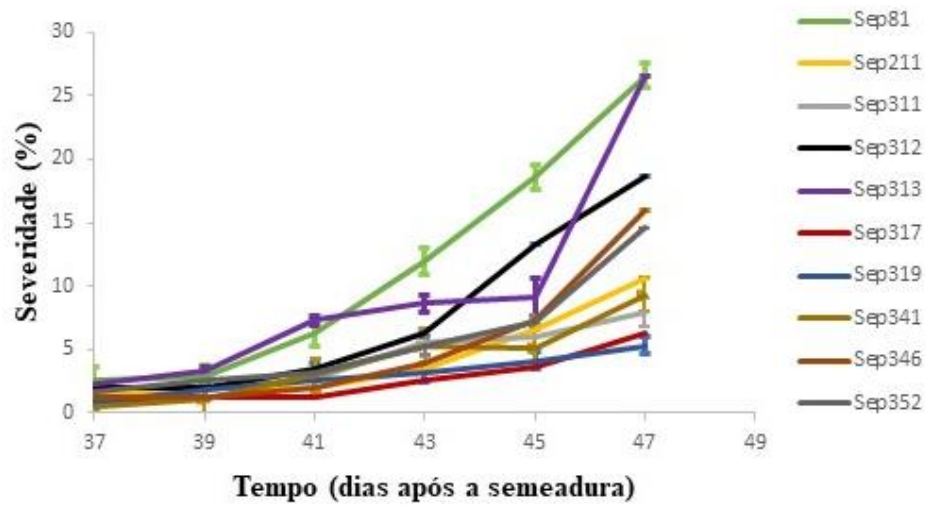
904

905

906

907

908



909

910 **Figura 5-** Curva de progresso da mancha foliar de *Septoria*, em tomateiros da cultivar
 911 Santa Clara, inoculados com 10 isolados de *S. lycopersici*. As barras representam o erro
 912 padrão.

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934



935

936

937

938

939

Prancha 1- Plantas que apresentaram sintomas e sinais de *S. lycopersici* a partir de inoculação. *Solanum mammosum*- CNPH 36 (A), *S. sessiliflorum*- CNPH 67 (B), *Datura metel* (C), *S. melongena*- CNPH 788 (D), *S. gilo*- CNPH 222 (E), *S. gilo*: cultivar Verde Claro (F), *S. acanthodes*- CNPH 145 (G), *S. paludosum*- CNPH 205 (H), *S. viarum*- CNPH 44 (I).

Capítulo III

Sensibilidade de isolados de *Septoria lycopersici* a fungicidas, no Brasil

Sensibilidade de isolados de *Septoria lycopersici* a fungicidas, no Brasil.

C. A. da Costa¹, V. Lourenço Jr.², A. Reis². ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. ²Embrapa Hortaliças, Brasília, Distrito Federal, Brasil. eng.christiane.a.costa@gmail.com; valdir.lourenco@embrapa.br; ailton.reis@embrapa.br.

Resumo

A sensibilidade a fungicidas de isolados de *Septoria lycopersici*, originados de oito regiões geográficas do Brasil, foi testada em ensaios *in vitro*. Foram utilizados os fungicidas azoxistrobina, tebuconazol e tiofanato-metílico nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 mg/L de i.a. e o clorotalonil nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 mg/L de i.a. A concentração efetiva necessária para reduzir o crescimento micelial em 50% (CE50) foi determinada para 95 isolados. A eficácia das formulações comerciais em plantas de tomate foi testada com 5 isolados resistentes e 5 isolados sensíveis, selecionados a partir dos resultados da CE50. A CE50 para azoxistrobina variou de 0,0024 a 252,7 mg/L, para o clorotalonil variou de 0,0008 a 6,85 mg/L, para tebuconazol a CE50 variou de 0,000047 a 215,44 mg/L e tiofanato-metílico a variação foi de 0,00086 a 215,44 mg/L. Dentre os fungicidas utilizados o clorotalonil foi o mais eficaz e o tiofanato-metílico menos eficaz *in vitro*. Entretanto, *in vivo* foram detectados isolados de *S. lycopersici* com baixa sensibilidade a azoxistrobina e possível perda gradativa de sensibilidade para clorotalonil e tebuconazol. Com isso observou-se o risco de um possível declínio no controle da septoriose do tomateiro com estes fungicidas, evidenciando a necessidade de mais investigações. Até o presente momento não se conhecem outros relatos de perda de sensibilidade de *S. lycopersici* a estes fungicidas.

Palavras chave: *Solanum lycopersicum*, septoriose, controle químico.

Abstract

Sensitivity of isolates of *Septoria lycopersici*, from eight geographical regions of Brazil, was tested in two in vitro assays using the fungicides azoxystrobin, tebuconazole and thiophanate-methyl at concentrations 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 mg/L a.i and chlorothalonil at concentrations 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 mg/L a.i. The effective concentration required to reduce mycelial growth by 50% (EC50) was determined for 95 isolates. The efficacy of commercial formulations in tomato plants was tested on 5 resistant isolates and 5 isolates sensitive to each fungicide, selected by the EC50 results. The EC50 for azoxystrobin ranged from 0,0024 to 252,7 mg/L, for chlorothalonil ranged from 0,0008 to 6,85 mg/L, for tebuconazole the EC50 ranged from 0,000047 to 215.44 mg/L and thiophanate-methyl the variation was from 0,00086 to 215,44 mg/L. Among the fungicides used chlorothalonil was the most effective and the thiophanate-methyl less effective *in vitro*. However, *in vivo*, *S. lycopersici* isolates with low sensitivity to azoxystrobin and possible gradual loss of sensitivity to chlorothalonil and tebuconazole were detected. With this, the risk of a possible decline in the control of tomato septoriosis with these fungicides was observed, evidencing the need for further investigations. To date, no reports of loss of *S. lycopersici* sensitivity to these fungicides have been reported.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, septoriosis, chemical control.

61 **Introdução**

62

63 A septoriose ou mancha de Septoria, causada pelo fungo *Septoria lycopersici*, é uma
64 das principais doenças do tomateiro. A doença ocorre em quase todas as regiões produtoras de
65 tomate do Brasil e do mundo, podendo ser bastante destrutiva sob condições de chuvas ou sob
66 irrigação por aspersão (INOUE-NAGATA et al., 2016; LOURENÇO Jr; REIS; COSTA,
67 2016; STEVENSON, 2014).

68 Para o manejo da septoriose são recomendadas algumas medidas de controle cultural
69 tais como, plantio de mudas de boa procedência, destruição de restos culturais logo após a
70 colheita, rotação de culturas e plantio distante de lavouras mais velhas ou infectadas com o
71 patógeno. Quanto ao controle genético, ainda não existem cultivares comerciais de tomate
72 resistentes a esta doença (HANSEN, 2009), embora, fontes de resistência já tenham sido
73 encontradas em ensaios realizados em casa de vegetação e campo (SATELIS; BOITEUX;
74 REIS, 2010). Contudo, a aplicação de fungicidas ainda é a medida de controle mais eficaz
75 adotada pelos produtores de tomate.

76 Atualmente no Brasil existem 79 produtos comerciais registrados para o controle desta
77 doença, entre eles os de ação multi-sítio, como o clorotalonil (cloronitrilas) e os sistêmicos
78 (sítio-específico), como o tiofanato-metílico (metil benzimidazol carbamatos-MBC),
79 tebuconazol (fungicidas inibidores da desmetilação- DMI) e azoxistrobina (fungicidas
80 inibidores da quinona externa- QoI) (AGROFIT, 2019).

