

LEANDRO LUIZ BORGES

**FILOGEOGRAFIA DE ESPÉCIES DE CERCOSPORA ASSOCIADAS AO
CRESTAMENTO FOLIAR E A MANCHA PÚRPURA DA SEMENTE DA SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

B732f
2016

Borges, Leandro Luiz, 1984-
Filogeografia de espécies de *Cercospora* associadas ao
crestamento foliar e a mancha púrpura da semente da soja / Leandro
Luiz Borges. - Viçosa, MG, 2016.
ix, 72f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luiz Orlando de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Soja - Doenças e pragas. 2. *Cercospora kikuchii*. 3. *Cercospora*.
4. Filogenia. 5. Diversidade genética. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação
em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22 ed. 633.3494

LEANDRO LUIZ BORGES

**FILOGEOGRAFIA DE ESPÉCIES DE CERCOSPORA ASSOCIADAS AO
CRESTAMENTO FOLIAR E A MANCHA PÚRPURA DA SEMENTE DA SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 14 de outubro de 2016.

Wânia dos Santos Neves

Leonardo Lopes Bhering

Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Coorientador)

Thiago de Freitas Ferreira
(Coorientador)

Luiz Orlando de Oliveira
(Orientador)

À Alzira Borges, minha mãe, pelo seu amor eterno.

À Fabiana, pelo seu carinho e companheirismo.

Ao meu filho Théo, por mudar minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por ser a luz que guia os meus caminhos e me deu forças para a conclusão deste trabalho com sucesso.

À minha mãe, Alzira Borges, que sempre me deu muito amor e não mediu esforços para que eu conseguisse chegar até o final dessa jornada vitorioso.

À minha esposa, Fabiana, que com seu amor e carinho me conquistou e sempre esteve ao meu lado em todos os momentos.

Ao professor Luiz Orlando de Oliveira, pela orientação, ensinamentos, amizade, incentivo e exemplos para minha vida profissional.

Ao Dr. Burt H. Bluhm por ter me recebido em Fayetteville e me coorientar durante o doutorado sanduíche.

Ao professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, por sua coorientação, paciência e auxílio na execução dos experimentos.

Ao Professor Leonardo Lopes Bhering e a pesquisadora Wânia dos Santos Neves por aceitarem o convite e participarem da banca de defesa desta tese.

Ao Dr. Newton D. Piovesan, Dr. Álvaro M. Almeida e Dr. Renato D. S. Rosado pela ajuda na realização das coletas de soja.

Ao Pós-doutorando Thiago, por sua coorientação, auxílio na execução dos experimentos e por sua amizade.

À Pós-doutoranda Ana Paula, por todos os ensinamentos.

Às estagiárias: Marina, Isabela, Riziane, Camila, Petiara, Lis e Amanda que em todos os momentos me auxiliaram na condução dos experimentos.

Aos secretários Marco Túlio e Odilon pela ajuda nos assuntos acadêmicos e burocráticos relativos à secretaria da Genética e Melhoramento.

A todos os companheiros do laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia: Érica, Rafaela, Hugo, Thaís, Vanessa, Éric, Tiago, Thamyres, Alexander, Juan, Khalid, Jeferson, Thiago, Thiago, Ana Maria, Guilherme, Vitor, Cristiele, Rômulo e Gislaine. Todas as conversas, momentos de alegria, apoio e ensinamentos foram essenciais neste trabalho.

A todos do laboratório Molecular Plant Pathology/Micotoxicology da University of Arkansas: Nicholas, John Ridenouer, John Smith, Elizabeth, Sandeep, Yamonarani, Wayne, Brant, Karthik e Braham. A todos o meu muito obrigado pela receptividade na University of Arkansas.

Aos amigos que fiz durante o doutorado sanduiche nos EUA: Luiz, Gabriela, Nathália, Matheus, Malú, Maurício, Kátia, Fellipe, Thalita, Victor, Anne, Luca, Mariana, Daniel, Angélica, Cristiane, Anita, Leonardo, Samantha, Takeshi e Karla. Sem vocês a saudade do Brasil teria sido maior.

Aos companheiros do Alojamento Pós-graduando 2211 por todos os momentos inesquecíveis em minha vida.

À família de Fabiana que me acolheu em Viçosa e me apoiou em todos os momentos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), modelo de comprometimento com o ensino, pesquisa e extensão, que forneceu um ambiente favorável para minha qualificação profissional.

À University of Arkansas pelo acolhimento nos Estados Unidos e por ter me proporcionado uma das melhores experiências da minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV pela oportunidade aprimorar meus conhecimentos nessa área desafiadora que é a Genética.

À Divisão de Assistência Estudantil (DAE) pela concessão do alojamento e alimentação durante minha graduação na UFV.

Aos professores e funcionários da UFV que além da formação acadêmica também me ensinaram lições de vida.

A todos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) que trabalham incessantemente em busca da pesquisa de qualidade.

Ao GenMelhor, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de estudos no Brasil e nos EUA (PDSE 99999.008781/2014-01).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa (Número do processo: 140428/2014-3).

A FAPEMIG, FINEP, CNPq e FUNARBE pelo suporte financeiro para manutenção da estrutura e equipamentos do laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia, bem como do BIOAGRO.

A todos meus amigos e familiares que sempre acreditaram que eu seria um vencedor.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar ao fim desta batalha.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Leandro Luiz Borges, filho de Alzira Borges e Vicente de Paula Sousa, nasceu em 21 de fevereiro de 1984 em Divinópolis-MG. Concluiu o ensino fundamental em 1998 e ensino médio em 2001, na Escola Estadual José Manuel, em Araújos-MG.

Em 2004 iniciou o curso de graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, tendo transferido na mesma instituição para o curso de Ciências Biológicas no segundo semestre de 2006. Em janeiro de 2010 graduou-se em Ciências Biológicas na modalidade de Licenciatura e em julho de 2010 na modalidade Bacharelado, com ênfase em Genética e Biologia Molecular.

Em agosto de 2010 iniciou o mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa e obteve o título de Magister Scientiae em julho de 2012. Em agosto de 2012 iniciou o Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa. Entre março de 2015 e fevereiro de 2016 realizou Doutorado Sanduíche na University of Arkansas, EUA. Submeteu-se aos exames finais para aprovação da tese em 14 de outubro de 2016 obtendo o título de Doctor Scientiae em Genética e Melhoramento.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS	2

CHAPTER 1

MULTIHOST PATHOGENS CAUSE CERCOSPORA LEAF BLIGHT AND PURPLE SEED STAIN IN SOYBEANS

1. INTRODUCTION.....	4
2. MATERIAL AND METHODS.....	7
2.1. Sampling strategy and monoconidial cultures.....	7
2.2. DNA extraction, PCR amplification, and sequencing.....	7
2.3. Sequencing and sequence alignments.....	8
2.4. Assembly of datasets	8
2.5. Bayesian phylogenies	9
2.6. Network analyses.....	10
2.7. Cercosporin production assay.....	10
3. RESULTS.....	11
3.1. Phylogenetic analyses revealed five genealogical lineages.....	11
3.2. Phylogenetic placement of five Lineages.....	121
3.3. Network analyses of the five Lineages.....	14
3.4. Network of the mitochondrial cyb gene	16
3.5. Cercosporin production assay.....	18
3.6. Presence of G143A and E198G point mutations.....	18
4. DISCUSSION	20
5. REFERENCES	24
6. SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	28

CAPÍTULO 2

**LINHAGENS GENEALÓGICAS DE CERCOSPORA ASSOCIADAS AO
CRESTAMENTO FOLIAR E MANCHA PÚRPURA DA SEMENTE NA SOJA:
DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E NOS ÓRGÃOS DA PLANTA**

1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1. Amostragem e isolamento	33
2.2. Extração do DNA e reações de amplificação	33
2.3. Alinhamento das sequências e montagem dos bancos de dados	35
2.4. Análise filogenética Bayesiana.....	36
2.5. Análise de rede	37
2.6. Índices de diversidade molecular e teste de neutralidade.....	37
2.7. Análise de recombinação.....	38
3. RESULTADOS.....	39
3.1. Material genético	39
3.2. Variação molecular dos genes	40
3.3. Análise de recombinação.....	41
3.4. Sete linhagens genealógicas	41
3.5. Filogenia com outras espécies de Cercospora	43
3.6. Rede de haplótipos – genes nucleares	45
3.7. Rede de haplótipos baseada no gene cyb.....	51
3.8. Medidas de diversidade nucleotídica.....	52
3.9. Distribuição das linhagens nos órgãos	53
3.10. Distribuição geográfica das linhagens.....	53
4. DISCUSSÃO.....	55
4.1. Coleção dos isolados e genes amplificados.....	55
4.2. Sete linhagens de Cercospora associadas ao CFC e MPS	55
4.3. Distribuição das sete linhagens nos órgãos	58
4.4. Distribuição geográfica das sete linhagens.....	58
5. REFERÊNCIAS	61
6. MATERIAL SUPLEMENTAR	65
CONCLUSÕES GERAIS.....	65

RESUMO

BORGES, Leandro Luiz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2016. **Filogeografia de espécies de Cercospora associadas ao crestamento foliar e a mancha púrpura da soja.** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Coorientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Thiago de Freitas Ferreira.

Muitas espécies de *Cercospora* são patógenos generalistas. A versatilidade das espécies de *Cercospora* associadas ao Crestamento Foliar de *Cercospora* (CFC) e Mancha Púrpura da Semente (MPS) na soja parece ser historicamente subestimada. Neste trabalho, foram montados bancos de dados moleculares concatenados de sete genes nucleares e um mitocondrial, com sequências de 30 isolados fúngicos amostrados em hospedeiros alternativos à soja do Brasil (15 espécies) e Estados Unidos (seis espécies). Um conjunto de ferramentas complementares foi utilizado para explorar as relações filogenéticas e filogeográficas dos isolados de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS na soja e de outros hospedeiros. A produção de cercosporina e a incidência das mutações de ponto E198G e G143A – duas mutações que conferem resistência a fungicidas – foram investigadas. Entre as cinco linhagens genealógicas de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS, apenas a linhagem 1 foi hospedeiro específica, sendo encontrada somente na soja. As linhagens restantes foram generalistas, uma vez que foram encontradas causando o CFC e MPS na soja e manchas foliares em plantas daninhas e ornamentais. Os isolados foram agrupados nas linhagens de acordo com suas origens geográficas e não foi correlacionada com o hospedeiro de origem. A ausência de compartilhamento de hospedeiros entre isolados do Brasil e EUA sugere que a soja compartilha seus patógenos com outras espécies em escala local. Todos os isolados foram produtores da toxina cercosporina e tanto isolados provenientes da soja quanto de outros hospedeiros foram portadores das mutações pontuais G143A e E198G. Para analisar a distribuição geográfica das linhagens de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS no Brasil e EUA, bem como essas linhagens estão distribuídas nos órgãos da planta foram utilizados 329 isolados coletados em 11 localidades do Brasil e quatro nos EUA. Oito genes nucleares e um mitocondrial foram sequenciados mostrando a existência de duas linhagens genealógicas adicionais às outras cinco previamente descritas. Três dessas linhagens foram endêmicas no Brasil, duas foram endêmicas nos EUA e outras duas estão presentes nos dois países. As sete linhagens foram encontradas em folhas, caule e sementes. A presença de espécies crípticas associadas ao CFC e a MPS na soja alertam para o risco fitossanitário decorrente do erro de identificação de agentes causais de doenças com base apenas no hospedeiro.

ABSTRACT

BORGES, Leandro Luiz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2016. **Phylogeography of Cercospora species associated with Cercospora leaf blight and purple seed stain of soybean.** Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Co-advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Thiago de Freitas Ferreira.

Many *Cercospora* spp. are multihost pathogens. The versatility of *Cercospora* newly associated with cercospora leaf blight (CLB) and purple seed stain (PSS) in soybeans seems to have been historically underestimated. Herein, we assembled multilocus sequence data of seven nuclear and one mitochondrial gene regions with sequences from 30 fungal isolates sampled from nonsoybean host species from Brazil (15 species) and United States (six species). An array of complementary tools explored the phylogenetic and phylogeographic relationships among CLB- and PSS-causing *Cercospora* and the newly isolated *Cercospora* spp. Cercosporin production and the incidence E198G and G143A — two known point mutations associated with fungicide resistances — were investigated. Among the five genealogical lineages of CLB- and PSS-causing *Cercospora*, only Lineage 1 showed host specificity; this lineage had *C. kikuchii* as the only member and infected soybeans exclusively. The remaining four lineages were multihost pathogens; they infected soybeans along with ornamental and weed species. Genealogical placements were unrelated to host association; isolates clustered together according to geography. The lack of host sharing between Brazil and USA suggested that soybean crops shared pathogens with nearby nonsoybean host species locally. All isolates belonged to cercosporin-producing species of *Cercospora*. Isolates from nonsoybean host species exhibited both E198G and G143A. To analyze the geographical distribution of *Cercospora* lineages associated with CLB and PSS in Brazil and USA and the lineages distribution in the soybean organs we used 329 isolates collected in 11 locations in Brazil and four in the United States. Eight nuclear genes and mitochondrial were sequenced showing the existence of two additional lineages to the other five previously described. Three of these lines were endemic in Brazil, two were endemic in the US and other two are present in both countries. The seven lineages were found in leaves, stems and seeds. The presence of cryptic species causing CLB and PSS in soybean alert for phytosanitary risk due to taxonomic errors considering host specificity of *Cercospora*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Cercospora* (Mycosphaerellaceae, Ascomycota) compreende um dos maiores gêneros de hifomicetos e possui alguns dos fitopatógenos mais destrutivos (Goodwin et al. 2001). As espécies desse gênero são amplamente distribuídas e causam manchas foliares na maioria das famílias de angiospermas assim como em gimnospermas e pteridófitas (Crous e Braun 2003; Pollack 1987). Algumas espécies são utilizadas como agentes de controle biológico de plantas invasoras (Inglis et al. 2001; Tessmann et al. 2001).

A taxonomia das espécies do gênero *Cercospora* é realizada com base nas características morfológicas e no princípio de que as espécies são restritas a um único hospedeiro (Chupp 1954). Com base nessas características, mais de 1.400 espécies foram descritas (Chupp 1954), mas atualmente esse número foi reduzido para 659 espécies e outras 281 espécies foram morfológicamente indistinguíveis agrupadas e referidas como *C. apii* sensu lato. Experimentos de inoculação artificial têm questionado a especificidade de hospedeiros para membros do gênero *Cercospora*, o que pode levar a erros de taxonomia (Fajola 1978; Groenewald et al. 2006).

Muitas espécies de *Cercospora* são caracterizadas pela produção de um metabólito fitotóxico chamado de cercosporina (Daub e Ehrenshaft 2000). Segundo Fajola (1978), somente espécies verdadeiras de “*Cercospora*” são capazes de produzir cercosporina, sendo as espécies não produtoras da toxina pertencente a gêneros relacionados. Entretanto, foi demonstrado que a produção da cercosporina in vitro pode ser diferente entre isolados da mesma espécie, bem como influenciada por fatores ambientais como luz, condições nutricionais do meio e temperatura (Jenns et al. 1989). Tais dificuldades impedem a aplicação da cercosporina na taxonomia do gênero (Goodwin et al. 2001).

Tradicionalmente, o crestamento foliar de *Cercospora* (CFC) e a mancha púrpura da semente (MPS) na soja (*Glycine max* L. Merrill) são associadas ao fungo necrotrófico *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) M. W. Gardner (Gardner 1925; Matsumoto e Tomoyasu 1925). A mancha púrpura foi descrita primeiramente em 1921 na Coreia (Suzuki 1921) e em 1924 nos Estados Unidos (Gardner 1925).

O fungo causa lesões em toda a planta, mas os sintomas são mais facilmente identificados nas folhas e sementes (Murakishi 1951). Nas folhas, as lesões causam rápida clorose e necrose resultando em uma desfolha prematura (Walters 1978, 1980). Nas sementes contaminadas, os sintomas são visivelmente identificados pela coloração

arroxeadas e pequenas fissuras no tegumento (Matsumoto e Tomoyasu 1925). Após a germinação, o patógeno infecta as plântulas causando morte reduzindo o estande de germinação (Lehman 1950).

Recentemente, um estudo conduzido com isolados de sementes e folhas com sintomas da MPS e CFC, respectivamente, obtidos do Brasil, EUA e Argentina mostrou a existência de múltiplas espécies *Cercospora* associadas ao CFC e MPS (Soares et al. 2015). Além de *C. kikuchii*, as espécies *C. cf. flagellaris*, *C. alchemillicola* e o complexo *C. sp. P* e *C. sp. Q*, foram identificadas como causadoras do CFC e a MPS. A ocorrência de espécies críticas nesse patossistema tem implicações no controle das duas doenças e dificulta o trabalho de melhoristas na obtenção de cultivares com resistência duradoura a longo prazo.

Pela importância do CFC e MPS na cultura da soja e devido à existência de espécies críticas nesse patossistema, este estudo foi conduzido para acessar duas questões básicas: i) se as espécies de *Cercospora* associadas às duas doenças têm a soja como único hospedeiro; ii) o número de linhagens e sua distribuição geográfica no Brasil e em dois estados dos EUA bem como a sua distribuição nos órgãos da planta. Para responder essas questões foram coletados isolados no Brasil e EUA e ferramentas de filogenia e filogeografia molecular foram utilizadas.