81 Os fungicidas MBC produzem um composto químico denominado carbendazim, que
82 possui afinidade com a tubulina, uma proteína que compõe os microtúbulos do fuso mitótico e
83 que é responsável pela formação do citoesqueleto celular durante a fase de metáfase, no
84 processo de mitose. Devido a essa ligação da molécula fungicida com as tubulinas a mitose é
85 inibida, pois os microtúbulos não se unem, o que impede a divisão do núcleo e a consequente
86 multiplicação celular, resultando por sua vez na morte da célula (GHINI; KIMATI, 2002;
87 HEWITT, 1998). Todavia, mutações que ocorrem, em determinados códons, no gene da beta-
88 tubulina levam a alterações nas sequências de aminoácidos e modificação dos sítios de ligação
89 das proteínas. Essas mutações reduzem ou impedem a ligação desses fungicidas à β -tubulina,
90 o que por sua vez vêm conferindo resistência aos MBCs em diversos microrganismos (FRAC,
91 2015; LICHTEMBERG et al., 2016). Geralmente, a linhagem do fungo resistente é tão
92 adaptada quanto a sensível, pois poucos genes são alterados para conferir resistência (GHINI;
93 KIMATI, 2002).

94 Os DMI correspondem aos fungicidas que atuam na biossíntese de esteróis. O
95 mecanismo de ação destes fungicidas deve-se ao acúmulo de esteróis tóxicos, como o 4,4-
96 dimetil e o 4 α -metil, ambos com radical 14 α -metil, interferindo com as funções do ergosterol
97 como componente predominante da membrana celular, esse principal esteroide presente na
98 membrana celular e que tem a função de aumentar as propriedades da bicamada lipídica
99 tornando-a menos fluída (RODRIGUES, 2006; SYKES et al., 2017). Fungicidas DMI se
100 ligam a proteína 14 α -desmetilase, codificada pelo gene CYP51 ou ERG11 (FRAC, 2015),
101 entretanto, várias mutações pontuais no CYP51 foram associadas com a perda gradual da
102 sensibilidade a esses fungicidas, devido a uma redução da afinidade com a referida proteína
103 (LEROUX et al., 2007; COOLS; FRAAIJE, 2013). Algumas vezes vários mecanismos de
104 resistência podem estar envolvidos, como alterações na concentração intercelular dos DMI,
105 como resultado de uma redução na penetração do produto pela membrana ou devido a um
106 ativo sistema de efluxo (GHINI; KIMATI, 2002).

107 Os QoI correspondem aos fungicidas que atuam no sítio de oxidação da ubiquinol. O
108 mecanismo de ação desses fungicidas ocorre através da inibição da respiração mitocondrial,
109 bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c1, no sítio Qo,
110 interferindo na produção de ATP (RODRIGUES, 2006; VENÂNCIO et al., 1999). Contudo,
111 diversos fungos têm perdido a sensibilidade a esse grupo de fungicidas. Mutações em um
112 único ponto no gene do citocromo b (*cyt b*) são os mecanismos mais associados com a
113 resistência às estrobilurinas (LICHTENBERG et al., 2016). Por exemplo, uma mutação
114 pontual no códon 143 no referido gene confere a produção de alanina ao invés do aminoácido
115 glicina (LEADBEATER, 2012; TORRIANI et al., 2009). Isso impede que o fungicida se ligue
116 ao sítio alvo, restaurando a capacidade do fungo realizar a respiração microbiana (FRAAIJE
117 et al., 2005). No entanto, essa mutação não produz efeito negativo na atividade enzimática, o
118 que conseqüentemente não interfere na adaptabilidade dos isolados mutantes
119 (LEADBEATER, 2012).

120 As cloronitrilas ao contrário dos grupos anteriores são fungicidas multi-sítios,
121 portanto, interferem com vários processos do metabolismo fúngico. Esses fungicidas são
122 considerados os principais fungicidas não sistêmico de ação protetora e de amplo espectro,
123 por controlar um grande número de fungos (TOMLIN, 2002), sendo considerado como
124 pertencente a um grupo de baixo risco de desenvolvimento de resistência (FRAC, 2015).

125 Métodos comuns para testar a eficácia de um fungicida *in vitro* como a medição do
126 crescimento micelial da colônia, não têm sido eficientes para espécies de *Septoria* e *Septoria*-
127 like (gêneros morfológicamente próximos ao gênero *Septoria*), isso devido ao demorado e

128 reduzido crescimento micelial. Em virtude disto, diversos grupos de pesquisa têm recorrido a
129 testes em microplaca de cultivo para a avaliação da CE50, por meio da mensuração da
130 densidade óptica de esporos germinados do patógeno em meio líquido misturado com o
131 ingrediente ativo (i.a) do fungicida, e com resultados satisfatórios (BEYER et., al. 2011;
132 SYKES et al., 2018; STEWART; PERRY; EVANS, 2014).

133 Apesar dos vários relatos na literatura sobre a resistência de fungos aos fungicidas, até
134 agora inexitem informações disponíveis sobre a sensibilidade da espécie *S. lycopersici* a
135 fungicidas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade de populações
136 de *S. lycopersici*, coletadas em diferentes regiões produtoras de tomate, para processamento
137 industrial e para mesa, no Brasil, aos quatro grupos de fungicidas citados acima.

138

139 **Material e métodos**

140

141 **Isolados de *Septoria lycopersici***

142

143 Um total de 95 isolados *S. lycopersici* foram obtidos a partir de folhas de tomateiro
144 com sintomas típicos da doença. Os mesmos foram coletados de sete estados brasileiros, mais
145 o Distrito Federal (Tabela 1). Após chegarem ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa
146 Hortaliças, todas as amostras foliares foram acondicionadas em Gerbox, sob condições de
147 câmara úmida para induzir a formação de estruturas do fungo (picnídios). Cirrus (massas de
148 esporos) produzidos sobre os picnídios foram transferidos, com auxílio de um estilete
149 esterilizado, para a extremidade de placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Agar
150 (BDA) com tetraciclina (30mg/Litro). Após isto, com auxílio de uma alça de platina, os
151 esporos foram espalhados na superfície do meio, de modo semelhante ao que se faz com
152 bactérias, visando obter colônias oriundas de um único esporo. Os isolados monospóricos
153 obtidos foram incubados em BDA a 25°C em BOD. Todos os isolados, quando em plena
154 esporulação, foram preservados em tubos de criogenia contendo glicerol a 35% e mantidos na
155 coleção de fungos e oomicetos fitopatogênicos da Embrapa Hortaliças, em ultra freezer à
156 temperatura de -80C°.

157

158 **Ensaio de sensibilidade a fungicidas *in vitro***

159

160 Diante da dificuldade de avaliar a resistência de *Septoria* spp. a fungicidas, via
161 métodos comuns, a resistência a quatros fungicidas utilizados para o manejo da doença no

162 campo foi estimada conforme metodologia de Beyer et al. (2011). Com este método, foi
163 estimada a concentração necessária para reduzir o crescimento de patógenos em 50% (CE50)
164 em meio líquido de cultura Batata Dextrose (BD).

165 Os fungicidas utilizados foram azoxistrobina, clorotalonil, tebuconazol, tiofanato
166 metílico (Sigma-Aldrich. Pureza química > 98%). As concentrações testadas foram (0,001;
167 0,01; 0,1; 1; 10; 100 mg/L de i.a.) para azoxistrobina, tebuconazol e tiofanato metílico e
168 (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 mg/L de i.a.) para clorotalonil, todas obtidas através de
169 diluição seriada em água destilada esterilizada (ADE). Para a azoxistrobina foi adicionado
170 salicylhydroxamic acid (SHAM, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 100mg/L, com
171 o objetivo de prevenir falsos positivos (WOOD; HOLLomon, 2003; ZIOGAS et al., 1997).

172 Para o preparo da suspensão de esporos, os isolados foram cultivados em meio farinha
173 de aveia ágar (FAA). Após o desenvolvimento de colônias com picnídios e cirrus visíveis
174 (cerca de 15 dias) e com o auxílio de alça de platina, esporos foram transferidos para o meio
175 líquido BD, com tetraciclina (30mg/L). A concentração de conídios na suspensão foi
176 determinada, com o auxílio de câmara de Neubauer, e ajustada para a concentração de 2×10^5
177 esporos/ml.

178 Foram utilizadas placas de micro titulação de 96 poços, com fundo plano. Em cada
179 poço foi adicionado 100 µl do fungicida com suas respectivas concentrações, mais 100 µl da
180 suspensão de esporos. Poços contendo apenas fungicida e meio líquido serviram como branco
181 (este colocado sempre na primeira coluna para calibrar a leitura das amostras) e controle
182 negativo. O controle positivo consistiu na mistura da mesma quantidade da suspensão de
183 esporos, utilizados anteriormente, com 100 µl de ADE. Cada tratamento foi repetido 4 vezes
184 dentro da placa. Todas as microplacas foram cobertas com tampas esterilizadas, que já
185 acompanhavam as placas, e incubadas a uma temperatura de 22°C, em agitador a 120 rpm.
186 Após 5 dias, a densidade ótica dos tratamentos foi lida na faixa 405 nm de absorvância,
187 usando Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™, Waltham,
188 Massachusetts, EUA). O experimento foi conduzido duas vezes.

189 A porcentagem de inibição da germinação e crescimento micelial (ICM_F) foi calculada
190 a partir da fórmula $ICM_F = [(T - F) / T] \times 100$, onde T é a germinação e crescimento micelial da
191 testemunha (sem fungicida) e F é a germinação e crescimento micelial com o fungicida. A
192 porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada para todas as concentrações de
193 cada fungicida. A CE50 (mg de i.a. /L) foi calculada para cada isolado, sendo esta considerada
194 a concentração de fungicida na qual a densidade óptica da cultura de esporos representassem a
195 metade da densidade óptica da cultura de esporos sem o fungicida. O cálculo da CE50 foi

196 realizado mediante regressão linear da inibição do crescimento micelial em função do log das
197 concentrações inibitórias de cada fungicida. Os dados foram analisados no programa
198 estatístico SAS 8.1 (SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina, EUA). Distribuição de
199 frequência dos isolados entre valores de CE50 foram estabelecidos, assim os isolados foram
200 agrupados de acordo com o grau de sensibilidade ao fungicida. Os gráficos com os resultados
201 da distribuição de frequência foram construídos no programa SigmaPlot 14.0.

202

203 **Ensaio de sensibilidade a fungicidas em casa de vegetação**

204

205 A eficácia de formulações comerciais de azoxistrobina, clorotalonil, tebuconazole e
206 tiofanato-metílico para controle de isolados de *S. lycopersici* foi testada. Para este teste, cada
207 fungicida foi diluído para a dosagem completa da concentração da dosagem comercial,
208 recomendada para aplicação no campo (Tabela 2). Devido a diferença de agressividade
209 existente entre isolados na população de *S. lycopersici*, foram selecionados 5 isolados
210 resistentes e 5 isolados sensíveis para cada fungicida, obtidos a partir dos resultados da CE50
211 do experimento anterior. Diante disso, a resposta ao fungicida foi avaliada para cada isolado
212 separadamente.

213 Sementes de tomateiro da cultivar Santa Clara foram semeadas em bandejas de isopor
214 com 128 células, preenchidas com substrato estéril Plantmax®. Quinze dias após a
215 semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos (0,5 L) preenchidos com o
216 substrato esterilizado Plantmax®, com solo e adubo Basacote®. Após 35 dias estas foram
217 pulverizadas com cada fungicida em suas respectivas dosagens. Os fungicidas foram
218 previamente aplicados com um pulverizador, até o ponto de escorrimento nas folhas.

219 Os esporos foram obtidos a partir dos isolados cultivados em placas de petri contendo
220 meio FAA. Após 15 dias, foi adicionado 15 ml de ADE em cada placa. Com o auxílio de uma
221 escova de cerdas finas, fez-se a remoção das massas de esporos. A suspensão foi filtrada
222 através de gaze e calibrada para a concentração de 2×10^5 conídios/mL, com o auxílio de
223 Câmara de Neubauer. À suspensão de esporos foi adicionado Tween 20 ($0,1 \text{ mL/L}^{-1}$), para
224 promover a adesão dos esporos às folhas inoculadas. Após o intervalo de 24 horas da
225 aplicação dos fungicidas, as suspensões de esporos foram então pulverizadas nas folhas das
226 plantas. Um conjunto de plantas com 30 dias após a semeadura (DAS) foram pulverizadas
227 apenas com a suspensão de esporos serviram como controle positivo, enquanto folhas
228 pulverizadas apenas com água serviram, por sua vez, como controle negativo. O delineamento

229 experimental foi em blocos casualizados, com 4 repetições. Cada unidade experimental foi
230 constituída por 1 vaso contendo 1 planta. O experimento foi repetido uma vez.

231 Após a inoculação, as plantas foram mantidas sob condições de câmara úmida com
232 temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas. Após 7 dias foi realizada a avaliação da
233 severidade da septoriose nas folhas. Os sintomas foram avaliados nos 3 terços da planta, em 1
234 folíolo terminal de 1 folha para cada terço, totalizando 3 folíolos por planta, com auxílio da
235 escala diagramática adaptada de Boff; Zambolim; Vale (1991). Foi avaliado o período de
236 incubação, e a quantificação da severidade foi realizada em dias alternados, ou seja, com
237 intervalo de um dia a partir da primeira avaliação, totalizando 6 avaliações. Com os dados
238 obtidos foi calculado o valor da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Os
239 valores de AACPD foram submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas
240 pelo teste de diferença mínima significativa (LSD) de Fisher ao nível de significância de 5%
241 usando o programa estatístico SAS 8.1 (SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina, EUA).

242

243 **Resultados**

244

245 **Ensaio de sensibilidade a fungicidas *in vitro***

246

247 Os valores de CE50 para isolados de *S. lycopersici* a azoxistrobina variaram de 0,0024
248 a 252,7 mg/Litro, com a maior parte, cerca de 33,68% da população, frequente no intervalo de
249 CE50 de 0,011-0,01 mg/Litro. Os valores de CE50 para clorotalonil variaram de 0,0008 a
250 6,85 mg/Litro, com 57,44% da população no intervalo 0,11-1 mg/Litro de CE50. Para
251 tebuconazol a CE50 variou de 0,000047 a 215,44 mg/Litro, com 30,52% da população
252 frequente no intervalo de 0,11-1 mg/Litro. Já para tiofanato-metílico a variação foi de 0,00086
253 a 215,44 mg/Litro e 55,38% da população frequente no intervalo de 1,1-10 mg/Litro de CE50
254 (Figura-1). Alguns isolados, embora numa frequência muito baixa, mostraram-se bastante
255 sensíveis aos princípios ativos, ou seja, doses mínimas foram necessárias para proporcionar
256 inibição do crescimento micelial, mesmo em pequenas concentrações do fungicida, o que
257 implicou em baixos valores da CE50 para estes isolados.

258 Todos os fungicidas foram capazes de inibir completamente o crescimento micelial de
259 alguns isolados de *S. lycopersici* durante o período de avaliação do experimento *in vitro*. Para
260 azoxistrobina a inibição total ocorreu a partir da concentração 0,01 mg/L de i.a. até a máxima
261 concentração de 100 mg/L de i.a. O clorotalonil apresentou inibição total do crescimento
262 micelial também a partir da concentração de 0,01 mg/L até a máxima de 1000 mg/L de i.a.

263 Enquanto o tebuconazol possibilitou inibição total, de alguns isolados, em todas as
264 concentrações utilizadas neste estudo. O tiofanato-metílico foi o ingrediente ativo que
265 apresentou menor faixa de inibição total de germinação e crescimento micelial, a partir apenas
266 da concentração de 1 mg/L a 100 mg/L de i.a (Dados não demonstrados).