2. REFERÊNCIAS

- Chupp, C. 1954. A monograph of the fungus genus *Cercospora*. The Ronald Press, New York.
- Crous, P. W., Braun, U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht.
- Daub, M. E., Ehrenshaft, M. 2000. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:461-490.
- Fajola, A. O. 1978. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. *Physiol. Plant Pathol.* 13:157-164.
- Gardner, M. W. 1925. Indiana plant diseases, 1924. *Proc. Indiana Acad. Sci.* 35:237-257.
- Goodwin, S. B., Dunkle, L. D., Zismann, V. L. 2001. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91:648-658.

- Groenewald, M., Groenewald, J. Z., Braun, U., Crous, P. W. 2006. Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola* and description of *C. apiicola*, a novel species from celery. *Mycologia* 98:275-285.
- Inglis, P. W., Teixeira, E. A., Ribeiro, D. M., Valadares-Inglis, M. C., Tigano, M. S., Mello, S. C. 2001. Molecular markers for the characterization of Brazilian *Cercospora caricis* isolates. *Curr. Microbiol.* 42:194-198.
- Jenns, A. E., Daub, M. E., Upchurch, R. G. 1989. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 79:213-219.
- Lehman, S. G. 1950. Purple stain of soybean seeds. *N. C. Ars. Tech. Bull.* 369:1-11.
- Matsumoto, T., Tomoyasu, R. 1925. Studies on the purple speck of soybean seed. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 1:1-14.
- Murakishi, H. H. 1951. Purple seed stain of soybean. *Phytopathology* 41:305-318.
- Pollack, F. G. 1987. An annotated compilation of *Cercospora* names. *Mycol. Mem.* 12:1-212.
- Soares, A. P. G., Guillin, E. A., Borges, L. L., Silva, A. C. T., Almeida, A. M. R., Grijalba, P. E., Gottlieb, A. M., Bluhm, B. H., Oliveira, L. O. 2015. More *Cercospora* species infect soybeans across the americas than meets the eye. *PloS One* 10:e0133495.
- Suzuki, K. 1921. Studies on the cause of “Shihan” of soybean. *Chosen Nakaiho* 16:24-28.
- Tessmann, D. J., Charudattan, R., K., H. C., Rosskopf, E. N. 2001. A Molecular characterization of *Cercospora* species pathogenic to water hyacinth and emendation of *C. piaropi*. *Mycologia* 93:323-334.
- Walters, H. J. 1978. *Cercospora* leaf blight of soybeans. *Phytopathol. News* 12:165-166.
- Walters, H. J. 1980. Soybean leaf blight caused by *Cercospora kikuchii*. *Plant Dis.* 64:961-962.

CHAPTER 1

MULTIHOST PATHOGENS CAUSE CERCOSPORA LEAF BLIGHT AND PURPLE SEED STAIN IN SOYBEANS

1. INTRODUCTION

The genus *Cercospora* is comprised of destructive plant pathogens that cause disease in major plant families of the monocots, dicots, ferns and gymnosperms (Chupp 1954; Groenewald et al. 2012; Pollack 1987). Although commonly associated with leaf spot diseases, *Cercospora* spp. can potentially be isolated from necrotic lesions in leaves, fruits, seeds, and other plant tissues (Agrios 2005). A few *Cercospora* species are generalist plant pathogens (Crous and Braun 2003; Groenewald et al. 2006), but many species are host restricted, capable of infecting few plant species or even a single host (Chupp 1954; Crous and Braun 2003). Beyond morphological features, a trait shared among many *Cercospora* species is the production of cercosporin, a polyketide-derived phytotoxin postulated to play a key role in pathogenicity (Daub et al. 2005).

The genus *Cercospora* was first described over 150 years ago (Fresenius 1863). By the mid 20th century, more than 1,400 species were named within the genus (Chupp 1954); three decades later, more than 3,000 names were listed (Pollack 1987). Currently, there are 659 recognized species of *Cercospora*; *C. apii* sensu lato alone brings together about 280 morphologically indistinguishable species (Crous and Braun 2003). Despite recent refinements, *Cercospora* taxonomy remains unsettled and poorly resolved.

Taxonomic studies in *Cercospora* were historically based on a limited number of morphological features, including conidiophores, conidiogenous cells, and conidia, which in combination can distinguish species with some degree of effectiveness (Groenewald et al. 2012). Until very recently, morphological criteria dominated the taxonomy of *Cercospora* (Cai et al. 2011). However, many of the morphological characters are inconspicuous, and thus the naming of new species of *Cercospora* has relied heavily on host association (Cai et al. 2011; Chupp 1954; Goodwin et al. 2001; Groenewald et al. 2012).

The host range of many *Cercospora* species has been determined historically by artificial inoculation (Groenewald et al. 2006). However, many species require distinct nutritional and environmental parameters to grow and produce conidia. For such species, the requirements can be difficult to determine experimentally, but are crucial

for effective production of conidia in vitro for artificial inoculation (Chand et al. 2013; Cooperman and Jenkins 1986; Paul and Munkvold 2005). Moreover, the ability to infect different hosts after artificial inoculation has been questioned as a valid criterion for species delimitation (Groenewald et al. 2006).

More recently, molecular techniques have shed new light into fungal taxonomy, particularly fungi with no known sexual stage, such as *Cercospora* spp. (Cai et al. 2011; Groenewald et al. 2012; Taylor and Fisher 2003). Recently, multilocus sequence analyses have established robust species boundaries for many plant pathogenic fungi (Quaedvlieg et al. 2014), including several species of *Cercospora* (Bakhshi et al. 2015; Groenewald et al. 2012; Groenewald et al. 2006; Soares et al. 2015).

In soybeans, *C. kikuchii* (Tak. Matsumoto & Tomoy.) M. W. Gardner was traditionally thought to be the single causal agent of *Cercospora* Leaf Blight (CLB) and Purple Seed Stain (PSS) (Cai and Schneider 2008; Matsumoto and Tomoyasu 1925). Recently, multilocus sequence analyses led to the rejection of this long-held assumption; both CLB and PSS have multiple causal agents; *C. kikuchii* amongst them (Soares et al. 2015; Albu et al. 2016). Some of the *Cercospora* spp. newly associated with CLB and PSS appear to represent undescribed species, while others — such as *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbechiae* and *C. alchemillicola* - are associated with a wide range of hosts. Hosts shared among species of *Cercospora* closely related to CLB- and PSS-causing *Cercospora* include weeds that occur on soybean fields — such as *Amaranthus* sp., *Dysphania ambrosioides*, *Siegesbeckia pubescens*, *Siegesbeckia glabrescens* among others — and ornamental plants, such as *Begonia* sp., *Celosia argentea* var. *cristata*, *Hydrangea serrata* (Groenewald et al. 2012).

An essential part of soybean disease management is the application of benzimidazole and strobilurin fungicides, either alone or in combination (Dorrance, 2007). Specific point mutations are known to confer resistance to these two fungicides. In the nuclear β -tubulin gene, a non-synonymous transversion A→C gives rise to a Glu₁₉₈→Ala₁₉₈ substitution in the tubulin protein, which confers resistance to benzimidazole in many fungal pathogens (Hahn 2014) including *Cercospora* (Rosenzweig et al. 2014). In the mitochondrial cytochrome b gene, a non-synonymous transversion G→C results in the substitution Gly₁₄₃→Ala₁₄₃; this point mutation confers resistance to strobilurins (Bolton et al. 2013) and has been documented among *Cercospora* spp. (Obuya and Franc, 2016). Hereafter, these substitutions are referred to as ‘mutation E198G’ and ‘mutation G143A’, respectively.

Although fungicide applications impact CLB and PSS sporadically (Hartman et al. 1999; Imazaki et al. 2006), they are often not intended to control these diseases. Regardless whether the fungicide applications are intended or not, CLB- and PSS-causing *Cercospora* are likely to undergo strong chemical selective pressures at soybean fields. Thus, fungicide resistance is likely to emerge over time. If *Cercospora* associated with CLB and PSS infect other host species in addition to soybeans, the selective pressure imposed while they infect soybeans may modulate the frequency with which E198G and G143A emerge on isolates obtained from the other compatible, non-soybean host species.

In the study presented herein, the following four questions were addressed: i) What are the phylogenetic relationships among species of *Cercospora* causing CLB and PSS and *Cercospora* species isolated from non-soybean host species? ii) To what extent do isolates of *Cercospora* obtained from non-soybean host species in Brazil share phylogenetic placements with those isolated from the United States? iii) How does cercosporin production in isolates obtained from non-soybean host species compare with that of isolates obtained from soybeans? iv) What is the current incidence of E198G and G143A in isolates obtained from non-soybean host species? To address these questions, *Cercospora* isolates were collected in Brazil and the United States from weedy and ornamental hosts of *Cercospora* species closely-related to CLB- and PSS-causing *Cercospora* (Groenewald et al. 2012; Soares et al. 2015). For each isolate, multilocus sequence data were obtained and assembled from regions of seven nuclear genes and one mitochondrial gene. These data along with DNA sequences from a previous study (Soares et al. 2015) were analyzed with a combination of phylogenetic tools and network analyses to investigate whether CLB- and PSS-causing *Cercospora* are indeed multihost pathogens. Additionally, cercosporin production was quantified for each isolate and the occurrence of both E198G and G143A was investigated within a genealogical context.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Sampling strategy and monoconidial cultures

Symptomatic leaves with necrotic lesions spots were sampled from 15 non-soybean host species from three locations in Brazil (state of Minas Gerais), in addition to six non-soybean host species from four locations in the United States (states of Arkansas and Kansas). Among those, there were two taxa (*Tagetes* sp. and *Begonia* sp.) that were collected both in Brazil and the United States.

Individual leaves were submerged sequentially in an ethanol solution (70%, v/v) for 1 minute, a sodium hypochlorite (1%, v/v) for 1 min, and deionized water. Subsequently, each leaf was kept in a moist chamber at 26°C, for 3-4 days. Under a stereoscopic zoom microscope (Olympus SZ-40), conidia were harvested from the lesions and transferred to Petri dishes loaded with potato dextrose agar (PDA) and 1% streptomycin sulphate (100 µg/mL). After 30 minutes, under the stereoscopic microscope, a single conidium was removed from the Petri dish with the help of a needle and transferred to a new Petri dish with PDA. The monoconidial cultures were kept in PDA under a 12-h photoperiod, at $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The monoconidial culture obtained from soybeans (Arck_22) was isolated as described above. Mycelial fragments were preserved in both glycerol solution (30%, v/v) at -80°C and silica gel, following established protocols (Smith and Onions 1994). The isolates with their respective codes, host species, and location of sampling are shown in Table S1.

2.2. DNA extraction, PCR amplification, and sequencing

Fungal mycelia were collected from PDA cultures, after being grown for 10 days at 26°C. About 200 mg of mycelia was removed for each culture and the total genomic DNA was extracted from mycelia (Soares et al. 2015). Polymerase chain reactions (PCR) were performed to amplify seven nuclear gene regions (act, cal, his, ITS, tef, cfp, and tub) and the mitochondrial (cyb) gene region. The protocols, primers, and PCR conditions that amplified each of the eight gene regions were essentially those described previously (Soares et al. 2015). Sequencing services were performed either by Macrogen Inc., South Korea (www.macrogen.com) or Beckman Coulter Inc., United States (<http://www.beckmangenomics.com>). Sequencing reactions were carried out with the same primers as in the PCR amplifications.

2.3. Sequencing and sequence alignments

All sequences were imported into Sequencher version 4.8 (Gene Codes Corp.) for editing. Complete sequence alignments were performed with the introduction of gaps to compensate for the presence of insertion or deletions (indels). After all of the sequences were aligned, the ends of the alignments were trimmed to eliminate fragments that could not be obtained for all sequences. Sequences obtained for this study were deposited in GenBank (Table S1).

2.4. Assembly of datasets

Multiple datasets were assembled for this study; each dataset accommodated the particular requirements of the analysis it was intended for. Dataset 1 (n=52; 3,616 bp) resulted from the concatenation of seven nuclear gene regions (act, cal, his, ITS, tef, cfp, and tub). For two gene regions (cfp and tub), intronic sequences could not be aligned unambiguously across the dataset, and thus, only exon sequences were used. Initially, dataset 1 contained sequences from 37 fungal isolates obtained from non-soybean host species that were sampled either in Brazil (n=18) or the United States (n=19) and an isolate from soybeans (Arck_22). Subsequently, dataset 1 was supplemented with sequence data from a previously published study (Soares et al. 2015): 12 fungal isolates obtained from soybeans, the isolates CPC_5068 (the type strain of *C. kikuchii*), V8 (from *C. sojina*), and CPC_11557 (the type strain of *C. beticola*, which was used as outgroup). Dataset 1 was intended to explore the phylogenetic relationships among isolates of *Cercospora* associated with CLB and PSS and isolates of *Cercospora* obtained from non-soybean host species.

Dataset 2 (n=66; 1,567 bp) was also assembled, representing a sub-set of five genes (act, cal, his, ITS, and tef) out of the seven nuclear gene regions from dataset 1, together with homologous sequences of other closely-related species taken from Groenewald et al. (2012). A decrease in the base pairs length of dataset 2 (as compared to dataset 1) was necessary because sequences of gene regions (cfp and tub) of closely-related *Cercospora* species are not currently available. Dataset 2 was intended to explore further the phylogenetic relationships, this time in the presence of other closely-related congeners.

Subsequently, haplotype networks were used to investigate relationships among genealogical lineages of *Cercospora* associated with CLB and PSS and *Cercospora*

obtained from non-soybean host species. Dataset 3 (n=128; 1,649 bp) resulted from the concatenation of *cfp* and *tub* sequences, the two most polymorphic gene regions available for this study (Soares et al. 2015). Dataset 3 contained sequence information from exons exclusively. Based on preliminary networks, five independent datasets were assembled (dataset 4 to 8) to further explore relationships within each genealogical lineage of *Cercospora*. Within each of the five datasets, alignments of introns could be accomplished easily. Thus, datasets 4 to 8 were assembled with sequence information from both introns and exons. Finally, dataset 9 (n=146; 653 bp) contained sequence information from the mitochondrial (*cyb*) gene region.

2.5. Bayesian phylogenies

Subsets of each nuclear gene region from dataset 1 and dataset 2 were evaluated, independently, with MRMODELTEST v.2.3 (Nylander 2004). For each gene region in each dataset, the Akaike Information Criterion (Akaike 1973) indicated the best-fit models among 24 models of molecular evolution. For subsets within dataset 1, the following models were recovered: K80+G (*act*), GTR+I (*cal*), HKY+I (*his*, *tef*, and *cfp*), SYM+I (ITS), and GTR+I+G (*tub*). For subsets within dataset 2, the following models were recovered: SYM+G (*act*), GTR+I (*cal* and *his*), K80+I (ITS), GTR+I+G (*tef*). The phylogenetic relationships were inferred with two Bayesian phylogenies, which were obtained using partitioned analyses in MRBAYES v3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) with dataset 1 and dataset 2, respectively, together with the information about the corresponding models of molecular evolution. The Bayesian phylogenetic analyses were carried out using two simultaneous runs of five million generations, with one cold and seven heated chains in each run; the temperature parameter was set to 0.25 (Temp = 0.25) and the branch length prior mean was set to 0.01 (brlenspr = Unconstrained:Exponential(100)). In each analysis, trees were sampled once every 5,000 generations; the first 250 trees were discarded as burn-in samples. Standard deviations of split frequencies at the end of each run were below 1.5%. The selected settings ensured sufficient sampling of the posterior occurred; in Tracer 1.5 (Drummond et al. 2012), the Effective Sample Size, ESS, values were above 200 for all statistics. For each analysis, a 50%-majority-rule consensus tree of the two independent runs was obtained with posterior probabilities that were equal to bipartition frequencies.

2.6. Network analyses

To explore gene genealogies, a total of seven independent network analyses were performed, using the median-joining (MJ) network method (Bandelt et al. 1999) as implemented in NETWORK 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd). Each network analysis used information from concatenated sequences of the nuclear *cfp* and *tub* genes (datasets 3 to 8, respectively) and the mitochondrial *cyb* gene (dataset 9). In each analysis, the program was set to consider indels as a fifth character state and coded such that each indel, regardless of size, was considered as a single state.

2.7. Cercosporin production assay

The concentration of cercosporin was determined with the method of Jenns et al. (1989) following the protocols described by Almeida et al. (2005). To compare mean cercosporin concentration among isolates from nonsoybean host species with isolates from soybeans, a t-test was carried out with R software (Team 2016).

3. RESULTS

3.1. Phylogenetic analyses revealed five genealogical lineages

The first Bayesian phylogeny displayed six major clusters, with *C. beticola* as the outgroup (Fig. 1). One cluster contained the isolate of *C. sojae*; the remaining 50 isolates were grouped together into five major clades, each of which exhibited 100% support from posterior probabilities. The set of seven genes provided high resolution among the major clusters, but low resolution within clusters. Four out of the five major clusters corresponded to one of the four lineages described previously — Lineages 1 to 4 (Soares et al. 2015). Additionally, there was one cluster that corresponded to a previously undescribed lineage (referred herein to as Lineage 5, shown in purple in Fig. 1). The cluster that corresponded to Lineage 1 (shown in blue) contained isolates obtained exclusively from soybeans (including the ex-type strain of *C. kikuchii*). However, Lineages 2 to 5 contained isolates that originated from soybeans and from non-soybean host species. Sister to Lineage 1, the second major clade (shown in green) corresponded to Lineage 2; this cluster comprised 16 isolates from non-soybean host species together with three isolates from soybeans. Clusters 1 and 2 shared *C. sojae* as a sister group. The third clade (Lineage 3; shown in orange), included two isolates from non-soybean host species and five isolates from soybeans. The fourth major clade corresponded to Lineage 4 (shown in red), containing 17 isolates from non-soybean host species and two isolates from soybeans. Lineage 5 contained only two isolates: 801 (obtained from *Zinnia* sp.) and Arck_22 (obtained from soybeans).

3.2. Phylogenetic placement of five Lineages

The second Bayesian phylogeny (Fig. 2) showed the relationships among 66 fungal isolates and 16 other closely-related species of *Cercospora*. Lineage 1 (shown in blue) contained three members (Ck_482, Ck_170, and the ex-type of *C. kikuchii* CPC_5068) and formed a well-supported (PP=100%) monophyletic clade. None of the 16 closely-related species of *Cercospora* clustered together with Lineage 1. Lineage 2 (shown in green) brought isolates obtained from a number of non-soybean host species together with seven closely-related species of *Cercospora* (*C. sp. N*, *C. sp. P*, *C. sp. Q*, *C. cf. sigesbeckiae*, *C. rodmanii*, *C. cf. richardiicola*, and *C. alchemillicola*). In addition, Lineage 2 contained four isolates from soybean (Ck_173, Ck_A119, Ck_666, and Ck_A100). There were three sub-clades within Lineage 2 (PP≥94%).

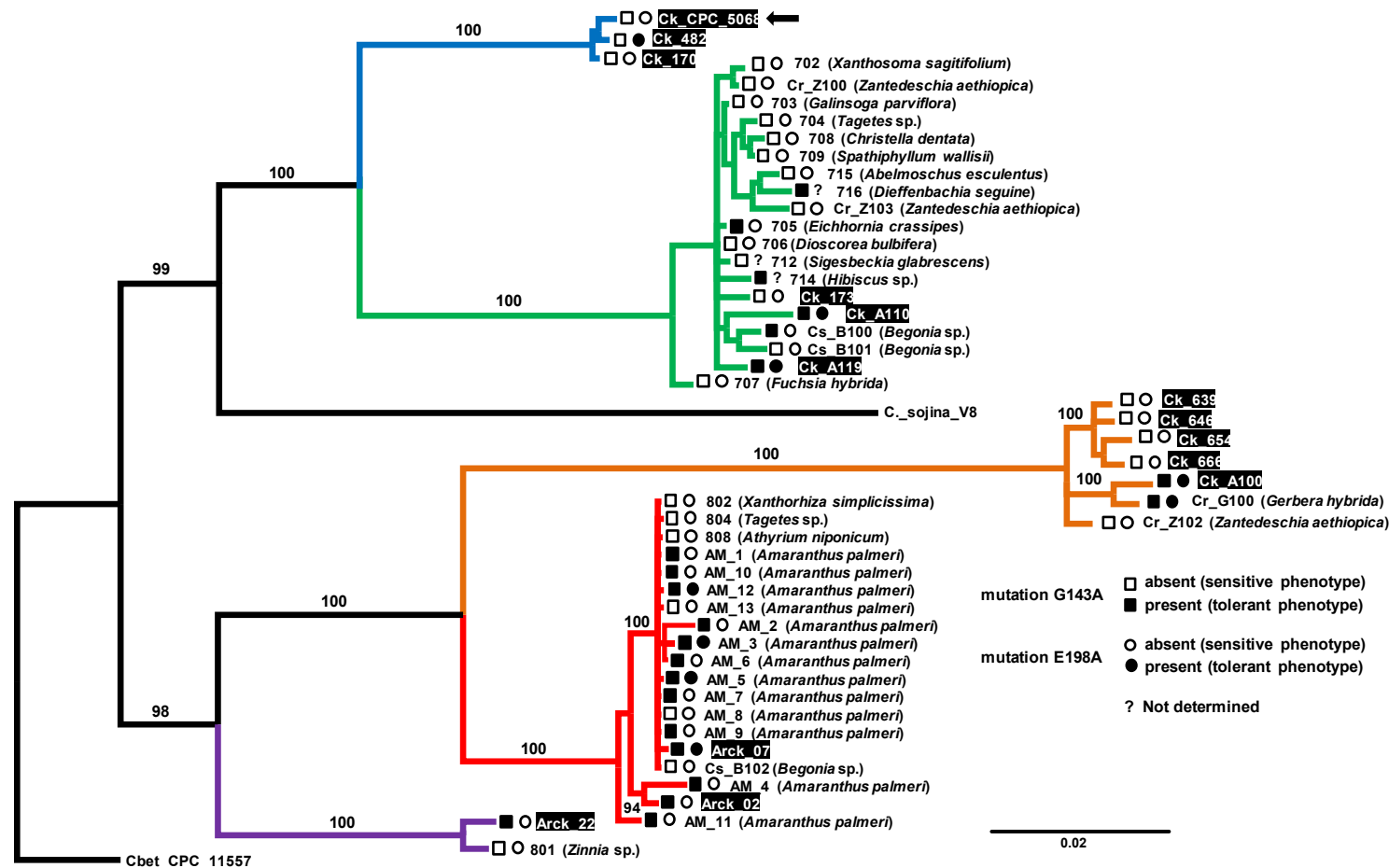


Figure 1. **Bayesian phylogeny (consensus tree) showing the multi-host origins of the five genealogical lineages of *Cercospora* associated with *Cercospora* leaf blight and purple seed stain of soybeans.** On soybeans, fungal isolates were obtained from either purple-stained soybean seeds or infected leaves; on non-soybean hosts, isolates were from leaves. The dataset was comprised of 3,616 bases from the concatenation of seven nuclear genes (act, cal, his, ITS, tef, cfp, and tub). *Cercospora soja* is shown for reference; the tree was rooted in *C. beticola*. Branch lengths are drawn to scale; nodal support values are given as posterior probabilities (%) above the branches (when >90%). The scale bar corresponds to the expected number of substitutions per site. Branch colors indicate genealogical lineage: blue, Lineage 1; green, Lineage 2; orange, Lineage 3; red, Lineage 4; and purple, Lineage 5. Labels of isolates according to host: non-soybean hosts, no highlight; soybean, black highlight. Non-soybean host species are as indicated. The black arrow indicates the ex-type strain of *C. kikuchii* (CPC_5068). Presence/absence of point mutations (G143A and E198G) conferring fungicide tolerance are indicated. Gene codes: act, actin; cal, calmodulin; his, histone H3; ITS, internal transcribed spacers and intervening 5.8S nrDNA; tef, translation elongation factor 1-alpha; cfp, cercosporin facilitator protein; tub, β -tubulin.

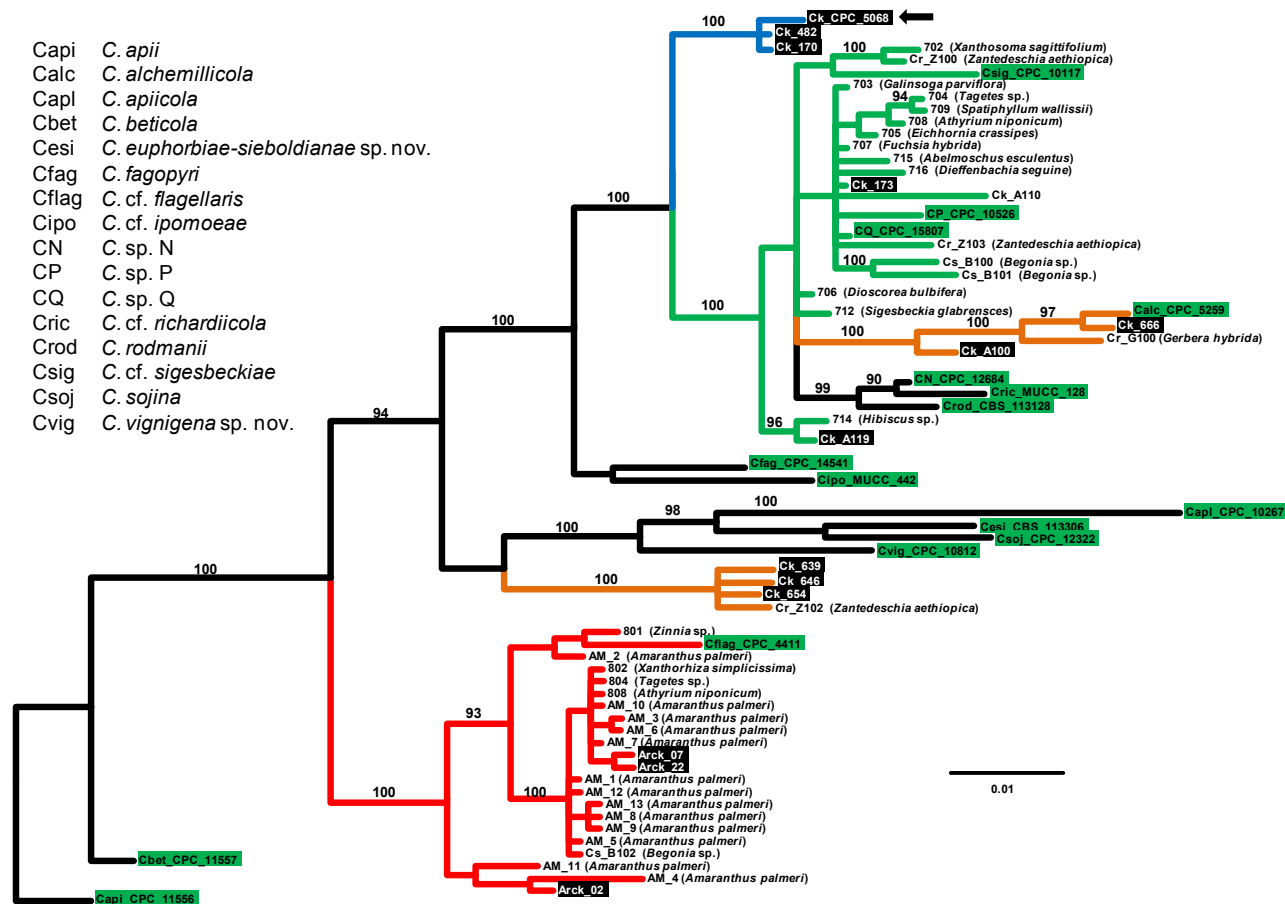


Figure 2. Bayesian phylogeny (consensus tree) showing the relationships among isolates of *Cercospora* associated with *Cercospora* leaf blight and purple seed stain of soybeans, isolates of *Cercospora* obtained from non-soybean hosts, and other closely related species. On soybeans, fungal isolates were obtained from either purple-stained soybean seeds or infected leaves; on non-soybean hosts, isolates were from leaves. The dataset was 1,567 bases long and resulted from the concatenation of five nuclear genes (act, cal, his, ITS, and tef). Branch lengths are drawn to scale; nodal support values are given as posterior probabilities (%) above the branches (when >90%). The scale bar corresponds to the expected number of substitutions per site. Branch colors indicate genealogical lineage: blue, Lineage 1; green, Lineage 2; orange, Lineage 3; red, Lineage 4, and 5, purple. Labels of isolates according to host: non-soybean hosts, no highlight; soybean, black highlight; data from Groenewald et al. (2012), green highlight. Non-soybean host species are as provided. The black arrow indicates the ex-type strain of *C. kikuchii* (CPC_5068). Gene codes: act, actin; cal, calmodulin; his, histone H3; ITS, internal transcribed spacers and intervening 5.8S nrDNA; tef, translation elongation factor 1- α .

The lower resolution of the concatenated set of five genes resulted in Lineage 3 (shown in orange) being split into two sub-clusters. One of the sub-clusters of Lineage 3 grouped with isolates belonging to Lineage 2; the other sub-cluster of Lineage 3 formed a single, distantly-related group of isolates from soybeans (Ck_639, Ck_646, and Ck_654) and non-soybean host species (Cr_Z102, from *Zantedeschia aethiopica*). The lower resolution of five genes of dataset 2 also resulted into Lineage 5 (shown in purple) being immersed into a clade together with components of Lineage 4 (shown in red), in addition to *C. cf. flagellaris*. All members of Lineages 4 and 5 were isolated in USA.

3.3. Network analyses of the five Lineages

Initially, the genealogical relationships among haplotypes were inferred with dataset 3, which contained the concatenated *cfp*—*tub* gene regions (Fig. 3). This dataset contained sequences from 31 isolates from non-soybean host species supplemented with sequences from 97 isolates from soybeans (Soares et al. 2015). The full network (shown at the center; Fig 3) lacked information from the introns, because their sequences could not be aligned unambiguously within the full dataset. The central network consisted of five groups of haplotypes (or haplogroups); each haplogroup had a corresponding phylogenetic lineage (see Fig. 1). Distances between nearest pairs of haplogroups varied from 56 to 84 mutational steps. Within each of the five haplogroups, sequences from introns could be aligned unambiguously; therefore, the five lineage-specific networks included information that combined sequence data from exons and introns. Each of the five networks depicted haplotype relationships within a given haplogroup. The distances between nearest haplotypes of the same haplogroup were much smaller than the distances between nearest haplotypes of distinct haplogroups.

The network of Lineage 1 consisted of isolates obtained exclusively from soybeans. In the current analysis, the network remained identical to the network obtained previously (Soares et al. 2015).

The network of Lineage 2 contained ten haplotypes (depicted in yellow), which were obtained from isolates taken from non-soybean host species from Brazil along with haplotypes (depicted in black) obtained from isolates taken from soybeans. Most of the haplotypes obtained from non-soybean host species joined the network through haplotype 18.

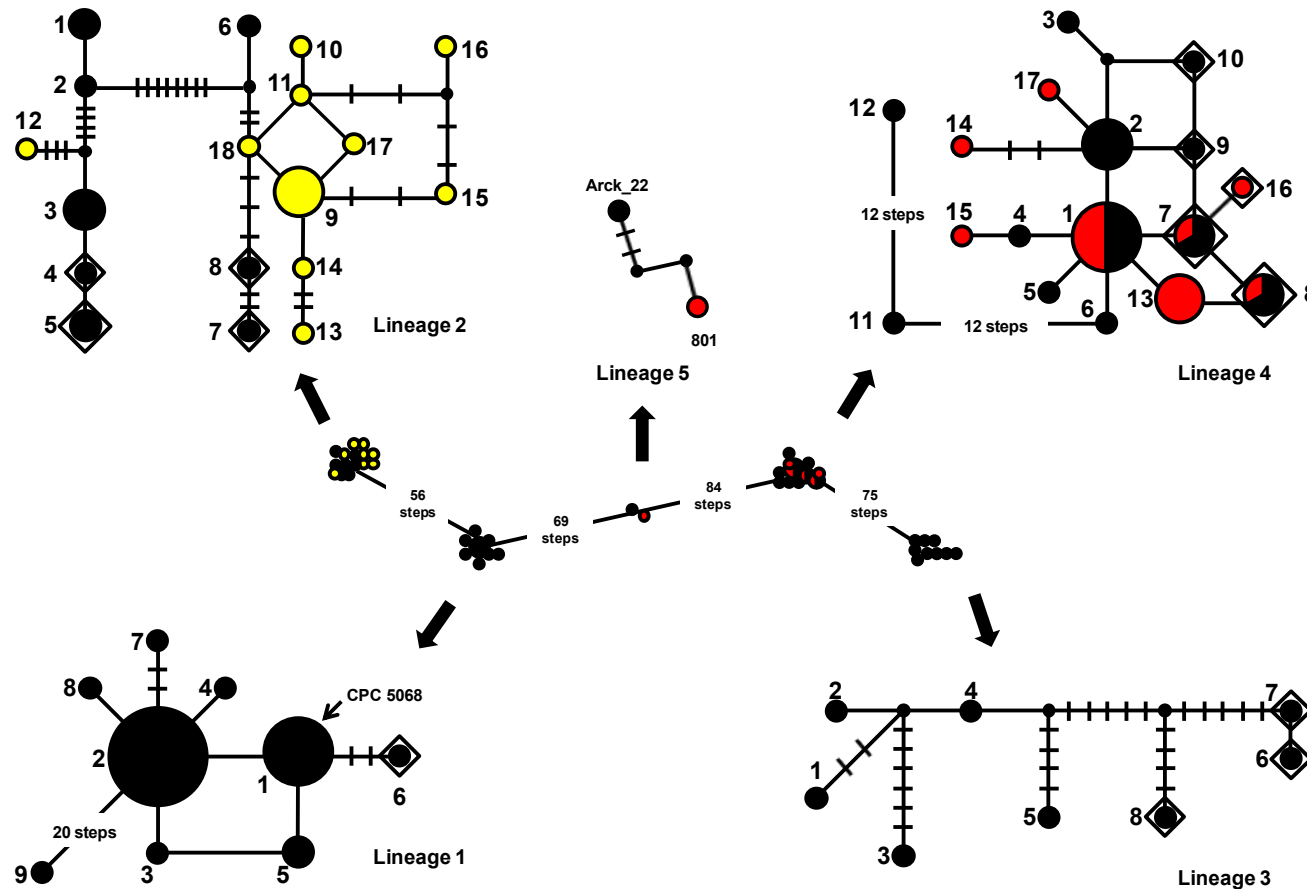


Figure 3. **Median-joining networks depicting haplotype relationships among and within five genealogical lineages of *Cercospora* isolated from either soybeans or non-soybean hosts.** Networks were based on a dataset containing two concatenated nuclear gene regions: the cercosporin facilitator protein (*cfp*) and the β -tubulin 1 (*tub*) genes. The central network used information from exons only; the additional five networks used information from both exons and introns. In the central network, the number of mutational steps is as indicated. From Lineage 1 to Lineage 5, the number of mutational steps is indicated with bars when there is more than one (unless indicated otherwise). A circle represents a given haplotype (coded with numbers within each lineage); size is proportional to the relative frequencies. Color in circles indicates the host and relative frequency of the haplotype: soybeans, black; non-soybean hosts from Brazil, yellow; non-soybean hosts from USA, red. Diamonds indicate haplotypes harboring the mutation E198G on *tub*, which is known to confer resistance to benzimidazole fungicides. In Lineage 1, an arrow denotes the location of the haplotype of CPC_5068, the ex-type strain of *C. kikuchii*.