267

268 **Ensaio de sensibilidade a fungicidas em casa de vegetação**

269

270 Todos os isolados selecionados de *Septoria* foram patogênicos nas plantas testemunha
271 (controle positivo) de tomateiro da cultivar Santa Clara, resultando em sintomas 7 dias após a
272 inoculação (plantas com 37 DAS). Os sintomas foliares foram semelhantes para todos os
273 isolados, com o desenvolvimento de manchas circulares de bordas escurecidas, centro cor de
274 palha e posterior produção de picnídios, sintomas típicos da doença. Nenhum sintoma foi
275 observado nas plantas testemunha (controle negativo).

276 Para a azoxistrobina o período de incubação foi igual ao controle positivo, resultando
277 em sintomas após 7 dias da inoculação, tanto para isolados resistentes como para os sensíveis.
278 Plantas pulverizadas com clorotalonil e inoculadas com isolados resistentes *in vitro* também
279 apresentaram sintomas após 7 dias, enquanto na pulverização contra os isolados sensíveis os
280 sintomas foram visíveis após 9 dias. Na pulverização com o tebuconazol e inoculação com os
281 isolados resistentes *in vitro* o período de incubação foi de 9 dias, enquanto para os isolados
282 sensíveis houve um período de incubação variável, do décimo primeiro ao décimo terceiro dia
283 após a inoculação. Para o tiofanato-metílico o período de incubação da doença foi de 9 dias
284 para ambas as classes de isolados.

285 Plantas pulverizadas com a azoxistrobina e inoculadas com o grupo de isolados
286 sensíveis *in vitro*, não apresentaram diferença de severidade quando comparadas com plantas
287 não tratadas, com exceção do isolado Sep 26S, que apresentou menor severidade. Não houve
288 diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre o grupo de isolados resistentes e suas respectivas
289 testemunhas (Figura 2).

290 Quando pulverizadas com clorotalonil e inoculadas com os isolados sensíveis Sep
291 119S, Sep 172S e Sep 211S a severidade da doença diminuiu significativamente em
292 comparação com as plantas não tratadas. Entretanto, não houve diferença na severidade entre
293 as plantas (tratadas e não tratadas) para os isolados Sep 26S e Sep 41S. A partir da inoculação
294 com os isolados resistentes *in vitro*, observou-se que de um modo geral não houve diferença
295 estatística da severidade entre plantas tratadas e não tratadas (Figura 2).

296 Quando as plantas de tomate foram tratadas com tebuconazol e inoculadas com os
297 isolados sensíveis a este fungicida houve significativa redução na severidade da doença. Três
298 isolados, Sep 64S, Sep 211S e Sep 315S entre os 5 utilizados foram eficientemente
299 controlados pelo fungicida, enquanto, não houve diferença estatística ($P \leq 0,05$), entre plantas
300 tratadas e não tratadas, quando inoculadas com os isolados Sep 41S e Sep 319S. Para o grupo
301 de isolados resistentes *in vitro*, apenas Sep 47R foi eficientemente controlado, não havendo
302 diferença estatística ($P \leq 0,05$) da severidade entre plantas tratadas e não tratadas quando
303 inoculadas com os demais isolados (Figura 2).

304 Plantas tratadas com o tiofanato-metílico e inoculadas com os isolados sensíveis *in*
305 *vitro* apresentaram significativa redução na severidade da doença quando comparadas com as
306 plantas sem o fungicida, ou seja, 4 isolados (Sep 64S, Sep 70S, Sep 313S e 319S) entre os 5
307 testados foram eficientemente inibidos pelo fungicida, enquanto, não houve diferença
308 estatística ($P \leq 0,05$) entre plantas tratadas e não tratadas para o isolado Sep 256S. Em plantas
309 tratadas com o tiofanato-metílico e inoculadas com o isolado resistente *in vitro*, Sep 67R,
310 houve maior severidade da doença quando comparadas as plantas não tratadas, entretanto,
311 quando inoculadas com os isolados sensíveis Sep 119R, Sep 206R e Sep 312R a severidade
312 da doença foi menor nas plantas tratadas (Figura 2).

313 De um modo geral as formulações comerciais de azoxistrobina, clorotalonil,
314 tebuconazol e tiofanato-metílico, nas dosagens comerciais recomendadas para controle da
315 septoriose do tomateiro, não inibiram o desenvolvimento da doença, entretanto, a severidade
316 variou de acordo com o isolado do patógeno.

317

318 **Discussão**

319

320 O monitoramento da sensibilidade a fungicidas tornou-se indispensável para o manejo
321 de doenças fúngicas em plantas, pois possibilita determinar a presença de populações de
322 fungos resistentes e por consequência verificar a eficácia dos programas de tratamentos com
323 estes, o que permite por sua vez garantir a compreensão da distribuição, evolução e o impacto
324 da resistência a fungicidas em campo. Portanto, este estudo fornece as primeiras informações
325 sobre a sensibilidade de isolados de *S. lycopersici* originados das principais regiões produtoras
326 do Brasil, a alguns dos principais fungicidas utilizados para seu controle (KIMATI, 1987;
327 SIAH et al., 2014).

328 Dentre os fungicidas utilizados o clorotalonil foi o mais eficaz e o tiofanato-metílico
329 menos eficaz na inibição do fungo *in vitro*. Contudo, para o clorotalonil apesar dos baixos

330 valores de CE50 obtidos para maior parte da população estudada, alguns isolados
331 apresentaram significativa perda de sensibilidade *in vitro*. Os isolados resistentes
332 apresentaram maior severidade que os isolados sensíveis em plantas tratadas, além da
333 capacidade de causar a mesma quantidade de doença em plantas tratadas e não tratadas com o
334 fungicida. Isto sugere uma potencial capacidade das populações de *S. lycopersici* em se
335 adaptarem a fungicidas inibidores de múltiplos-sítios, ainda que estes fungicidas sejam
336 considerados como de baixo risco de resistência (FRAC, 2015). Este fato já foi sugerido ao
337 ser estudada a sensibilidade de populações de *Zimoseptoria tritici* (anteriormente *Septoria*
338 *tritici*) ao longo de diversos períodos de cultivo do trigo. Com base nos resultados obtidos
339 constatou-se que populações da referida espécie teriam um potencial em se adaptar a
340 inibidores de múltiplos-sítios (clorotalonil e folpet) ao longo do tempo de uso (BEYER et al.,
341 2011).

342 Para azoxistrobina a sensibilidade de *S. lycopersici* variou conforme a classe de CE50
343 e demonstrou a presença de considerável quantidade de isolados com pouca sensibilidade *in*
344 *vitro*. Quando foram comparados os resultados de AACPD mais o período de incubação de
345 todos os fungicidas, verificamos que a azoxistrobina apresentou maior AACPD e menor
346 período de incubação, portanto, dentre os fungicidas testados foi o menos eficiente em
347 controlar a doença. Relatos de resistência a azoxistrobina têm sido feitos para outras espécies
348 de Septoria-like. Ao ser avaliada uma grande amostra de isolados, de *Z. tritici* do trigo,
349 provenientes do Marrocos e coletados em 2008 e 2010, foi constatada a presença de 9
350 isolados resistentes de um total de 96 isolados amostrados no ano de 2010, o que na época
351 sugeria um recente surgimento de resistência (SIAH et al., 2014). Em 2014, isolados de *Z.*
352 *tritici* obtidos de várias regiões da Nova Zelândia também foram confirmados como
353 resistentes (STEWART; PERRY; EVANS, 2014). Outras espécies como, *Erysiphe necator*
354 agente etiológico do oídio da uva foram relatadas como resistentes a fluoxastrobina, um
355 fungicida também pertencente aos QoI. Assim como foi constatada a ocorrência generalizada
356 de resistência a QoI em populações de *Venturia inaequalis* de pomares comerciais de maçãs
357 em Michigan, além de isolados de *Alternaria alternata* coletados de citrus na Flórida e
358 resistentes a azoxistrobina e piraclostrobina (LESNIAK et al.2011; MILES et al. 2012;
359 VEGA; DEWDNEY, 2014).