Haplotype 12 did not share a most recent common ancestor (MRCA) with the remaining haplotypes obtained from isolates from non-soybean host species (haplotypes 9 to 18). In the network of Lineage 2, there was no sharing of haplotypes between isolates taken from soybeans and isolates taken from non-soybean host species.

The two isolates of Lineage 3 (Cr_G100, from *Gerbera hybrida*; Cr_Z102, from *Zantedeschia aethiopica* (see Fig. 1) lacked information from sequences of the *cfp* gene and thus were excluded from network analyses. Thus, the network of Lineage 3 remained identical to that obtained previously (Soares et al. 2015).

The network of Lineage 4 contained a feature that was absent from all previous networks: it contained three haplotypes (1, 7 and 8) that were shared among soybeans and non-soybean host species; these haplotypes were of high frequency. Within Lineage 4, most of haplotypes connect to the network through a single mutation step; the only exceptions were haplotypes 11 and 12, which were far more divergent than the other members. The remaining 13 haplotypes were found either on soybeans (depicted in black) or non-soybean host species (depicted in red). Most of these 13 haplotypes were of rare occurrence.

The network of Lineage 5 contained only two members (isolates 801, from *Zinnia* sp.; Arck_22, from soybeans). The central network placed Lineage 5 located half-way between Lineages 2 and 4.

3.4. Network of the mitochondrial *cyb* gene

Genealogical relationships based on the mitochondrial *cyb* gene region were calculated from 36 sequences from non-soybean isolates and 110 sequences from soybean isolates (obtained previously; Soares et al. 2015). In this network, the isolates were grouped into 18 mitochondrial haplotypes. Most mitochondrial haplotypes (10 out of 18) were shared by isolates originating from either soybean or non-soybean host species. Mitochondrial haplotypes tended to group according to their corresponding nuclear lineages. Isolates corresponding to lineages 1 and 2 were grouped in six haplotypes (A, B, C, M, N, and O) due to the presence of a homoplasy that arose due to the independent origin of the mutation G143A across the dataset. Most members of Lineage 3 grouped in haplotype D, except isolates Ck_A100 (haplotype M) e Cr_G100 (haplotype P). Isolates that belonged to Lineage 4 and 5 were distributed in haplotypes I, J, K, L, R, and Q. The network split haplotypes from non-soybean hosts according to geography; there was no sharing of hosts from Brazil and USA.

3.5. Cercosporin production assay

All isolates tested produced cercosporin in vitro; average concentrations ranged from 0.07 to 6.12 nmol/mL (Table S1). The cercosporin concentration (mean; min — max range; nmol/mL,) in each lineage was: Lineage 1 (3.65; 1.21 — 6.09), Lineage 2 (0.93; 0.21 — 1.74), Lineage 3 (0.43; 0.07 — 1.26), Lineage 4 (2.6; 0.24 — 7.87), Lineage 5 (3.51; 0.9 — 6.12). The highest cercosporin-producing isolate was 801 (6.12 nmol/mL; from Lineage 5), while the lowest cercosporin-producing isolate was Cr_G100 (0.07 nmol/mL, from Lineage 3). To compare mean cercosporin concentrations between isolates from non-soybean host species with isolates from soybeans, a t-test was performed with non homogeneous variances and the degrees of freedom were calculated with the formula of Welch-Satterthwaite ($df = 59.82$). The averages between groups were not significantly different ($P = 0.59$).

3.6. Presence of G143A and E198G point mutations

Two independent mutations (G143A, in *cyb*; E198G, in *tub*) conferring fungicide resistance were present (alone or in combination) in the genomes of several fungal isolates obtained from non-soybean and soybean hosts (Fig. 1). Overall, G143A occurred at a higher incidence (57% of the isolates) than did E198G (25%). Next, we compared the presence of a given mutation according to the host of origin (splitting hosts into two groups, either non-soybean host species or soybeans). The presence of G143A was more common in isolates from soybeans (53.8%) than isolates from non-soybean host species (44.4%). The mutation E198G followed a similar pattern, with isolates from soybeans containing a higher incidence (22.5%) than isolates from non-soybean host species (12.1%).

Subsequently, the association of G143A and E198G with genealogical lineages (Fig. 1) and haplotype networks (Fig. 3 and Fig. 4) was investigated. Overall, there were sharp differences among isolates from non-soybean host species.

For Lineage 2, the presence of both mutations followed a much more complex pattern. Mutation G143A was present in six isolates, four of which were obtained from ornamental species (such as *Dieffenbachia seguine*, *Eichhornia crassipes*, *Hibiscus* spp., and *Begonia* spp.; haplotypes 4, 5, 7, and 8 on Fig. 3). Mutation E198G was completely absent from non-soybean host species of Lineage 2. Two isolates of Lineage

2 (Ck_A110 and Ck_A119), both of which were obtained from soybeans, exhibited a double-resistant phenotype.

For Lineage 3, only two isolates were obtained from non-soybean host species. While Cr_G100 (from the ornamental species *Gerbera hybrida*) presented a double-resistant phenotype, Cr_Z102 (from the ornamental species *Zantedeschia aethiopica*) showed a double-susceptible phenotype. Only four polymorphic sites (concatenated sequences = 3,616 bp) distinguished Cr_G100 from Ck_A100 (a double-resistant isolate obtained from a soybean host), which raises the possibility those two host species exchanged the pathogen recently.

Lineage 4 contained the highest frequency of the double-resistant phenotype (Fig 1 and Fig. 4), both in soybeans and non-soybean host species. The weed species *Amaranthus palmeri* exhibited three (approximately 25%) double-resistant isolates and contained the highest frequency of G143A (Fig. 1).

4. DISCUSSION

The first experimental evidence indicating that multiple species of *Cercospora* caused CLB and PSS emerged very recently (Soares et al. 2015), and subsequent investigations confirmed those findings (Albu et al. 2016). These studies clearly demonstrate that *C. kikuchii* cannot be taken as the only pathogen associated with CLB and PSS. Herein, we investigated further multi-species arrangements associated with CLB and PSS, with emphasis on *Cercospora* spp. taken from non-soybean hosts. Our findings provided further insight regarding genealogical relationships underlying CLB- and PSS-causing *Cercospora* spp., and suggest that at least some members could be generalist plant pathogens that can be isolated from both soybeans and non-soybean host species.

The identity of *Cercospora* associated with CLB and PSS is likely complex and far from fully settled. In addition to the four genealogical lineages described previously (Soares et al. 2015), we identified a novel, undescribed fifth lineage. The finding of a new genealogical lineage of *Cercospora* associated with CLB and PSS is cause for concern, as it suggests the possibility of additional lineages yet to be identified. The complex pattern of multi-species arrangements and homoplastic symptoms seen in this pathosystem calls for re-evaluation of the belief that most species of *Cercospora* are strictly host-specific. It also illustrates the usefulness of multilocus phylogenetic approaches as a valuable tool in resolving cryptic species and species complexes among plant pathogenic fungi.

In this study, all *Cercospora* isolates obtained from soybeans and non-soybean host species produced cercosporin in vitro, albeit at varying levels. Cercosporin is a non-host-specific toxin (Fajola 1978) that is postulated to be important for *Cercospora* diseases on diverse hosts (Daub and Chung 2007), including CLB and PSS (Upchurch et al. 1991). Cercosporin production has been shown to be positively correlated (83%) with disease severity in soybeans (Almeida et al. 2005) and a similar trend may hold true during infection of non-soybean host species.

Homoplastic symptoms may have perpetuated the belief that *C. kikuchii* was the sole causal agent of CLB and PSS. It is possible that the long-held assumption of *C. kikuchii* as the single causal agent of CLB and PSS is derived from the high prevalence of this species in soybean fields at the time the disease was first described in Japan (Matsumoto and Tomoyasu 1925) and during increased cultivation of soybeans in the United States (Walters 1980). The absence of Lineage 1 (monophyletic for *C. kikuchii*)

from non-soybean host species suggests that the organism is host specific. Interestingly, most *Cercospora* isolates recently associated with CLB and PSS from Arkansas, Mississippi, Missouri, Kansas, and Louisiana are closely-related to either *C. cf. flagellaris* (Albu et al. 2016; Soares et al. 2015) or *C. cf. sigesbeckiae* (Albu et al. 2016). The near absence of *C. kikuchii* from these collections strongly points to lineage replacement as an efficient, ongoing process.

The remaining four genealogical lineages (Lineages 2 to 5) shared two important traits: a) their members were isolated from both soybeans and non-soybean host species, and b) these four lineages appear to comprise multiple species of *Cercospora*, which are postulated to form species complexes within each lineage. Our sampling of host species was small and likely not representative of the full host range of those four lineages; thus, we refrain from speculating further about host range and host overlap in each lineage, or species within each lineage.

At the moment, *C. cf. flagellaris* is the most frequently sampled member of Lineage 4. Our results showed many instances in which a haplotype obtained from a non-soybean host species joined the network through a haplotype found on soybeans (for instance, haplotypes 17 and 2; and 15 and 4; Lineage 4 on Fig. 3). Such pairwise relationships suggest that those haplotypes arose from a MRCA very recently. As the fungus is able to infect multiple host species, it is plausible that those haplotypes (or their MRCA) may have been passed along from one host species to another, including soybeans. Moreover, the network contained haplotypes that were shared between soybeans and non-soybean host species (haplotype 1, 7, and 8; Lineage 4 on Fig. 3). Overall, this network configuration indicates an active, ongoing process through which soybeans and non-soybean host species share *Cercospora* spp. Interestingly, *C. cf. flagellaris* is known to infect a broad range of hosts (reviewed in Groenewald et al. 2012), and has been isolated from soybeans grown in widely distant regions: Argentina (Soares et al. 2015), the United States (Albu et al. 2016; Soares et al. 2015), and Iran (Bakhshi et al. 2015).

The five lineages of *Cercospora* identified in this study were isolated from taxonomically diverse hosts, and multiple hosts were present within lineages 2-5. Two possible explanations are that members of these lineages have a innately broad host range, or alternatively, have adapted from soybean to alternative host plants, or vice versa; e.g., ‘host jumping.’ In this study, some of the non-soybean host species sampled were weeds - such as *Amaranthus palmeri*, *Galinsoga parviflora*, and *Siegesbeckia glabrescens* – that can potentially occur alongside soybeans in production agriculture.

The close physical proximity of these weeds to soybean would conceivably present opportunities for host range expansion in a single step through adaptation. However, some *Cercospora* isolates analyzed in this study were obtained from ornamental species — such as *Athyrium niponicum*, *Begonia* sp., *Christella dentata*, *Dieffenbachia seguine*, *Fuchsia hybrida*, *Gerbera hybrida*, *Hibiscus* sp., *Spathiphyllum wallisii*, *Tagetes* sp., *Xanthorrhiza simplicissima*, *Xanthosoma sagittifolium*, *Zantedeschia aethiopica*, and *Zinnia* sp. — and minor crop species — such as *Abelmoschus esculentus* and *Dioscorea bulbifera* — that are unlikely to be found in close proximity to most soybean fields. Thus, the grouping of *Cercospora* isolates from soybean and non-soybean hosts suggests either a lack of host specificity and/or the presence of as-yet undetermined cryptic species within each lineage.

Based on morphological criteria and host association (Cai et al. 2011; Chupp 1954; Goodwin et al. 2001; Groenewald et al. 2012), *Cercospora* isolated from symptomatic, necrotic leaf spots in the ornamental plant *Tagetes* sp. (isolate 704, from Brazil; isolate 804, from the United States) would likely be named after the host species. A similar rationale would apply to isolates obtained from *Begonia* sp. (isolates Cs_B100 and Cs_B101, from Brazil; Cs_B102, from the United States). Surprisingly, the phylogenetic placements of these isolates were unrelated to their host associations; instead the placements took place according to geography (Fig. 1 and 2). In Brazil, *Tagetes* sp. and *Begonia* sp. hosted *Cercospora* from Lineage 2; while in the United States, these two species hosted *Cercospora* from Lineage 4. In fact, all members of Lineage 4 (Fig. 1 and 4) were isolated from host species that had been sampled in the United States (soybeans, *Amaranthus palmeri*, *Athyrium niponicum*, *Begonia* sp., *Tagetes* sp. and *Xanthorrhiza simplicissima*). Meanwhile, all members of Lineage 2 (Fig. 1 and 4) were isolated from host species that had been sampled in Brazil (soybeans, *Abelmoschus esculentus*, *Begonia* sp., *Christella dentata*, *Dieffenbachia seguine*, *Dioscorea bulbifera*, *Eichhornia crassipes*, *Fuchsia hybrida*, *Galinsoga parviflora*, *Hibiscus* sp., *Siegesbeckia glabrescens*, *Spathiphyllum wallisii*, *Tagetes* sp., *Xanthosoma sagittifolium* and *Zantedeschia aethiopica*). The clear correspondence between geographic distribution and phylogenetic relationships reinforces our initial hypothesis that local soybean crops share pathogens with nearby non-soybean host species.

We initially postulated that *Cercospora* from non-soybean host species could display resistance to strobilurin and benzimidazole fungicides, as the pathogens could potentially move from soybeans to non-soybean host species locally. Indeed, non-

soybean species are hosts to pathogens with resistance to either strobilurins or benzimidazoles, or to both fungicides concomitantly. Mutation G143A — which confers resistance to strobilurins — displayed a much higher incidence than E198G — which confers resistance to benzimidazoles. Our findings are consistent with the recent finding that populations of *Cercospora* spp. associated with CLB and PSS in Louisiana, USA, display high rates of resistance to strobilurins and benzimidazoles (Price et al. 2015). Interestingly, evidence for multiple, independent origins of fungicide resistance obtained from haplotype network analyses contradicts the hypothesis that fungicide resistance emerged from a limited number of origins and was primarily dispersed throughout pathogen populations through cryptic sexual or parasexual reproduction.

The selective pressure owing to applications of site-specific chemical fungicides in soybeans certainly modulates fungicide tolerance in their pathogen populations. After resistant populations emerge on soybeans, they may move on to alternative, nearby non-soybean host species and retain the mutations we uncovered. The finding that *Amaranthus palmeri*, a glyphosate-resistant weed (Gaines et al. 2010), is an alternative host of *C. cf. flagellaris* in the United States should raise concerns of soybean producers and urge development of new disease management strategies. Non-soybean host species, especially weeds such as *Amaranthus palmeri*, can become a reservoir and produce inoculum of fungicide-resistant populations of CLB- and PSS-causing *Cercospora* to re-infect soybean crops on nearby soybean fields.

5. REFERENCES

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th ed ed. Academic Press, New York.
- Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of maximum likelihood principle. Pages 267-281 in: Second International Symposium on Information Theory. B. N. Petrov and F. Csaki, eds. Akademiai Kiado, Budapest.
- Albu, S., Schneider, R. W., Price, P. P., Doyle, V. P. 2016. *Cercospora* cf. *flagellaris* and *C. cf. sigesbeckiae* are associated with *Cercospora* leaf blight and purple seed stain on soybean in North America. *Phytopathology* 106:1376-1385.
- Almeida, A. M. R., Piuga, F. F., Marin, S. R. R., Binneck, E., Sartori, F., Costamilan, L. M., Teixeira, M. R. O., Lopes, M. 2005. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatol. Bras.* 30:594-602.
- Bakhshi, M., Arzanlou, M., Babai-ahari, A., Groenewald, J. Z., Braun, U., Crous, P. W. 2015. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. *Persoonia* 34:65-86.
- Bandelt, H. J., Forster, P., Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48.
- Bolton, M. D., Rivera, V., Secor, G. 2013. Identification of the G143A mutation associated with QoI resistance in *Cercospora beticola* field isolates from Michigan, United States. *Pest Manag. Sci.* 69:35-39.
- Cai, G., and Schneider, R. W. 2008. Population structure of *Cercospora kikuchii*, the causal agent of cercospora leaf blight and purple seed stain in soybean. *Phytopathology* 98:823-829.
- Cai, L., Giraud, T., Zhang, N., Begerow, D., Cai, G., Shivas, R. G. 2011. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. *Fungal Divers.* 50:121-133.
- Chand, R., Kumar, P., Singh, V., Pal, C. 2013. Technique for spore production in *Cercospora canescens*. *Indian Phytopathol.* 66:159-163.
- Chupp, C. 1954. A monograph of the fungus genus *Cercospora*. The Ronald Press, New York.

- Cooperman, C. J., Jenkins, S. F. 1986. Conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora asparagi* and *Cercospora* blight development in *Asparagus*. *Phytopathology* 76:617-622.
- Crous, P. W., Braun, U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht.
- Daub, M.E., and Chung, K-R. 2007. Cercosporin: A Phytoactivated Toxin in Plant Disease. Online. APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeature/2007-0207.
- Daub, M. E., Herrero, S., Chung, K. R. 2005. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *Fems Microbiol. Lett.* 252:197-206.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29:1969-1973.
- Dorrance, A. E., Draper, M. A., Hershman, D. E. 2007. Using foliar fungicides to manage soybean rust. USDA, United States of America.
- Fajola, A. O. 1978. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. *Physiol. Plant Pathol.* 13:157-164.
- Fresenius, G. 1863. *Beiträge zur Ökologie* 3. Heinrich Ludwig Brommer Verlag, Frankfurt, German.
- Gaines, T. A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S. T., Shaner, D. L., Nissen, S. J., Patzoldt, W. L., Tranel, P. J., Culpepper, A. S., Grey, T. L., Webster, T. M., Vencill, W. K., Sammons, R. D., Jiang, J., Preston, C., Leach, J. E., Westra, P. 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *PNAS* 107:1029-1034.
- Goodwin, S. B., Dunkle, L. D., Zismann, V. L. 2001. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91:648-658.
- Groenewald, J. Z., Nakashima, C., Nishikawa, J., Shin, H. D., Park, J. H., Jama, A. N., Groenewald, M., Braun, U., Crous, P. W. 2012. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Stud. Mycol.* 75:115-170.
- Groenewald, M., Groenewald, J. Z., Braun, U., Crous, P. W. 2006. Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola* and description of *C. apiicola*, a novel species from celery. *Mycologia* 98:275-285.

- Hartman, G. L., Sinclair, J. B., Rupe, J. C. 1999. Compendium of soybean diseases. APS Press, Saint Paul, USA.
- Imazaki, I., Iizumi, H., Ishikawa, K., Sasahara, M., Yasuda, N., Koizumi, S. 2006. Effects of thiophanate-methyl and azoxystrobin on the composition of *Cercospora kikuchii* populations with thiophanate-methyl-resistant strains. J. Gen. Plant Pathol. 72:292-300.
- Jenns, A. E., Daub, M. E., Upchurch, R. G. 1989. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. Phytopathology 79:213-219.
- Matsumoto, T., and Tomoyasu, R. 1925. Studies on the purple speck of soybean seed. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 1:1-14.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Obuya, J. O., and Franc, G. D. 2016. Molecular analysis of *Cercospora beticola* isolates for strobilurin resistance from the central high plains, USA. Eur. J. Plant Pathol.:1-11.
- Paul, P. A., and Munkvold, G. P. 2005. Influence of temperature and relative humidity on sporulation of *Cercospora zeae-maydis* and expansion of gray leaf spot lesions on maize leaves. Plant Dis. 89:624-630.
- Pollack, F. G. 1987. An annotated compilation of *Cercospora* names. Mycol. Mem. 12:1-212.
- Price, P. P, Purvis, M. A., Cai, G., Padgett, G. B., Robertson, C. L., Schneider, R. W. 2015. Fungicide Resistance in *Cercospora kikuchii*, a soybean pathogen. Plant Dis. 99: 1596-1603.
- Quaedvlieg, W., Binder, M., Groenewald, J. Z., Summerell, B. A., Carnegie, A. J., Burgess, T. I., Crous, P. W. 2014. Introducing the consolidated species concept to resolve species in the Teratosphaeriaceae. Persoonia 33:1-40.
- Ronquist, F., and Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572-1574.
- Rosenzweig, N., Hanson, L. E., Clark, G., Franc, G. D., Stump, W. L., Jiang, Q. W., Stewart, J., Kirk, W. W. 2014. Use of PCR-RFLP analysis to monitor fungicide

- resistance in *Cercospora beticola* populations from sugarbeet (*Beta vulgaris*) in Michigan, United States. *Plant Dis.* 99:355-362.
- Smith, D., and Onions, A. H. S. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. CAB International, Wallingford, UK.
- Soares, A. P. G., Guillin, E. A., Borges, L. L., Silva, A. C. T., Almeida, A. M. R., Grijalba, P. E., Gottlieb, A. M., Bluhm, B. H., Oliveira, L. O. 2015. More *Cercospora* species infect soybeans across the americas than meets the eye. *PloS One* 10:e0133495.
- Taylor, J. W., and Fisher, M. C. 2003. Fungal multilocus sequence typing — it's not just for bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:351-356.
- Team, R. C. 2016. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria.
- Upchurch, R. G., Ehrenshaft, M., Walker, D. C., Sanders, L. A. 1991. Genetic-transformation system for the fungal soybean pathogen *Cercospora kikuchii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2935-2939.
- Walters, H. J. 1980. Soybean leaf blight caused by *Cercospora kikuchii*. *Plant Dis.* 64:961-962.

6. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Collection details and GenBank accession numbers of the isolates included in this study.

Isolate code	Lineage	Host plant	Family	Sampling location	Cercosporin content ¹	GenBank accession number ²							
						act	cal	his	ITS	tef	cfp	tub	cyb
Ck_170	1	Glycine max	Fabaceae	São Carlos do Ivaí-PR	6.09±0.32	KP860254	KP825122	KP825139	KP776655	KP825158	KP752255	KP752362	KP825081
Ck_482	1	Glycine max	Fabaceae	Barreiras-BA	1.21±0.09	KP860256	KP825124	KP825141	KP776657	KP825160	KP752257	KP752364	KP825083
702	2	Xanthosoma sagittifolium	Araceae	Viçosa-MG	1.10±0.26	KX507265	KX522762	KX522796	KX451232	KX522833	KX522868	KX530882	KX522903
703	2	Galinsoga parviflora	Asteraceae	Viçosa-MG	0.21±0.11	KX507266	KX522763	KX522797	KX451233	KX522834	KX522869	KX530883	KX522904
704	2	Tagetes sp.	Asteraceae	Viçosa-MG	1.74±0.18	KX507267	KX522764	KX522798	KX451234	KX522835	KX522870	KX530884	KX522905
705	2	Eichhornia crassipes	Pontederiaceae	Viçosa-MG	1.72±0.47	KX507268	KX522765	KX522799	KX451235	---	KX522871	KX530885	KX522906
706	2	Dioscorea bulbifera	Dioscoreacea	Viçosa-MG	0.31±0.04	KX507269	KX522766	KX522800	KX451236	KX522836	KX522872	KX530886	KX522907
707	2	Fuchsia hybrida	Onagraceae	Viçosa-MG	0.74±0.09	KX507270	KX522767	KX522801	KX451237	KX522837	KX522873	KX530887	KX522908
708	2	Christella dentata	Thelypteridaceae	Viçosa-MG	0.14±0.09	KX507271	KX522768	KX522802	KX451238	KX522838	KX522874	KX530888	KX522909
709	2	Spathiphyllum wallisii	Araceae	Viçosa-MG	1.44±0.18	KX507272	KX522769	KX522803	KX451239	---	KX522875	KX530889	KX522910
712	2	Sigesbeckia glabrescens	Asteraceae	Viçosa-MG	0.31±0.01	---	KX522770	KX522804	KX451240	KX522839	KX522876	KX530890	KX522911
714	2	Hibiscus sp.	Malvaceae	Viçosa-MG	1.61±0.08	---	KX522771	KX522805	KX451241	KX522840	KX522877	KX530891	KX522912
715	2	Abelmoschus esculentus	Malvaceae	Viçosa-MG	1.28±0.23	KX507273	KX522772	KX522806	KX451242	KX522841	KX522878	KX530892	KX522913

¹Expressed in nmol/mL ± standard deviation. ²act, actin; cal, calmodulina; his, histone H3; ITS, internal transcribed spacer and intervening 5.8S nrDNA; tef, translation elongation factor 1-alpha; cfp, cercosporin facilitator protein; and tub, β-tubulin. ND=Not determined.

Table S1. Continued.

Isolate code	Lineage	Host plant	Family	Sampling location	Cercosporin content ¹	GenBank accession number ²							
						act	cal	his	ITS	tef	cfp	tub	cyb
716	2	Dieffenbachia seguine	Araceae	Viçosa-MG	1.36±0.06	KX507274	KX522773	KX522807	KX451243	KX522842	KX522879	KX530893	KX522914
Cr_Z100	2	Zantedeschia aethiopica	Araceae	Viçosa-MG	ND	KX507275	KX522774	KX522808	KX451244	KX522843	KX522880	KX530894	KX522915
Cr_Z103	2	Zantedeschia aethiopica	Araceae	Viçosa-MG	0.54±0.03	KX507276	KX522775	KX522809	KX451245	KX522844	KX522881	KX530895	KX522916
Cs_B100	2	Begonia sp.	Begoniaceae	Viçosa-MG	0.08±0.03	KX507277	KX522776	KX522810	KX451246	KX522845	KX522882	KX530896	KX522917
Cs_B101	2	Begonia sp.	Begoniaceae	Araújos-MG	1.47±0.20	KX507278	---	KX522811	KX451247	KX522846	KX522883	KX530897	KX522918
Cr_Z102	3	Zantedeschia aethiopica	Araceae	Ouro Preto-MG	1.26±0.13	KX507279	---	KX522812	KX451248	KX522847	---	KX530898	KX522919
Cr_G100	3	Gerbera hybrida	Asteraceae	Viçosa-MG	0.07±0.02	KX507280	---	KX522813	KX451249	KX522848	---	KX530899	KX522920
Ck_646	3	Glycine max	Fabaceae	Carazinho-RS	ND	KP860258	KP825126	KP825143	KP776659	KP825161	KP752259	KP752371	KP825085
Ck_654	3	Glycine max	Fabaceae	Fortaleza dos Vales-RS	0.25±0.08	KP860259	KP825127	KP825144	KP776660	KP825162	KP752260	KP752372	KP825086
Ck_666	3	Glycine max	Fabaceae	Campos Novos-SC	0.13±0.02	KP860260	---	KP825145	KP776661	KP825163	KP752261	KP752373	KP825087
Cs_B102	4	Begonia sp.	Begoniaceae	Fayetteville-AR	0.24±0.11	KX507281	KX522777	KX522814	KX451250	KX522849	KX522884	KX530900	KX522921
802	4	Xanthorhiza simplicissima	Ranunculaceae	Fayetteville-AR	1.04±0.17	KX507282	KX522778	KX522815	KX451251	KX522850	KX522885	KX530901	KX522922
804	4	Tagetes sp.	Asteraceae	Fayetteville-Ar	5.54±0.03	KX507283	KX522779	KX522816	KX451252	KX522851	KX522886	KX530902	KX522923
808	4	Athyrium niponicum	Athyriaceae	Fayetteville-AR	7.87±0.09	KX507284	KX522780	KX522817	KX451253	KX522852	KX522887	KX530903	KX522924
AM_1	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	4.41±0.09	KX507285	KX522781	KX522818	KX451254	KX522853	KX522888	KX530904	KX522925
AM_2	4	Amaranthus palemeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	1.85±0.15	KX507286	KX522782	KX522819	KX451255	KX522854	KX522889	KX530905	KX522926
AM_3	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	2.33±0.13	KX507287	KX522783	KX522820	KX451256	KX522855	KX522890	KX530906	KX522927
AM_4	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	2.07±0.1	KX507288	KX522784	KX522821	KX451257	KX522856	KX522891	KX530907	KX522928

¹Expressed in nmol/mL ± standard deviation. ²act, actin; cal, calmodulina; his, histone H3; ITS, internal transcribed spacer and intervening 5.8S nrDNA; tef, translation elongation factor 1-alpha; cfp, cercosporin facilitator protein; and tub, β-tubulin. ND=Not determined.

Table S1. Continued.

Isolate code	Lineage	Host plant	Family	Sampling location	Cercosporin content ¹	GenBank accession number ²							
						act	cal	his	ITS	tef	cfp	tub	cyb
AM_5	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	3.92±0.17	KX507289	KX522785	KX522822	KX451258	KX522857	KX522892	KX530908	KX522929
AM_6	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	1.34±0.02	KX507290	KX522786	KX522823	KX451259	KX522858	KX522893	KX530909	KX522930
AM_7	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	0.30±0.07	KX507291	KX522787	KX522824	KX451260	KX522859	KX522894	KX530910	KX522931
AM_8	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	1.44±0.04	KX507292	KX522788	KX522825	KX451261	KX522860	KX522895	KX530911	KX522932
AM_9	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	1.9±0.07	KX507293	KX522789	KX522826	KX451262	KX522861	KX522896	KX530912	KX522933
AM_10	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	2.96±0.18	KX507294	KX522790	KX522827	KX451263	KX522862	KX522897	KX530913	KX522934
AM_11	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	5.24±0.13	KX507295	KX522791	KX522828	KX451264	KX522863	KX522898	KX530914	KX522935
AM_12	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Rohwer-AR	1.75±0.09	KX507296	KX522792	KX522829	KX451265	KX522864	KX522899	KX530915	KX522936
AM_13	4	Amaranthus palmeri	Amaranthaceae	Kibler-AR	0.80±0.22	KX507297	KX522793	KX522830	KX451266	KX522865	KX522900	KX530916	KX522937
Arck_02	4	Glycine max	Fabaceae	Dewitt-AR	1.02±0.05	KP860265	KP860270	KP860276	KP776666	KP860282	KP752268	KP825003	KP825108
Arck_07	4	Glycine max	Fabaceae	Rohwer-AR	3.48±0.16	KP860268	KP860273	KP860279	KP776669	KP860285	KP752273	KP825006	KP825111
801	5	Zinnia sp.	Asteraceae	Fayetteville-AR	6.12±0.30	KX507298	KX522794	KX522831	KX451267	KX522866	KX522901	KX530917	KX522938
Arck_22	5	Glycine max	Fabaceae	Arkansas City-KS	0.9±0.18	---	KX522795	KX522832	KX451268	KX522867	KX522902	KX530918	KX522939

¹Expressed in nmol/mL ± standard deviation. ²act, actin; cal, calmodulina; his, histone H3; ITS, internal transcribed spacer and intervening 5.8S nrDNA; tef, translation elongation factor 1-alpha; cfp, cercosporin facilitator protein; and tub, β-tubulin. ND=Not determined.

CAPÍTULO 2

LINHAGENS GENEALÓGICAS DE CERCOSPORA ASSOCIADAS AO CRESTAMENTO FOLIAR E MANCHA PÚRPURA DA SEMENTE NA SOJA: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E NOS ÓRGÃOS DA PLANTA

1. INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Cercospora* são cosmopolitas e causadoras de manchas foliares e lesões necróticas numa ampla gama de hospedeiros (Goodwin et al. 2012; Groenewald et al. 2013). O gênero *Cercospora* foi descrito por Fresenius (Fuckel 1863) e várias espécies foram descritas posteriormente (Chupp 1954). Mais de 3000 espécies de *Cercospora* já foram relatadas (Pollack 1987), porém somente 659 são reconhecidas oficialmente, juntamente com 281 espécies morfológicamente indistinguíveis referidas como *C. apii* sensu lato (Crous e Braun 2003).

Desde a descrição do gênero no século XIX, a taxonomia dessas espécies é baseada em características morfológicas inconspícuas como a morfologia de conídios, conidióforos, dentre outras estruturas (Goodwin et al. 2001). A variação intraespecífica e a ausência de um conjunto concreto de características morfológicas que pudesse ser usado na identificação de novas espécies, faz com que a classificação seja baseada no hospedeiro no qual a espécie foi identificada (Chupp 1954; Goodwin et al. 2001; Groenewald et al. 2013). Experimentos de inoculação artificial mostraram que a adoção do critério da especificidade de hospedeiro pode levar a um erro de identificação de *Cercospora* spp. (Groenewald et al. 2006; Groenewald et al. 2013; Bakhshi et al. 2015).

O crestamento foliar de *Cercospora* (CFC) e a mancha púrpura da semente (MPS) na soja (*Glycine max* L. Merrill) são historicamente associadas ao fungo necrotrófico *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) M. W. Gardner (Gardner 1925; Matsumoto e Tomoyasu 1925). A mancha púrpura foi descrita primeiramente em 1921 na Coreia (Suzuki 1921) e em 1924 nos Estados Unidos (Gardner 1925).

O CFC pode causar perdas substanciais na produção, principalmente pela desfolha prematura (Walters 1980). A MPS afeta a qualidade dos grãos, o que ocasiona a morte das plântulas reduzindo o estande de germinação (Hartman et al. 1999). As duas doenças, em condições favoráveis, podem causar perdas na produção de até 30% (Almeida et al. 2005a).

As folhas expostas ao sol assumem aspecto coriáceo com lesões de coloração vermelho arroxeada que coalescem causando necrose e desfolha prematura (Walters 1980). Nas sementes, os sintomas são facilmente reconhecidos pela cor arroxeada nos tecidos superficiais e pequenas fissuras no tegumento que apresenta aspecto áspero e sem brilho (Lehman 1950). Além das folhas e sementes, o patógeno também pode causar lesões nas vagens, pecíolos e hastes (Lehman 1950; Murakishi 1951).

As sementes são um importante veículo de dispersão do patógeno, uma vez que os sintomas típicos da mancha púrpura das sementes podem nem sempre estarem presentes (Hartman et al. 1999). A dispersão dos conídios pelo vento também tem papel importante na epidemiologia, sendo que temperaturas entre 20 e 24 °C e umidade relativa acima de 80% aumentam a incidência das doenças (Kudo et al. 2011).

A utilização de cultivares de soja resistentes é a forma mais econômica e segura para o controle do CFC e a MPS (Alloatti et al. 2015). Até o momento, somente a cultivar SJ.2 (Srisombun e Supapornhemin, 1993) e a PI 80837 (Wilcox et al. 1975) foram relatadas como fontes de resistência. Estudos de mapeamento mostraram que a resistência a MPS e CFC é condicionada por um único gene com alelo dominante localizado no cromossomo 18 de *G. max* (Jackson et al. 2006; Jackson et al. 2008).