360 Dentre os fungicidas sistêmicos utilizados, os isolados demonstraram maior
361 sensibilidade ao tebuconazol, com menores valores de CE50 *in vitro* e menor severidade nas
362 plantas nos testes em casa de vegetação. Entretanto, devido a presença de alguns isolados com
363 altos valores de CE50, somadas a ausência de diferença da severidade entre plantas tratadas e

364 não tratadas ao serem inoculadas com os isolados resistentes *in vitro*, a população de *S.*
365 *lycopersici* parece estar à eminência de uma possível perda de sensibilidade ao tebuconazol.
366 Segundo a literatura, para fungicidas do grupo dos triazóis a resistência é poligênica, portanto,
367 vários mecanismos de resistência podem estar envolvidos. A mudança é lenta e gradual e
368 embora esse grupo seja considerado de baixo risco, a resistência pode ocorrer após um
369 período de intensa pressão de seleção do fungicida. O acúmulo gradual de mecanismos resulta
370 num declínio da sensibilidade e pode resultar em problemas no controle das doenças fúngicas
371 (GHINI; KIMATI, 2002; GREEN et al., 1990; HOLLOMON, 1993). Perda de sensibilidade,
372 ao longo do tempo, para o tebuconazol também foi constada *in vitro* para isolados de *Z. tritici*
373 do nordeste da Alemanha (BEYER et al., 2011). Resistência ao tebuconazol foi relatada em
374 uma população de *Monilinia fructicola* do pessegueiro no Brasil, com a presença de 15,8% de
375 isolados resistentes (MAY-De MIO, LUO; MICHAILIDES, 2011). E mais recentemente a
376 resistência de isolados de *Colletotrichum truncatum* provenientes da China e Estados Unidos
377 (CHEN et al., 2018).

378 Entre os fungicidas testados *in vitro* o tiofanato-metílico foi o que apresentou menor
379 eficácia contra os isolados de *S. lycopersici*. Entretanto, para a nossa surpresa esses resultados
380 não se refletiram nos testes em plantas mantidas em casa de vegetação. Neste caso obtivemos
381 apenas 1 isolado resistente em condições *in vivo*. Contudo a constatação da resistência em
382 testes de laboratório não implica que necessariamente ocorrerá falhas no controle da doença
383 em condições de campo, pois vários são os fatores que influenciam a velocidade de
384 desenvolvimento da resistência, entre eles a base genética da resistência, a adaptabilidade da
385 linhagem resistente na presença ou ausência do fungicida, a natureza do patógeno e da
386 doença, a pressão de seleção exercida pelo fungicida, além de outros fatores (DEKKER,
387 1995). Entretanto, exemplos de resistência já foram encontradas para outros patossistemas,
388 como em amostras de morango, com mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), de diversas áreas de
389 produção comercial tratadas durante 3 anos com tiofanato-metílico, verificaram que dos 124
390 isolados obtidos, 81,4 % eram resistentes e todos os isolados resistentes possuíam a mutação
391 E198A conhecida por conferir altos níveis de resistência a fungicidas MBC (FERNÁNDEZ-
392 ORTUÑO; SCHNABEL, 2012). Outras gêneros como *A. alternata* do pessegueiro, *V.*
393 *inaequalis* causadora da sarna da macieira também foram relatadas como resistentes a este
394 fungicida (CHAPMAN et al., 2011; FAN et al., 2015).

395 A ocorrência da mancha de Septoria no tomateiro têm aumentado muito em
396 importância nos últimos anos. De doença considerada secundária, comparada a outras no
397 tomateiro, hoje figura como de grande relevância nos campos de produção, situação que pode

398 ser atribuída em parte às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença e ao
399 hospedeiro suscetível, somadas ao reflexo de uma possível perda ou diminuição de
400 sensibilidade de *S. lycopersici* aos fungicidas utilizados para seu controle. Os resultados deste
401 estudo demonstram uma perda de sensibilidade a azoxistrobina e a gradativa perda de
402 sensibilidade a clorotalonil e tebuconazol na população brasileira de *S. lycopersici*. Vale
403 ressaltar que, além do controle da septoriose, estes fungicidas citados também são utilizados
404 para o controle de outras doenças do tomateiro, como a pinta preta (*Alternaria linariae*)
405 (AGROFIT, 2019). Entretanto, os resultados deste trabalho, reforçam a necessidade de que os
406 estudos de caracterização da sensibilidade de uma população fúngica devam ser realizados
407 tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Adicionalmente, a caracterização molecular dos genes alvos
408 associados à resistência devem ser estudados, pois uma reduzida sensibilidade e valores
409 maiores de CE50 muitas vezes não estão associadas a quaisquer mutações previamente
410 descritas para um grupo de fungicidas (PEREIRA et al., 2017).

411 Embora os resultados deste trabalho não sejam totalmente conclusivos, pode-se
412 reconhecer a importância da rotação de fungicidas de sítio específico com multi-sítios, a
413 necessidade da aplicação dos fungicidas na dosagem e período correto, somados a métodos
414 culturais que possibilitem a diminuição da pressão do inóculo, pois tais procedimentos podem
415 ajudar a conservar a eficácia destes fungicidas e conseqüentemente retardar uma possível
416 generalização da perda da sensibilidade na população de *S. lycopersici*.

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 429 AGROFIT - **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em:
430 <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 jan.
431 2019.
- 432 BARKSDALE, T. H. Control of an epidemic of Septoria leaf spot of tomato by resistance.
433 **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, n. 1, p. 239-240, 1982.
- 434 BEYER, M.; KIESNER, F.; VERREET, J.-A.; KLINK, H. Fungicide sensitivity of *Septoria*
435 *tritici* field isolates is affected by an interaction between fungicidal mode of action and time.
436 **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 93, n.1 (Supplement), p. s7-s13, 2011.
- 437
- 438 BOFF P; ZAMBOLIM L; RIBEIRO DO VALE FX. Escalas para avaliação de severidade da
439 mancha de estenfílio (*Stemphylium solani*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro.
440 **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 280-283, 1991.
- 441
- 442 CHAPMAN, K. S.; SUNDIN, G. W.; BECKERMAN, J. L. Identification of resistance to
443 multiple fungicides in field populations of *Venturia inaequalis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.
444 95, p. 921-926, 2011.
- 445
- 446 CHEN, S.; WANG, Y.; SCHNABEL, G.; PENG, C. N.; LAGISHETTY, S.; SMITH, K.;
447 LUO, C.; YUAN, H. Inherent Resistance to 14 α -Demethylation Inhibitor Fungicides in
448 *Colletotrichum truncatum* Is Likely Linked to CYP51A and/or CYP51B Gene Variants.
449 **Phytopathology**, Saint Paul, v. 108, n. 11, p. 1263-1275, 2018.
- 450
- 451 COOLS, H. J.; FRAAIJE, B. A. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella*
452 *graminicola* and implications for future control. **Pest Management Science**, Londres, v. 69,
453 p. 150-155, 2013.
- 454 DEKKER, I. **Development of resistance to modern fungicides and strategies for its**
455 **avoidance**. In: LYR, H. (Ed.). Modern selective fungicides: properties, applications.
456 mechanisms of action. 2. ed. New York: Guslav Fisher. 1995, p. 23-38.
- 457 FAN, Z.; YANG, J.-H.; FAN, F.; LUO, C.X.; SCHNABEL, G. Fitness and competitive
458 ability of *Alternaria alternata* field isolates with resistance to SDHI, QoI, and MBC
459 fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, p. 1744-1750, 2015.