Estudos de filogenia molecular multigênica mostraram que as duas doenças são causadas por múltiplas espécies de *Cercospora* (Bakhshi et al. 2015; Soares et al. 2015; Albu et al. 2016). Soares et al. (2015), utilizando isolados de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS do Brasil, Argentina e EUA, demonstraram a existência de quatro linhagens de *Cercospora* causadoras do CFC e MPS. Uma quinta linhagem restrita aos EUA, também foi descrita recentemente (Borges et al. 2016, dados não publicados). Além de *C. kikuchii*, as espécies *C. alchemillicola*, *C. sp. P* e *Q* que fazem parte do complexo *C. apii*, também foram descritas como causadoras das doenças no Brasil e Argentina. Nos EUA, duas espécies generalistas, *C. cf. flagellaris* e *C. cf. sigesbeckiae* causam CFC e MPS (Soares et al. 2015; Albu et al. 2016). *Cercospora cf. flagellaris* também foi encontrada no Irã (Bakhshi et al. 2015) e Argentina (Soares et al. 2015).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição das linhagens de *Cercospora* nas regiões produtoras de soja do Brasil e dois estados dos EUA e responder as seguintes questões: i) Qual o número de linhagens de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS existentes no Brasil? ii) Qual a distribuição geográfica dessas linhagens? iii) Qual a genealogia dessas linhagens? iv) Os mesmos haplótipos são encontrados em folha, semente, vagem e caule?

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem e isolamento

Plantas de soja da safra 2013/2014, apresentando sintomas típicos do CFC e MPS foram coletadas nos municípios de Passo Fundo-RS, Londrina-PR, Rio Negro-PR, Canoinhas-SC, Mafra-SC, São Desidério-BA, Correntina-BA, Formosa do Rio Preto-BA, Uberlândia-MG, Brasília-DF e Alta Floresta-MT, totalizando 11 cidades em sete estados do Brasil. Na safra de 2015, também foram coletadas plantas com sintomas do CFC e MPS nas cidades de Fayetteville, Kibler e Rohwer, Arkansas, EUA. Cinco isolados de *Cercospora* da coleção do Molecular Plant Pathology/Micotoxycology Laboratory da University of Arkansas obtidos de soja em 1999 em West Lafayette, Indiana, EUA, foram utilizados nos estudos.

Sementes e fragmentos de folhas, caule e vagens foram lavados sequencialmente em etanol 70% (v/v) por 40 s, hipoclorito de sódio 1,0% (v/v) por 40 s e enxaguados em água destilada esterilizada. As sementes e os fragmentos foram colocados em câmara úmida por 3-4 dias a $26 \pm 0,5$ °C para induzir a esporulação. Sob microscópio estereoscópico (Olympus SZ-40, Tóquio, Japão), as lesões nos tecidos foram avaliadas e conídios típicos *Cercospora* spp. foram coletados com o auxílio de uma agulha e espalhados com água sobre uma placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL). Após cerca de 30 min, as placas foram analisadas novamente sob microscópio estereoscópico para que um pequeno pedaço do meio de cultura contendo somente um conídio fosse coletado com uma agulha e transferido para uma nova placa para constituir um novo isolado monospórico. Os isolados monospóricos foram mantidos em meio BDA e a $26 \pm 0,5$ °C e fotoperíodo de 12 h. Todos os isolados estão preservados em glicerol 30% (v/v) a -80 °C e papeis desidratados em sílica gel (Smith e Onions 1994).

2.2. Extração do DNA e reações de amplificação

A extração do DNA genômico foi realizada pelo método CTAB conforme protocolo sugerido por Doyle e Doyle (1990) com poucas modificações. Colônias foram cultivadas em meio BDA por 10 dias sob fotoperíodo de 12 h. Cerca de 200 mg de micélio foram coletadas e pulverizadas com nitrogênio líquido com pistilo em cadinho de porcelana. O micélio macerado foi transferido para microtubos de 2,0 mL e tratado

com tampão de extração contendo: CTAB 2% (m/v), NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8,0, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e β -mercaptoetanol 1% (v/v). Os tubos foram incubados por uma hora a 65 °C e em seguida centrifugados a 3380 x g por 15 min. A fase aquosa foi transferida para novos tubos e tratada com uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v) e os tubos foram centrifugados (3380 x g por 15 min). A fase aquosa foi transferida para novos tubos e uma nova etapa com o clorofórmio/álcool isoamílico foi realizada nas mesmas condições. Os ácidos nucleicos foram precipitados com o mesmo volume de isopropanol e lavados uma vez com etanol 70% (v/v) e outra com etanol 95% (v/v). Os ácidos nucleicos foram solubilizados em 50 μ L de tampão TE (10 mM Tris HCl e 1 mM EDTA) e o RNA foi degradado utilizando RNase A (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) na concentração final de 40 ng/ μ L. A concentração do DNA foi determinada usando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) e eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) (Sambrock et al. 1989). O DNA foi armazenado a -20°C para uso subsequente.

A amplificação dos sítios alvo foi realizada via reação em cadeia da polimerase (PCR) para os genes nucleares: actina (act), calmodulina (cal), cercosporin facilitator protein (cfp), histona (his), espaçador transcrito interno (ITS), minichromosome maintenance complex component 7 (mcm7), translation elongation factor (tef), β -tubulina (tub), juntamente como o gene mitocondrial citocromo B (cyb). Para a β -tubulina, foram amplificadas duas porções do gene que não se sobrepõem sendo referidas como tub-1 e tub-2.

Para a amplificação do gene mcm7, inicialmente foram utilizados os primers MCM7_709F e MCM7_1348R (Schmitt et al. 2009). Todavia, devido à baixa intensidade das bandas no gel, novos primers foram desenhados com base na sequência do gene MCM7 de *C. soja*, *C. cf. flagellaris*, *C. zeina* e *C. zeae-maydis* (Grigoriev et al. 2012). As sequências do gene MCM7 das espécies mencionadas anteriormente foram importadas e alinhadas no programa Sequencher v.4.8 (Genes Codes corp., Ann Arbor, MI, EUA) e o programa Primer3 (Rozen e Skaletsky 2000) foi utilizado para desenhar os primers Cerc_MCM7_F1 (5'-CCNCTGCTACCTCGNCCAG-3') e Cerc_MCM7_R1 (5'-TCAGGTCCGNGGTGAGCATC-3'). Para a amplificação do fragmento do gene CFP dos isolados obtidos nos EUA, os primers F1771/R2706 e CFP_F1/CFP_R1 (SOARES et al., 2015) não amplificaram o sítio alvo e os primers CFP_F5 (5'-CACTTTATGCTGGGCTGGTTGG-3') e CFP_R5 (5'-GCTTGTGCCCCGCTGGAATCTGA-3') foram desenhados utilizando sequências do

gene *cfp* das mesmas espécies e condições usadas para o desenho dos primers do gene *MCM7*. Todos os primers utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela S1.

As amostras foram amplificadas utilizando o termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), num volume final de 25 µL contendo os reagentes nas seguintes concentrações: (60 mM de Tris, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 3% glicerol, 0,5% Tween-20, pH 9), 0,2 mM de cada dNTP (Promega, Madison, WI, EUA), 2 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada primer (IDT Technologies, Coralville, IA, EUA), 40 ng de DNA e 1,25 unidades de GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). Os ciclos de amplificação foram: 94 °C por 3 min.; 30 ciclos compostos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento dos primers a 51-58 °C (Tabela S1) por 30 s e extensão final a 72 °C por 7 min.

Os produtos da PCR obtidos foram separados por eletroforese a 90 V por 1 h em gel de agarose 1% (m/v) contendo Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega) em tampão TBE 1X (500 mM Tris-HCl, 60 mM ácido bórico e 83 mM EDTA) e somente um único fragmento foi visualizado sob luz UV. Os produtos da PCR foram enviados para a empresa Beckman-Coulter Genomics (Danvers, MA, EUA) para purificação por imobilização em fase sólida reversível (Deangelis et al. 1995) e sequenciados pelo método de Sanger (Sanger et al. 1977) utilizando kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) no sequenciador PRISM 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.3. Alinhamento das sequências e montagem dos bancos de dados

O alinhamento das sequências foi realizado no programa Sequencher versão 4.8 (Genes Codes). Intervalos entre os nucleotídeos foram inseridos para compensar a presença de inserções e deleções de bases. Para o gene da β-tubulina, os fragmentos *tub-1* e *tub-2* foram concatenados gerando um fragmento final de 1197 pb. A edição foi finalizada com o corte das extremidades para eliminar fragmentos que não foram obtidos para todas as sequências. No alinhamento do fragmento do gene *CFP* foi utilizado o programa MAFFT v. 7 usando a estratégia G-INS-1, permitindo a inserção de intervalos no nível 0,6 (Katoh et al. 2005).

As relações filogenéticas entre os isolados foi inferida por filogenia Bayesiana utilizando o banco de dados 1 (N = 76; 4591 pb), criado a partir da concatenação de oito genes nucleares (*act*, *cal*, *his*, *ITS*, *tef*, *cfp*, *tub* e *mcm7*) contendo isolados provenientes do Brasil (N = 28) e EUA (N = 41), um isolado de *C. soja* e cinco sequências usadas

como referência das cinco linhagens previamente descritas de *Cercospora* causadoras de CLB e PSS (Soares et al., 2015; Borges et al. 2016, dados não publicados). As sequências utilizadas como referência foram: Ckik_CPC_5068, linhagem 1; Ck_A110, linhagem 2; Ck_654, linhagem 3; Arck 07, linhagem 4; Arck 22, linhagem 5. O banco de dados ainda possui o isolado CPC_11557, espécie tipo de *C. beticola*, como grupo externo da filogenia.

Para explorar as relações filogenéticas com outras espécies de *Cercospora* foi criado o banco de dados 2 (N = 91; 1861 pb) a partir da concatenação de cinco genes nucleares (act, cal, his, ITS e tef). O banco de dados possui isolados do Brasil (N=28) e EUA (N = 41) e um isolado de *C. sojina*. Outras 16 espécies de *Cercospora* incluídas neste banco de dados foram obtidas do trabalho realizado por Groenewald et al. (2013).

A genealogia das linhagens foi realizada com um banco de dados 3 (N = 323, 2927 pb) formado a partir de quatro genes nucleares concatenados (cfp, tub, MCM7 e ITS). Quinze isolados foram removidos dessa análise por serem recombinantes entre as linhagens 2 e 3 e causarem homoplasia na rede. Para o gene cfp, somente os éxons foram utilizados e sítios polimórficos com três ou quatro bases foram removidos.

Após a obtenção da rede com a relação entre as linhagens e identificar a linhagem a qual cada isolado pertence, foram montados sete bancos de dados diferentes com quatro genes nucleares concatenados (cfp, tub, mcm7 e ITS). Os sete bancos de dados adicionais criados foram: linhagem 1 (banco de dados 4, N = 18, 3183 pb); linhagem 2 (banco de dados 5, N = 164, 3187 pb); linhagem 3 (banco de dados 6, N = 61, 3188 pb); linhagem 4 (banco de dados 7, N = 43, 3182 pb); linhagem 5 (banco de dados 8, N = 16, 3182 pb); linhagem 6 (banco de dados 9, N = 7, 3180 pb); linhagem 7 (banco de dados 10, N = 3, 3182). O banco de dados 11 (N = 334, 653 pb) contém o fragmento do gene mitocondrial citocromo B. Por fim, a partir da fragmentação do banco de dados 5, foram criados os bancos de dados 12 (N = 31, 3187 pb), 13 (N = 13, 3187 pb), 14 (N = 93, 3187 pb) e 15 (N = 27, 3187 pb), para realização da análise de recombinação.

2.4. Análise filogenética Bayesiana

Os bancos de dados 1 e 2 foram divididos em oito e cinco subconjuntos, respectivamente, correspondendo a cada um dos genes nucleares e esses subconjuntos foram introduzidos independentemente no programa MRMODELTEST v.2.3 (Nylander 2004). Para cada subconjunto gênico, o critério de informação de Akaike (Akaike 1973)

foi utilizado para identificar qual o modelo de evolução mais adequado dentre os 24 modelos de evolução molecular disponíveis. Para o banco de dados 1, os modelos de evolução adotados foram: SYM+G (act), GTR+I (cal), HKY+I (his e tef), K80 (ITS), HKY+I (cfp), GTR+I+G (tub), SYM+I (mcm7). Para o banco de dados 2 os modelos de evolução adotados foram: GTR+G (act e cal), GTR+I+G (his), SYM+I (ITS) e GTR+I+G (tef).

As relações filogenéticas foram inferidas por filogenia Bayesiana numa análise particionada baseada nos modelos de evolução molecular escolhidos no programa MRBAYES v.3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck 2003). A análise foi realizada utilizando duas corridas simultâneas com cinco milhões de gerações cada, sendo uma cadeia fria e sete cadeias quentes em cada corrida. O parâmetro de temperatura foi ajustado para 0,25. Em cada análise, árvores foram amostradas a cada 5000 gerações e as primeiras 250 árvores foram descartadas. A convergência foi diagnosticada pela divergência nos desvios padrão das duas corridas (menor que 0,01) e pelo tamanho amostral de cada parâmetro analisado no programa Tracer v.1.6 (Drummond et al. 2012). Após o descarte dos primeiros 25% dos dados, o restante foi utilizado para gerar os valores finais dos parâmetros, dentre eles, a árvore de consenso e a probabilidade posterior dos clados. O programa Figtree v.1.3.1 foi utilizado para visualização da árvore filogenética consenso (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.5. Análise de rede

A genealogia dos genes foi predita utilizando o algoritmo Median-joining (Bandelt et al. 1999) implementado no programa NETWORK 5.0 (Fluxus Technology Ltd). A análise foi realizada nos bancos de dados 3-11; as inserções e deleções (indels) foram consideradas como um quinto estado e cada indel, independentemente do tamanho, foi considerado como uma única mutação.

2.6. Índices de diversidade molecular e teste de neutralidade

Os índices de diversidade molecular como o número de sítios polimórficos (S), número de sítios parcimoniamente informativos, número de singletons, número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (H_d), diversidade nucleotídica (P_i), número médio de diferenças nucleotídicas (K) e o teste D de Tajima foram calculados usando o programa DnaSP v.5.10.01 (Librado e Rozas 2009). As análises foram realizadas nos

bancos de dados 4-10, correspondentes a cada uma das sete linhagens encontradas; banco de dados 12, contendo os 15 isolados recombinantes; banco de dados 13, contendo os sete isolados posicionados entre as linhagens; banco de dados 14, contendo todos os isolados do estudo, exceto os recombinantes e interlinhagem.

2.7. Análise de recombinação

As análises de recombinação foram realizadas no programa RDP4 v.4.56 (Martin et al. 2015). Como entrada foram utilizados os bancos de dados 4-15 e análise exploratória completa com a configuração padrão do programa utilizando os métodos RDP (Martin e Rybicki 2000), GENECONV (Padidam et al. 1999), MaxChi (Smith 1992), BootScan (Salminen et al. 1995), SiScan (Gibbs et al. 2000), para analisar os eventos de recombinação.

3. RESULTADOS

3.1. Material genético

Para acessar o número de linhagens, sua distribuição geográfica e diversidade quanto à origem do órgão da planta, foram coletados isolados de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS de onze cidades brasileiras e quatro cidades nos EUA. No total foram coletados 329 isolados, sendo 259 coletados no Brasil e 70 nos EUA (Tabela 1). O maior número de isolados obtidos foi de folha com 104 isolados e o menor de vagem com 70 isolados. A cidade com maior número de isolados coletados foi Passo Fundo – RS, com 44 isolados e o menor número foi coletado em Canoinhas – SC e Rio Negro – PR, com apenas dois isolados em cada. A relação completa de todos os isolados utilizados neste trabalho está descrita na Tabela S2.

Tabela 1. Descrição dos locais de coleta, número de isolados de cada órgão da planta e número total de isolados.

Local de coleta	Órgão da Planta				Nº de isolados
	Semente	Folha	Vagem	Caule	
Brasil					
Alta Floresta – MT	9	7	7	7	30
Brasília – DF	5	2	9	7	23
Canoinhas – SC	-	1	-	1	2
Formosa do Rio Preto – BA	5	6	6	7	24
Londrina – PR	11	9	8	8	36
Mafra – SC	3	2	5	5	15
Passo Fundo – RS	9	11	11	13	44
Rio Negro – PR	-	-	1	1	2
Rosário – BA	2	1	2	1	6
São Desidério – BA	8	9	9	10	36
Uberlândia – MG	10	9	11	11	41
EUA					
Fayetteville – AR	-	14	-	-	14
Kibler – AR	5	18	-	2	25
Rohwer – AR	15	10	1	-	26
West Lafayette – IN	-	5	-	-	5
	82	104	70	73	329

3.2. Variação molecular dos genes

Para estudar as relações filogenéticas e filogeográficas dos 329 isolados, nove genes foram amplificados via PCR e as informações sobre a variação molecular de cada um é descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos bancos de dados criados para cada gene, medidas de diversidade nucleotídica e conteúdo GC.

Gene ¹	Nº de amostras / Nº de sítios	Sítios variáveis	Sítios parcimoniamamente informativos	Nº de haplótipos	%GC
act	72 / 203	28	22	19	0.555
cal	66 / 259	46	42	18	0.561
cfp	334 / 854	292	278	33	0.510
cyb	334 / 653	19	13	23	0.321
his	74 / 383	32	19	21	0.585
ITS	334 / 459	4	3	6	0.528
mcm7	334 / 681	95	87	36	0.521
tef	74 / 550	29	20	16	0.560
tub	334 / 1.197	111	103	71	0.577

¹act, actina; cal, calmodulina; cfp, cercosporin facilitator protein; cyb, citocromo B; his, histona; ITS, espaçador interno transcrito; mcm7, minichromosome maintenance complex component 7; tef, fator de alongação 1-alfa; tub, β -tubulina (fragmentos tub-1 e tub-2 foram concatenados).

O menor número de sítios variáveis foi 4, observado para a região ITS, e o maior, 292 registrado para o fragmento cfp. O cfp também foi o fragmento com maior número de sítios parcimoniamamente informativos (278) e o ITS, o menor número (3). O maior número de haplótipos foi encontrado no gene tub (71) e o menor no ITS (6). O conteúdo GC da maioria dos genes variou de 0,51 a 0,58, sendo o menor valor registrado para o fragmento do gene mitocondrial cyb, 0,32 (Tabela 2).

Os genes cfp, tub, mcm7 e ITS foram amplificados para todas as 329 amostras juntamente com as sequências utilizadas como referência das cinco linhagens genealógicas descritas anteriormente (Soares et al. 2015; Borges et al. 2016, dados não publicados). Os genes cfp, tub e mcm7 foram os mais polimórficos e separaram os isolados em sete grupos principais, posteriormente referidos como linhagens genealógicas (ver o tópico 3.4.).

Com base nesse padrão de agrupamento, 74 isolados foram selecionados e outros quatro genes (act, cal, his e tef) foram amplificados para inferir sobre a filogenia dessas amostras juntamente com outras espécies de *Cercospora* descritas por Groenewald et al. (2013). Entre esses quatro genes, cal teve o maior número de sítios variáveis e de parcimoniamamente informativos. O maior número de haplótipos foi obtido para o gene his e o menor para tef.

3.3. Análise de recombinação

Eventos de recombinação foram detectados somente nas linhagens 2 e 7. Na linhagem 2, os eventos de recombinação foram encontrados entre os isolados 10-109, 10-442, 109-442, 219-442, 109-219, evidenciando a recombinação entre todas as sublinhagens, exceto 2A com a 2D. As sublinhagens 2A, 2B, 2C e 2D analisadas separadamente não apresentaram nenhum evento de recombinação. Na linhagem 7, detectou-se um evento de recombinação no isolado 21. Nenhum evento de recombinação foi detectado em fragmentos do gene mitocondrial *cyb*.

3.4. Sete linhagens genealógicas

Sete clados bem suportados foram encontrados com valores de probabilidade posterior acima de 98% ($PP \geq 98\%$) (Figura 1). Deste ponto em diante, os sete clados serão referidos como linhagens genealógicas. Os oito genes tiveram boa resolução e permitiram a separação das linhagens principais bem como a identificação de sublinhagens dentro das linhagens. As linhagens de 1 a 4 foram previamente descritas por Soares et al. (2015); a linhagem 5 foi recentemente descrita por Borges et al. (2016, dados não publicados) e as linhagens 6 e 7 são relatadas neste estudo pela primeira vez.

No primeiro clado, correspondente à linhagem 1, foram agrupados isolados provenientes do Brasil, dos EUA, juntamente com a espécie tipo de *C. kikuchii*. Os isolados Arck 26 e Arck 84 formaram um subgrupo distinto dos demais membros. O segundo clado, linhagem 2, possui apenas isolados provenientes do Brasil. Dentro da linhagem 2 houve a formação de vários grupos bem suportados ($PP = 100\%$). Os isolados 348, 359 e 365 ocuparam uma posição intermediária entre as linhagens 2 e 3. O terceiro clado, correspondente à linhagem 3, foi constituído somente por isolados brasileiros e altos valores de probabilidade posterior evidenciaram a ocorrência de subdivisões dentro desse clado. Os clados 1, 2, 3 e 7 possuem *C. soja* como clado irmão. As linhagens 4 e 5 contêm apenas isolados dos EUA; os isolados Arck 28, Arck 33, Arck 31 e Arck 88 formaram um subgrupo dentro da linhagem 4. A linhagem 6 é próxima à linhagem 4 e ao grupo externo (*C. beticola*). O último clado principal (linhagem 7) parece ser de ocorrência rara, pois consistiu de três isolados, sendo dois do Brasil e um dos EUA. A sétima linhagem formou um grupo irmão das linhagens 1, 2 e 3.

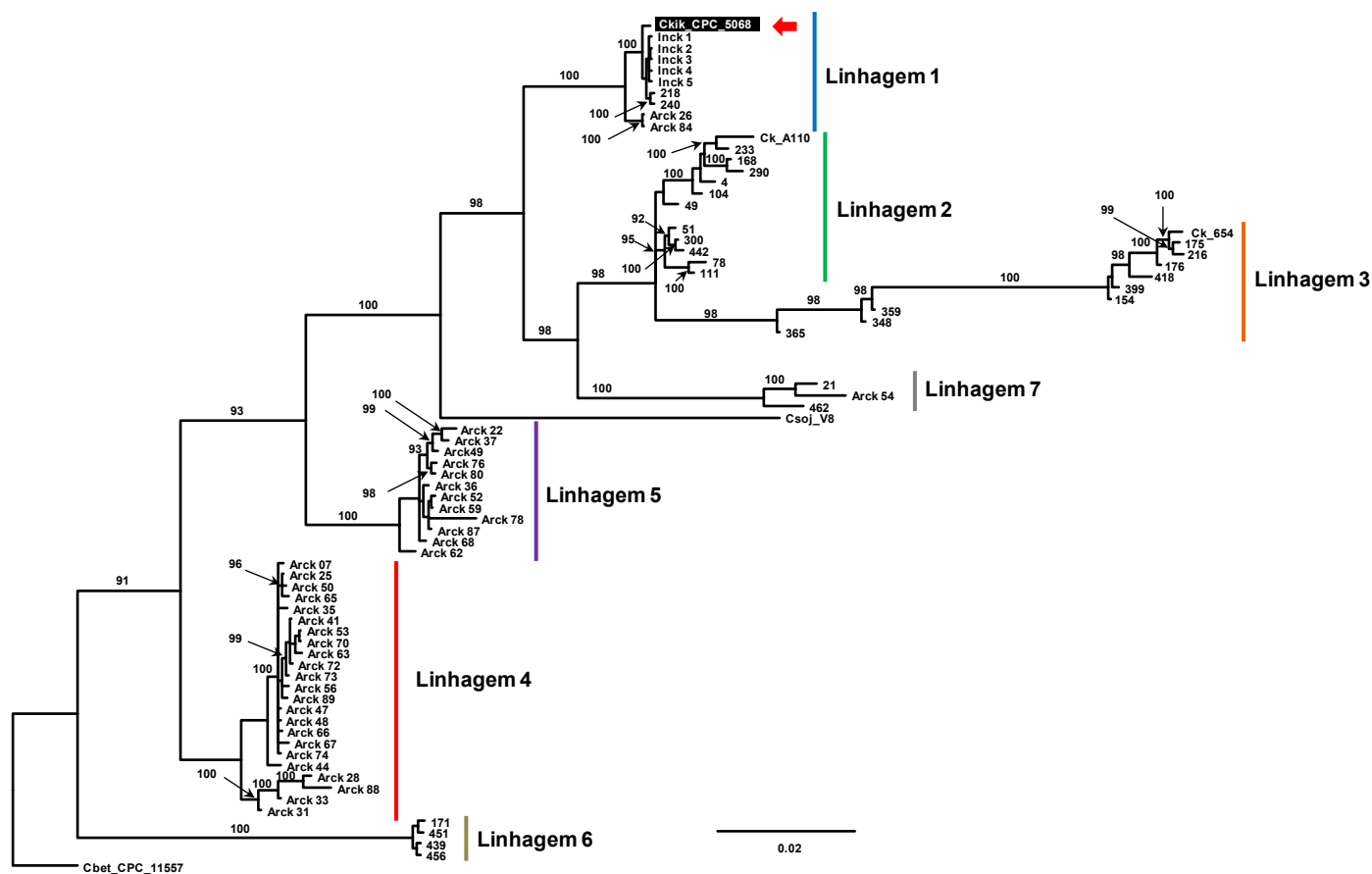


Figura 1. Filogenia Bayesiana (árvore consenso) evidenciando a presença de sete linhagens genealógicas de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS da soja. Os isolados foram obtidos de folha, semente, caule e vagem de soja coletada no Brasil e nos Estados Unidos. O banco de dados utilizado na análise foi criado a partir da concatenação dos fragmentos de oito genes nucleares (act, cal, his, ITS, tef, cfp, tub e mcm7) e possui 4.591 pb. O comprimento dos ramos foi desenhado em escala e a confiabilidade dos nós é expressa em probabilidade posterior (%) em cima dos ramos quando maior que 90%. A barra de escala corresponde ao número esperado de substituição por sítio. Barras verticais em frente aos ramos identificam as linhagens: azul, linhagem 1; verde, linhagem 2; laranja, linhagem 3; vermelho, linhagem 4; roxo, linhagem 5; marrom, linhagem 6; cinza, linhagem 7. A espécie tipo de *C. kikuchii* (CPC_5068) é destacada por uma seta vermelha.

3.5. Filogenia com outras espécies de *Cercospora*

Na análise das relações entre os isolados estudados neste trabalho e outras 16 espécies de *Cercospora* (Figura 2). A linhagem 1 possui a espécie tipo de *C. kikuchii* e foi monofilética. Os membros da linhagem 2 se agruparam com as espécies *Cercospora* sp. P e *Cercospora* sp. Q. Os isolados Arck 26 e Arck 84, membros da linhagem 1, foram agrupados com *C. cf. sigesbeckiae* formando um clado individualizado dentro da linhagem 2. A linhagem 3 formou um clado monofilético e não agrupou com nenhuma outra espécie de *Cercospora*. As linhagens 4 e 5 formaram um clado único com a espécie *C. cf. flagellaris*, mas com uma subdivisão interna. Ainda assim, os isolados Arck 22 e Arck 37, pertencentes à linhagem 5, agruparam-se com os membros da linhagem 4, e o isolado Arck 44, pertencente à linhagem 4, agrupou com os membros da linhagem 5. Da mesma forma que na primeira análise filogenética, os isolados Arck 28, Arck 31 e Arck 33 formaram um clado único.

Membros da linhagem 6 não se agruparam com nenhuma outra espécie de *Cercospora* mas formaram um clado bem suportado, vizinho às espécies *C. sojae*, *C. euphorbiae-sieboldianae* sp. nov., *C. apiicola* e *C. vignigena* sp. nov. Os isolados da linhagem 7 não formaram um clado individualizado, mas agruparam com os membros da linhagem 2.

3.6. Rede de haplótipos – genes nucleares

A genealogia dos haplótipos foi inicialmente inferida utilizando todos os isolados, exceto 15 que causavam homoplasias na rede (Tabela S2). Foram identificados sete haplogrupos, que correspondem às sete linhagens, separados no mínimo por 35 passos mutacionais (Figura 3). Cinco desses haplogrupos correspondem às cinco linhagens previamente descritas e os outros dois haplogrupos referem-se às duas novas linhagens.

Além das sete linhagens, foram identificados quatro haplótipos (156-159) que ocuparam posições intermediárias entre as linhagens. O haplótipo 156 ocupou a posição intermediária entre as Linhagens 2 e 3, enquanto que os haplótipos 157, 158 e 159 posicionaram-se entre as Linhagens 4 e 5. Na Tabela S2 são descritos todos os isolados com seus respectivos haplótipos. Outros quinze isolados apresentaram homoplasias entre os haplogrupos e foram excluídos da análise de rede (Tabela S2).

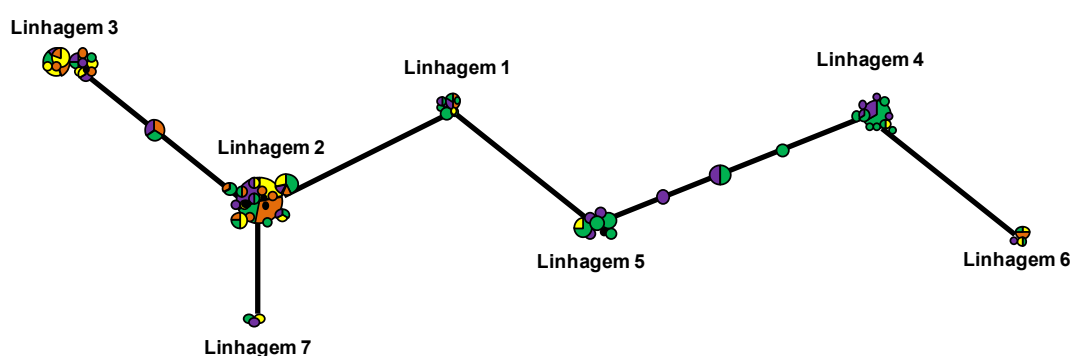


Figura 3. Rede de haplótipos construída com base no algoritmo Median-joining na qual são mostradas as relações entre as sete linhagens genealógicas de *Cercospora* associadas ao CFC e a MPS.

A Linhagem 1 possui 18 isolados provenientes tanto do Brasil quanto dos EUA, agrupados em oito haplótipos (haplótipos 1-8) que estão separados por um ou dois passos mutacionais (Figura 4). Nesta linhagem foram encontrados isolados do caule, folha, vagem e semente, incluindo a espécie tipo de *C. kikuchii* (haplótipo 1, marcado por uma seta). A Linhagem 1 encontra-se a 35 passos mutacionais da Linhagem 2 e 74 passos mutacionais da Linhagem 5.

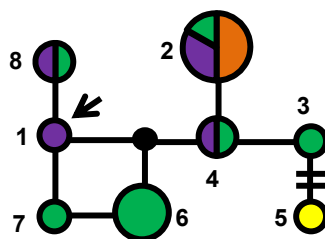


Figura 4. Rede de haplótipos construída com base no algoritmo Median-joining na qual são mostradas as relações entre os membros da linhagem 1 de *Cercospora* associadas ao crestamento foliar de *Cercospora* e mancha púrpura da semente. A rede foi construída com base no banco de dados 4 contendo quatro genes nucleares concatenados (cfp, tub, ITS e mcm7). Cada círculo corresponde a um haplótipo (identificado com um número) e o diâmetro é proporcional à frequência do haplótipo. Barras indicam o número de mutações que separam os haplótipos, quando maior que duas mutações. O círculo preto representa um vetor médio. As cores dos haplótipos representam o órgão de origem do isolado: verde, folha; roxo, semente; amarelo, caule; laranja, vagem. Uma seta indica o haplótipo da espécie tipo de *C. kikuchii* (CPC_5068).

A linhagem 2 possui apenas isolados do Brasil e foi a linhagem com maior número de isolados (164) agrupados em 77 haplótipos (haplótipos 9-85) (Figura 5). A linhagem 2 foi subdividida em quatro sublinhagens denominadas de 2A, 2B, 2C e 2D. Nas quatro sublinhagens foram encontrados isolados de folha, semente, caule e vagem. A sublinhagem 2A possui 31 isolados divididos em 23 haplótipos (9-31). A maioria dos haplótipos foi singletons (haplótipos com somente um membro) separados por apenas um ou dois passos mutacionais. A sublinhagem 2A é separada da 2B por 12 passos mutacionais. A sublinhagem 2B possui 12 isolados agrupados em 10 haplótipos (32-41) sendo a maioria singletons separados por 1-6 passos mutacionais.

A sublinhagem 2B é separada da sublinhagem 2C por 15 passos mutacionais. A sublinhagem 2C possui 93 isolados distribuídos em 26 haplótipos (42-67) e possui o maior número de haplótipos e de isolados. Essa sublinhagem possui dois haplótipos (44 e 53) constatados na maioria dos isolados. Os haplótipos 44 e 53 são circundados por outros 16 singletons. O número de passos mutacionais variou de um a quatro e o padrão de conexão entre os haplótipos foi mais complexo que nas outras sublinhagens. Sete dos 26 haplótipos foram compartilhados por isolados de diferentes órgãos da planta. A sublinhagem 2C é separada da sublinhagem 2D por 12 passos mutacionais. A sublinhagem 2D possui 27 isolados reunidos em 18 haplótipos (68-85) separados por um a três passos mutacionais. Quatorze dos 18 haplótipos são singletons e três haplótipos são compartilhados por isolados de diferentes órgãos. A Linhagem 2 encontra-se a 66 passos mutacionais da Linhagem 7 e a 109 passos mutacionais da Linhagem 3, tendo o haplótipo 156 como intermediário entre as duas linhagens.

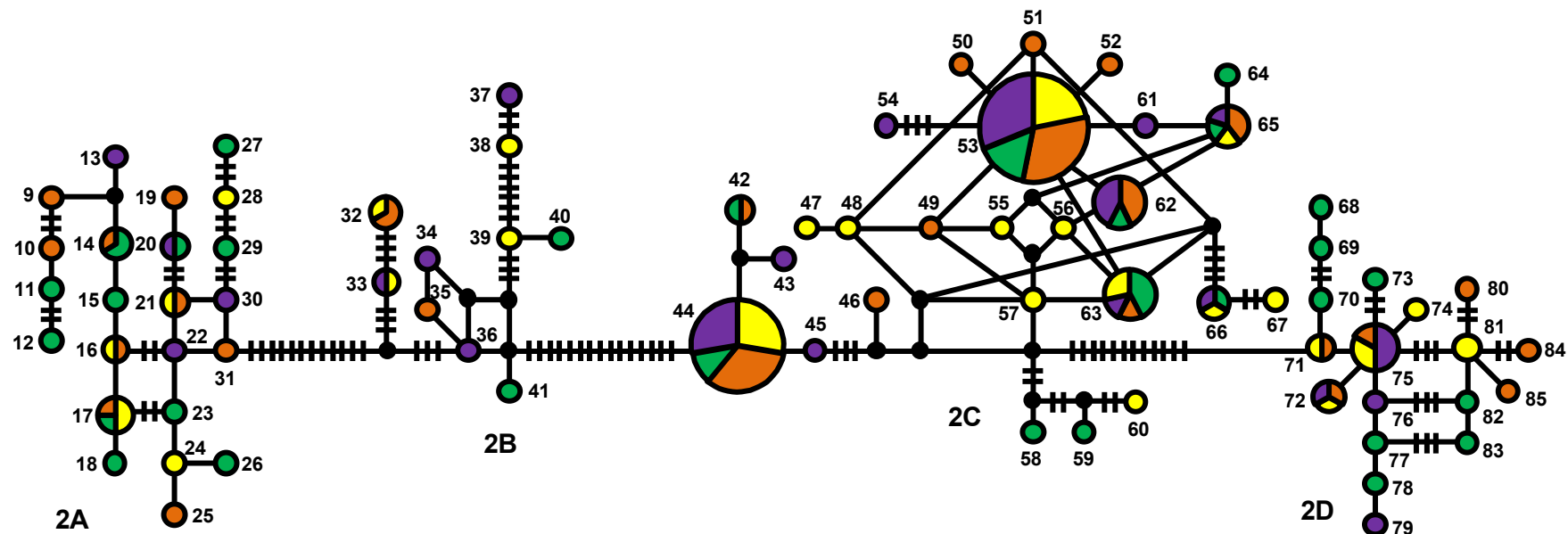


Figura 5. Rede de haplótipos construída com base no algoritmo Median-joining na qual são mostradas as relações entre os membros da linhagem 2 de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS. A rede foi construída com base no banco de dados 5 contendo quatro genes nucleares concatenados (cfp, tub, ITS e mcm7). As quatro sublinhagens são designadas como 2A, 2B, 2C e 2D. Cada círculo corresponde a um haplótipo (identificado com um número) e o diâmetro é proporcional à frequência do haplótipo. Barras indicam o número de mutações que separam os haplótipos, quando maior que duas mutações. Cada círculo preto representa um vetor médio. As cores do haplótipos representam o órgão de origem do isolado: verde, folha; roxo, semente; amarelo, caule; laranja, vagem.