- 460 FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D; SCHNABEL, G. First Report of Thiophanate-Methyl
461 Resistance in *Botrytis cinerea* on Strawberry from South Carolina. **Plant Disease**, Saint Paul,
462 v. 97, n. 11, p. 1700-1700, 2012.
- 463
- 464 FORCELINI, C. A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. **Revisão Anual de Patologia**
465 **de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p.335-355, 1994.
- 466 FRAAIJE BA, BURNETT FJ, CLARK WS, MOTTERAM J, LUCAS JA. **Resistance**
467 **development to QoI inhibitors in populations of *Mycosphaerella graminicola* in the UK.**
468 **In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds.** Alton: BCPC, 2005. p 63-72.
- 469 FRAC. Fungicide resistance action committee. FRAC Code List 2015: fungicides sorted by
470 mode of action. 2015. Disponível em: <Disponível em: [http://www.frac.info/docs/default-](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf?sfvrsn=4)
471 [source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf?sfvrsn=4](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf?sfvrsn=4) >.
472 Acesso em: 20 out. 2018.
- 473 GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas.** Jaguariúna: Embrapa Meio
474 Ambiente, 2002. 78 p.
- 475
- 476 GREEN, M. B.; LE BARON, H. M.; MOBERG, W. K. **Managing resistance to**
477 **agrochemicals from fundamental research to practical strategies.**v. 421. Washington:
478 American Chemical Society, 1990. 483p.
- 479
- 480 HANSEN, M. A. Septoria leaf spot of tomato. Orono: Virginia Cooperative Extension Plant
481 Disease, 2009. Disponível em: < <http://anr.ext.wvu.edu/r/download/57038>>. Acesso em 30
482 set. 2018.
- 483
- 484 HEWITT, H. G. **Fungicides in crop protection.** Oxon, UK: CAB International, 1998. 221 p.
485
- 486 HOLLOMON, D. W. Resistance to azole fungicides in the field. **Biochemical Society**
487 **Transactions**, Londres, v. 4, p. 1047-1051, 1993.
- 488
- 489 KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento.
490 **Agrotécnica**, São Paulo, n.1, p.5-7. 1987.
- 491

- 492 LEADBEATER, A. **Resistance risk to QoI fungicides and anti-resistance strategies**. In:
493 THIND, T. S (Ed.) **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**.
494 Oxfordshire: CAB International, 2012, p. 141-154.
- 495
- 496 LEROUX, P.; ALBERTINI, C.; GAUTIER, A.; GRETT, M.; WALKER, A. S. Mutations in
497 the *cyp51* gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in
498 field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Management Science**, Londres, v. 63, p.
499 688–699, 2007.
- 500
- 501 LESNIAK, K. E.; PROFFER, T. J.; BECKERMAN, J. L.; SUNDIN, G. W. Occurrence of
502 QoI resistance and detection of the G143A mutation in Michigan populations of *Venturia*
503 *inaequalis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, p. 927-934, 2011.
- 504
- 505 LICHTENBERG, P.; PRIMIANO, I.; FISCHER, J. M.; GLIENKE, C.; AMORIM, L.; MAY-
506 DE MIO, L. L. Resistência de *Monilinia* spp. aos fungicidas dos grupos dos inibidores da
507 desmetilação (IDM), dos inibidores da quinona externa (IQE) e dos metilo benzimidazol
508 carbamatos (MBC). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, p.145-173, 2016.
- 509
- 510 LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005.
511 152p.
- 512 LOPES, C. A.; REIS, A.; BOITEUX, L. S. **Doenças fúngicas**. In: LOPES, C.A.; ÁVILA,
513 A.C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. v. 1, p. 17-51.
- 514 LOURENÇO Jr, V.; REIS, A.; COSTA, C. A. Frutos vulneráveis. **Hortaliças e Frutas:**
515 **Cultivar**, Pelotas, n 98, p. 28-29, 2016.
- 516 MAY-De MIO, L. L.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity of *Monilinia fruticola*
517 from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate- methyl and implications for
518 disease management. **Plant Disease**., Saint Paul, v. 95, p. 821-827, 2011.
- 519 MILES, L. A.; MILES, T. D.; KIRK, W. W.; SCHILDER, A. M. C. Strobilurin (QoI)
520 resistance in populations of *Erysiphe necator* on grapes in Michigan. **Plant Disease**, Saint
521 Paul, v. 96, p. 1621-1628, 2012.
- 522 PEREIRA, W. V.; PRIMIANO, I. V.; MORALES, R. G. F.; PERES, N. A.; AMORIM, L.;
523 MAY DE MIO, L. L. Reduced sensitivity to azoxystrobin of *Monilina fruticola* isolates from

- 524 Brazilian stone fruits is not associated with previously described mutation in the cytochrome b
525 gene. **Plant Disease**, Saint Paul, v.101, p. 766-773, 2017.
- 526
- 527 RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de**
528 **ação proposto pelo frac.** 2006. 249 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
529 Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.
- 530 SATELIS, J. F; BOITEUX, L. S.; REIS, A. Resistência a *Septoria lycopersici* em espécies de
531 *Solanum* (Secção *Lycopersicon*) e em progênies de *S. lycopersicum* x *S. peruvianum*. **Scientia**
532 **Agrícola**, Piracicaba, v.67, n.3, p. 334-341, 2010.
- 533 SIAH, A.; ELBEKALI, A. Y.; RAMDANI, A.; REIGNAULT, P.; TORRIANI, S. F. F.;
534 BRUNNER, P. C.; HALAMA, P. QoI Resistance and Mitochondrial Genetic Structure of
535 *Zymoseptoria tritici* in Morocco, **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 8, 2014.
- 536 SYKES, E.M.; SACKETT, K. E.; SEVERNS, P. M.; MUNDT, C. C. Sensitivity variation and
537 cross-resistance of *Zymoseptoria tritici* to azole fungicides in North America. **European**
538 **Journal of Plant Pathology**, Londres, v. 151, p. 269–274, 2018.
- 539 STEVENSON, W. R. **Septoria leaf spot**. In: JONES, J. B.; ZITTER, T. A.; MOMOL, T. M.;
540 MILLER, S. A. (Eds.). **Compendium of Tomato Diseases and Pests**. Saint Paul: The
541 American Phytopathological Society, 2014. 2 ed, p.42-43.
- 542 TOMLIN, C. D. S. **The pesticide manual: a world compendium**. Surrey, Uk: British Crop
543 Protection Council, 12 ed., 2002. 1344 p.
- 544
- 545 TORRIANI, S. F. F.; BRUNNER, P. C.; MCDONALD, B. A.; SIEROTZKI, H. QoI
546 resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella*
547 *graminicola*. **Pest Management Science**, Londres, v. 65, P. 155–162, 2009.
- 548
- 549 VEGA, B.; DEWDNEY, M. M. Distribution of QoI resistance in populations of tangerine-
550 infecting *Alternaria alternata* in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, p. 67-76, 2014.
- 551
- 552 VENANCIO, W. S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E. L.; SOUZA, N. L. Novos fungicidas. I –
553 Produtos naturais e derivados sintéticos: estrobilurinas e fenilpirroles. In: LUZ, W. C.;
554 FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão anual de patologia de**
555 **plantas**, Passo Fundo, v.7, p. 103-55, 1999.

556

557 WOOD, P. M.; HOLLOMON, D. W. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in
558 the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of Complex III.
559 **Pest Management Science**, Londres, p. 59:499–511, 2003.

560

561 ZAMBOLIN, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas de**
562 **hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 576 p.

563

564 ZIOGAS, B. N.; BALDWIN, B. C.; YOUNG, J. E. Alternative Respiration: a Biochemical
565 Mechanism of Resistance to Azoxystrobin (ICIA5504) in *Septoria tritici*. **Pesticide Science**,
566 Londres, v. 50, p. 28-34, 1997.

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593 **Tabela 1-** Isolados de *Septoria lycopersici* usados neste estudo.

Isolado	Sistema de Cultivo	Cidade	Origem¹
Sep2	Indústria	Luziânia	GO
Sep99	Indústria	Luziânia	GO
Sep158	Indústria	Luziânia	GO
Sep160	Indústria	Luziânia	GO
Sep162	Indústria	Luziânia	GO
Sep170	Indústria	Cristalina	GO
Sep242	Mesa	Goianápolis	GO
Sep243	Mesa	Goianápolis	GO
Sep12	Mesa	Formosa	GO
Sep172	Mesa	Formosa	GO
Sep13	Mesa	Taguatinga	DF
Sep15	Mesa	Taguatinga	DF
Sep17	Mesa	Brasília	DF
Sep159	Mesa	Brasília	DF
Sep161	Mesa	Brasília	DF
Sep227	Mesa	Brazlândia	DF
Sep41	Mesa	Vicente Pires	DF
Sep96	Mesa	Ceilândia	DF
Sep154	Mesa	Ceilândia	DF
Sep257	Mesa	Brazlândia	DF
Sep315	Mesa	Brazlândia	DF
Sep312	Mesa	Brazlândia	DF
Sep323	Mesa	Brazlândia	DF
Sep313	Mesa	Planaltina	DF
Sep339	Mesa	Samambaia	DF
Sep64	Mesa	Planaltina	DF
Sep237	Mesa	Planaltina	DF
Sep256	Mesa	Planaltina	DF
Sep20	Mesa	Três Cachoeiras	RS
Sep21	Mesa	Três Cachoeiras	RS
Sep75	Mesa	Três Cachoeiras	RS
Sep81	Mesa	Três Cachoeiras	RS
Sep144	Mesa	Três Cachoeiras	RS
Sep22	Mesa	São Lourenço do Sul	RS
Sep26	Mesa	São Lourenço do Sul	RS
Sep67	Mesa	São Lourenço do Sul	RS
Sep76	Mesa	São Lourenço do Sul	RS
Sep144	Mesa	São Lourenço do Sul	RS
Sep146	Mesa	São Lourenço do Sul	RS
Sep110	Mesa	São Lourenço do Sul	RS
Sep19	Cereja/Mesa	Maquiné	RS
Sep40	Cereja/Mesa	Maquiné	RS
Sep70	Cereja/Mesa	Maquiné	RS
Sep174	Cereja/Mesa	Maquiné	RS
Sep34	Mesa	Rio grande	RS

Tabela 1-(Continuação).

Isolado	Sistema de Cultivo	Cidade	Origem¹
Sep52	Mesa	Rio grande	RS
Sep53	Mesa	Rio grande	RS
Sep65	Mesa	Rio grande	RS
Sep60	Mesa	Rio grande	RS
Sep104	Mesa	Rio grande	RS
Sep191	Mesa	Rio grande	RS
Sep39	Mesa	Rio grande	RS
Sep42	Mesa	Rio grande	RS
Sep48	Mesa	Rio grande	RS
Sep51	Mesa	Rio grande	RS
Sep10	Mesa	Pelotas	RS
Sep29	Mesa	Pelotas	RS
Sep33	Mesa	Pelotas	RS
Sep36	Mesa	Pelotas	RS
Sep37	Mesa	Pelotas	RS
Sep43	Mesa	Pelotas	RS
Sep47	Mesa	Pelotas	RS
Sep62	Mesa	Pelotas	RS
Sep84	Mesa	Pelotas	RS
Sep93	Mesa	Pelotas	RS
Sep199	Mesa	Pelotas	RS
Sep119	Mesa	Pelotas	RS
Sep107	Mesa	Turuçú	RS
Sep98	Indústria	Guaíra	SP
Sep352	Indústria	Guaíra	SP
Sep353	Mesa	Holambra	SP
Sep260	Indústria	Patos de Minas	MG
Sep262	Mesa	Araguari	MG
Sep264	Mesa	Araguari	MG
Sep267	Mesa	Araguari	MG
Sep268	Mesa	Araguari	MG
Sep271	Mesa	Cascalho Rico	MG
Sep272	Mesa	Cascalho Rico	MG
Sep297	Mesa	Cascalho Rico	MG
Sep298	Mesa	Cascalho Rico	MG
Sep299	Mesa	Cascalho Rico	MG
Sep273	Mesa	Estrela do Sul	MG
Sep274	Mesa	Estrela do Sul	MG
Sep276	Mesa	Estrela do Sul	MG
Sep279	Mesa	Estrela do Sul	MG
Sep282	Mesa	Estrela do Sul	MG
Sep306	Mesa	Estrela do Sul	MG
Sep311	Mesa	Estrela do Sul	MG
Sep211	Mesa	Caçador	SC
Sep214	Cereja/Mesa	Venda Nova do Imigrante	ES

Tabela 1-(Continuação).

Isolado	Sistema de Cultivo	Cidade	Origem¹
Sep215	Cereja/Mesa	Venda Nova do Imigrante	ES
Sep216	Cereja/Mesa	Venda Nova do Imigrante	ES
Sep217	Cereja/Mesa	Venda Nova do Imigrante	ES
Sep346	Mesa	Venda Nova do Imigrante	ES
Sep319	Mesa	Faxinal	PR

594 ¹ Origem: DF-Distrito Federal; ES- Espírito Santo; GO-Goiás; MG- Minas Gerais; RS-
595 Rio Grande do Sul; SC- Santa Catarina; SP- São Paulo; PR- Paraná.

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627 **Tabela 2-** Fungicidas usados nos testes de sensibilidade de isolados de *Septoria lycopersici*
 628 em casa de vegetação.

Nome do Grupo	Grupo Químico	Nome Comum	Agrofit ¹	Fabricante	Concentração I. A ²	Dose Comercial ³
Fungicidas inibidores da desmetilação (DMI) Metil	triazol	Tebuconazol	Tebufort	UPL	200g/L	100ml/100L água
Benzimidazol Carbamatos (MBC)	tiofanato	Tiofanato-metílico	Cercobin 700 WP	Iharabras	700g/kg	70g/100L água
Fungicidas inibidores da quinona externa (QoI)	methoxy-acrylatos	Azoxystrobina	Amistar WG	Syngenta	500g/Kg	8g/100L água
cloronitrila	cloronitrila	Clorotalonil	Daconil BR	Iharabras	750g/L	200g/100L água

629 ¹Fungicidas registrados no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit) do Ministério da Agricultura do
 630 Brasil (AGROFIT, 2019). ²Concentração de ingrediente ativo. ³Dose comercial de acordo com a bula do
 631 produto.
 632

633

634

635

636

637

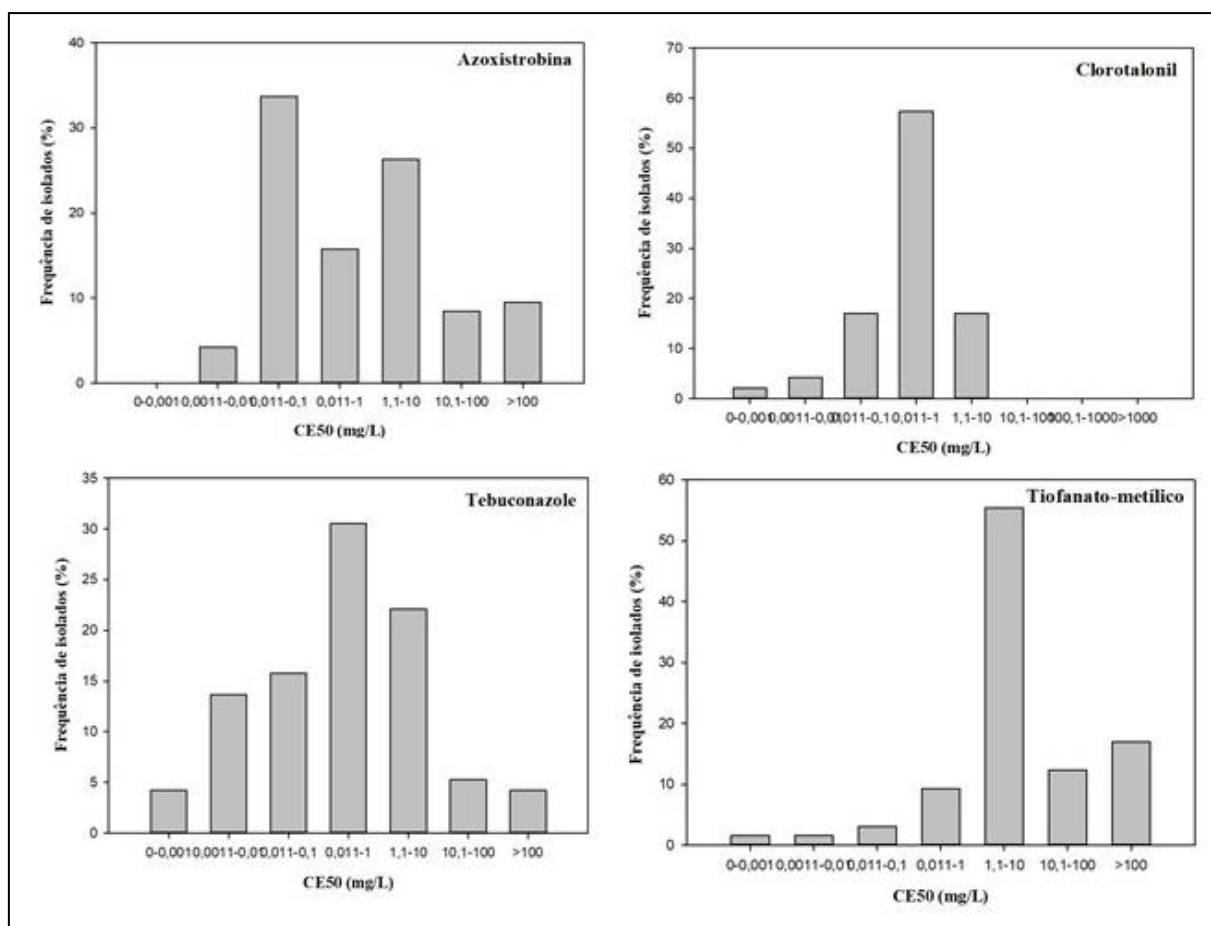
638

639

640

641

642



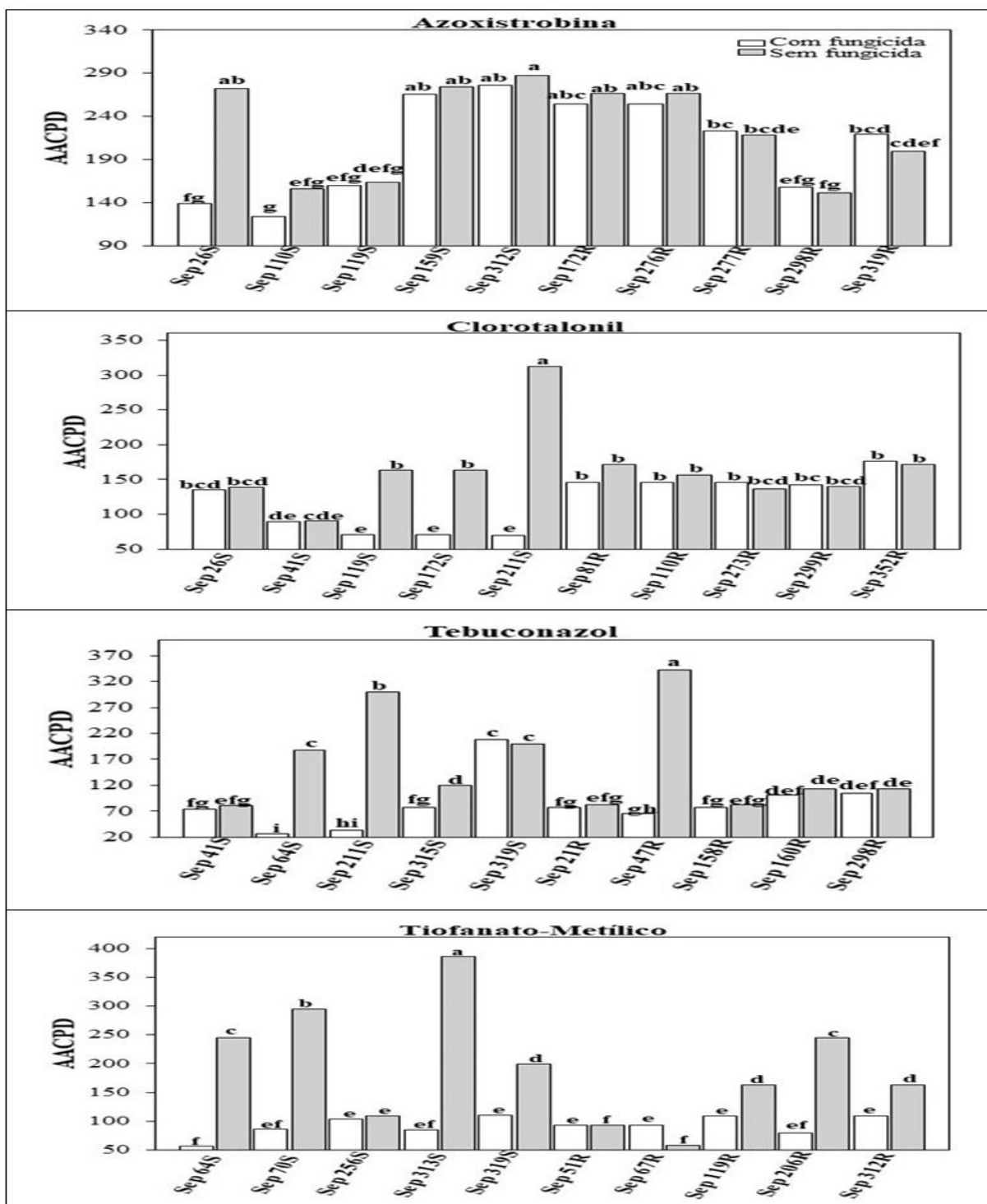
643

644

645

646

Figura 1- Distribuição da frequência de isolados em faixas de concentrações efetivas de azoxistrobina, clorotalonil, tebuconazol e tiofanato-metílico capaz de inibir em 50% (CE50) o crescimento micelial *in vitro* de *S. lycopersici*.



647 **Figura 2-** Efeito da azoxistrobina, clorotalonil, tebuconazol e tiofanato-metílico no controle da mancha de *Septoria* em folhas de tomateiro, da cultivar Santa Clara, inoculadas com isolados de *Septoria lycopersici* com diferentes níveis de sensibilidade. S- isolados sensíveis; R- isolados resistentes in vitro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

CAPÍTULO IV

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. *Septoria lycopersici* é o único agente etiológico da mancha de Septoria em tomateiro no Brasil;
2. Não foi detectada diversidade genética dentro da população de *S. lycopersici* do Brasil, quando utilizadas sequências das regiões Tub, Cal e EF1- α ;
3. A temperatura ótima para o crescimento micelial das colônias de *S. lycopersici* ficou em torno de 18 °C;
4. Existe intensa variabilidade morfológica entre e dentro dos isolados de *S. lycopersici* do Brasil;
5. Diferença de agressividade entre isolados de *S. lycopersici* foi constatada em plantas de tomateiro da cultivar Santa Clara;
6. Um total de 8 espécies de solanáceas (*Solanum acanthodes*, *S. gilo*, *S. mammosum*, *S. melongena*, *S. paludosum*, *S. sessiliflorum*, *S. viarum* e *D. metel*) foram identificadas como potenciais hospedeiras alternativas de *S. lycopersici*;
7. A população estudada de *S. lycopersici* demonstrou baixa sensibilidade a azoxistrobina e perda gradativa de sensibilidade para clorotalonil e tebuconazol.