A linhagem 3 possui 61 isolados provenientes do Brasil divididos em 31 haplótipos (86-116) arranjados em três sublinhagens (Figura 6). Em todas as três sublinhagens foram encontrados isolados de folha, semente, caule e vagem. A sublinhagem 3A está separada da 3B por 12 passos mutacionais e a sublinhagem 3B por sete passos mutacionais da 3C. A sublinhagem 3A possui 25 isolados agrupados em dez haplótipos (86-95), sendo seis singletons e outros quatro compartilhados por isolados de diferentes órgãos da planta. O número de passos mutacionais que conectam os haplótipos variou de um a cinco. A sublinhagem 3B possui 17 isolados agrupados em oito haplótipos (96-103) que estão separados por oito passos mutacionais. Quatro dos oito haplótipos são singletons e três são compartilhados por isolados de diferentes órgãos da planta.

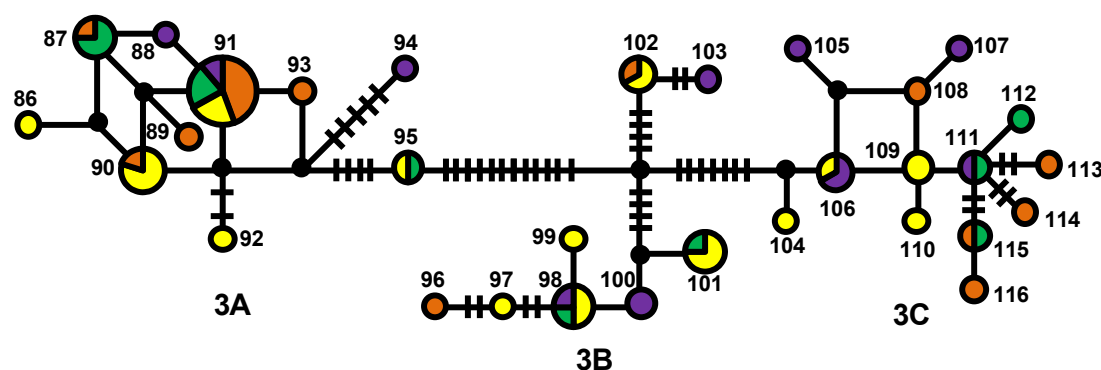


Figura 6. Rede de haplótipos construída com base no algoritmo Median-joining na qual são mostradas as relações entre os membros da linhagem 3 de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS. A rede foi construída com base no banco de dados 6 contendo quatro genes nucleares concatenados (cfp, tub, ITS e mcm7). As quatro sublinhagens são designadas como 3A, 3B e 3C. Cada círculo corresponde a um haplótipo (identificado com um número) e o diâmetro é proporcional à frequência do haplótipo. Barras indicam o número de mutações que separam os haplótipos, quando maior que duas mutações. Cada círculo preto representa um vetor médio. As cores do haplótipos representam o órgão de origem do isolado: verde, folha; roxo, semente; amarelo, caule; laranja, vagem.

A sublinhagem 3C possui 18 isolados divididos em 13 haplótipos (104-116) separados por um ou dois passos mutacionais. Nove dos treze haplótipos são singletons e três são haplótipos compartilhados entre isolados de diferentes órgãos da planta.

A linhagem 4 possui 43 isolados obtidos apenas nos EUA divididos em 23 haplótipos (117-139) separados por no máximo três passos mutacionais (Figura 7). Nessa linhagem foram encontrados isolados de folha caule, vagem e semente. Dezesesseis dos 23 haplótipos são singletons e seis haplótipos são compartilhados por isolados obtidos de diferentes órgãos da planta. A rede possui conformação estrelada com um haplótipo mais frequente no centro circundado por singletons. A linhagem 4 conecta-se

com a linhagem 5 por 105 passos mutacionais tendo os haplótipos 157 (Arck 78), 158 (Arck 28 e Arck 88) e 159 (Arck 33) como haplótipos intermediários.

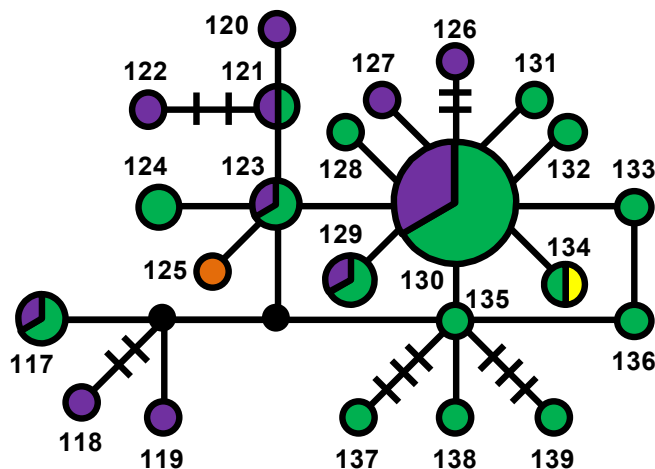


Figura 7. Rede de haplótipos construída com base no algoritmo Median-joining na qual são mostradas as relações entre os membros da linhagem 4 de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS. A rede foi construída com base no banco de dados 7 contendo quatro genes nucleares concatenados (cfp, tub, ITS e mcm7). Cada círculo corresponde a um haplótipo (identificado com um número) e o diâmetro é proporcional à frequência do haplótipo. Barras indicam o número de mutações que separam os haplótipos, quando maior que duas mutações. Cada círculo preto representa um vetor médio. As cores do haplótipos representam o órgão de origem do isolado: verde, folha; roxo, semente; amarelo, caule; laranja, vagem.

A linhagem 5 possui 15 isolados dos EUA distribuídos em 10 haplótipos (140-149) separados por um ou dois passos mutacionais (Figura 8). Sete dos 10 haplótipos são singletons e somente o haplótipo 143 foi compartilhado por isolados de folha e um de caule.

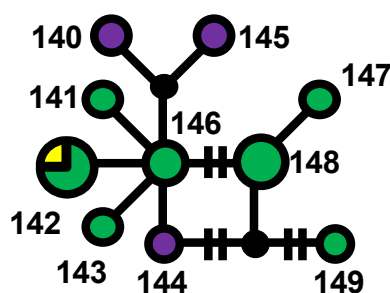


Figura 8. Rede de haplótipos construída com base no algoritmo Median-joining na qual são mostradas as relações entre os membros da linhagem 5 de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS. A rede foi construída com base no banco de dados 8 contendo quatro genes nucleares concatenados (cfp, tub, ITS e mcm7). Cada círculo corresponde a um haplótipo (identificado com um número) e o diâmetro é proporcional à frequência do haplótipo. Barras indicam o número de mutações que separam os haplótipos, quando maior que duas mutações. Cada círculo preto representa um vetor médio. As cores do haplótipos representam o órgão de origem do isolado: verde, folha; roxo, semente; amarelo, caule.

A linhagem 6 possui sete isolados coletados no Brasil divididos em três haplótipos (150-152) separados por um ou cinco passos mutacionais (Figura 9). Dois haplótipos são compartilhados por isolados provenientes de diferentes órgãos e o terceiro haplótipo é um singleton. Isolados de folha, semente, caule e vagem foram encontrados nesta linhagem.

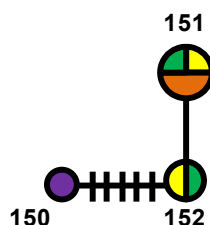


Figura 9. Rede de haplótipos construída com base no algoritmo Median-joining na qual são mostradas as relações entre os membros da linhagem 6 de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS. A rede foi construída com base no banco de dados 9 contendo quatro genes nucleares concatenados (cfp, tub, ITS e mcm7). Cada círculo corresponde a um haplótipo (identificado com um número) e o diâmetro é proporcional à frequência do haplótipo. Barras indicam o número de mutações que separam os haplótipos, quando maior que duas mutações. As cores do haplótipos representam o órgão de origem do isolado: verde, folha; roxo, semente; amarelo, caule; laranja, vagem.

A linhagem 7 encontra-se próxima da Linhagem 2 (55 passos mutacionais) e possui apenas três haplótipos singletons (153-155) (Figura 10). Dois dos isolados são do Brasil e um proveniente dos EUA. O número de passos mutacionais separando os singletons variou de nove a 30.

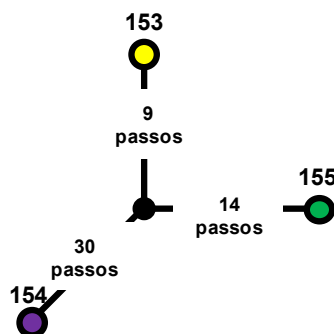


Figura 10. Rede de haplótipos construída com base no algoritmo Median-joining na qual são mostradas as relações entre os membros da linhagem 7 de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS. A rede foi construída com base no banco de dados 10 contendo quatro genes nucleares concatenados (cfp, tub, ITS e mcm7). Cada círculo corresponde a um haplótipo (identificado com um número) e o diâmetro é proporcional à frequência do haplótipo. O número de passos mutacionais separando os haplótipos é descrito ao invés da utilização de barras. O círculo preto representa um vetor médio. As cores do haplótipos representam o órgão de origem do isolado: verde, folha; roxo, semente; amarelo, caule.

3.7. Rede de haplótipos baseada no gene cyb

A rede de haplótipos construída com o gene mitocondrial cyb agrupou os 334 isolados em 23 haplótipos (Figura 11). Os 15 isolados removidos da rede nuclear foram incluídos nesta análise. Onze dos 23 haplótipos foram compartilhados entre isolados vindos de diferentes órgãos e nove haplótipos são singletons. Houve uma tendência dos isolados se agruparem nos haplótipos da rede construída com o gene cyb de acordo com a linhagem estabelecida com os genes nucleares. Membros da Linhagem 1 agruparam-se nos haplótipos A e L; Linhagem 2, haplótipos B, F, G, H, K, J, L e Q; Linhagem 3, haplótipos C, I, N, O e P; Linhagem 4, haplótipos D, E, R, S e T; Linhagem 5, haplótipos E, S, T e U; Linhagem 6, haplótipos M e I; Linhagem 7, haplótipos B, F e V. Na Tabela S2 é mostrado cada isolado e seu respectivo haplótipo mitocondrial.

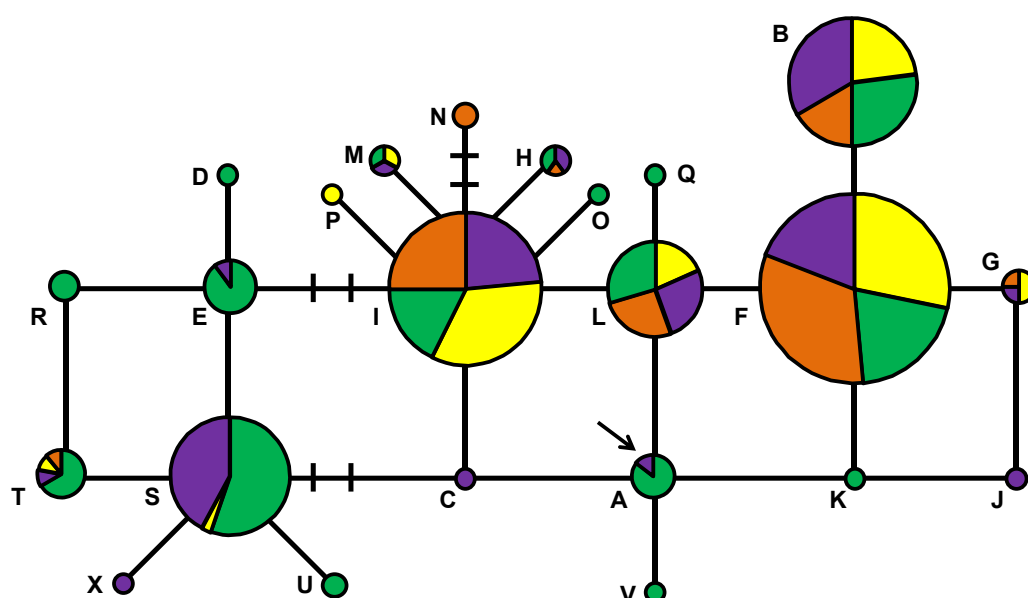


Figura 11. Rede de haplótipos mitocondrial construída com base no algoritmo Median-joining na qual são mostradas as relações entre os 334 isolados de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS. A rede foi construída com base no banco de dados 11 contendo o gene mitocondrial cyb. Cada círculo corresponde a um haplótipo (identificado com uma letra) e o diâmetro é proporcional à frequência do haplótipo. O número de mutações que separa os haplótipos é descrito ao invés da demonstração com barras. As cores do haplótipos representam o órgão de origem do isolado: verde, folha; roxo, semente; amarelo, caule; laranja, vagem. Uma seta indica a posição da espécie tipo de *C. kikuchii* (CPC_5068).

3.8. Medidas de diversidade nucleotídica

Após a identificação das linhagens e seus respectivos membros foram criados sete bancos de dados contendo quatro genes nucleares concatenados (cfp, tub, ITS e mcm7) para estimação dos parâmetros de diversidade nucleotídica (Tabela 3). A maior diversidade haplotípica encontrada (0.9807) foi no banco de dados de dados contendo todas as sequências, evidenciando que a maioria da variação genética encontra-se entre as sete linhagens. A maior variabilidade haplotípica dentro das linhagens foi identificada na linhagem 7, seguida pela linhagem 2; a menor variabilidade foi encontrada entre os membros da linhagem 6. O teste D de Tajima foi não significativo ($P>0.05$) para seis linhagens suportando a hipótese de evolução neutra para essas populações. Somente na linhagem 4 o teste D foi significativo ($P<0.05$) e negativo, o que indica que as populações dessa linhagem estão em expansão ou seleção purificadora.

Tabela 3. Variação molecular e testes de neutralidade dentro das linhagens de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS coletadas de folha, semente, vagem e caule de soja do Brasil e EUA.

Grupos ¹	N ²	S ³	H ⁴	H _d ±SD ⁵	Pi ⁶	K ⁷	D ⁸ (p-valor)
Linhagem 1	18 / 3183	7	8	0.8497±0.060	0.0007	2.373	0.5625 (P>0.05)
Linhagem 2	164 / 3182	65	77	0.9446±0.012	0.0052	16.640	1.3939 (P>0.05)
Linhagem 3	61 / 3188	47	31	0.9590±0.012	0.0044	14.159	1.2765 (P>0.05)
Linhagem 4	43 / 3182	27	23	0.9136±0.034	0.0008	2.653	-1.9379 (P<0.05)
Linhagem 5	16 / 3182	12	10	0.9167±0.049	0.0009	2.858	-0.8007 (P>0.05)
Linhagem 6	7 / 3180	6	3	0.6667±0.160	0.0006	2.000	-0.9314 (P>0.05)
Linhagem 7	3 / 3182	53	3	1.0000±0.272	0.0111	35.333	†
Recombinantes	15 / 3190	305	12	0.9620±0.040	0.0254	80.981	
Interlinhagem	7 / 3183	265	5	0.8570±0.137	0.0446	141.857	
Total	312 / 3191	493	155	0.9807±0.000	0.0401	126.707	

¹Os bancos de concatenados foram criados usando os genes cfp, tub, mcm7 e ITS; uma sequência de referência foi incluída nos bancos de dados das linhagens de 1-5. ²N=número de amostras / número de sítios, diferenças no número de sítios entre os bancos de dados são causadas por inserções / deleções de bases nos genes cfp e tub. ³S=número de sítios polimórficos. ⁴H=número de haplótipos. ⁵H_d±SD =diversidade haplotípica ± desvio padrão. ⁶Pi=diversidade nucleotídica. ⁷K=número médio de diferenças nucleotídicas. ⁸Teste D de Tajima. [†]Quatro ou mais sequências são necessárias para o cálculo do teste D de Tajima.

3.9. Distribuição das linhagens nos órgãos

As sete linhagens genealógicas de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS foram encontradas em folhas, sementes e caule. As linhagens 5 e 7 não foram encontradas nas vagens (Figura 12).

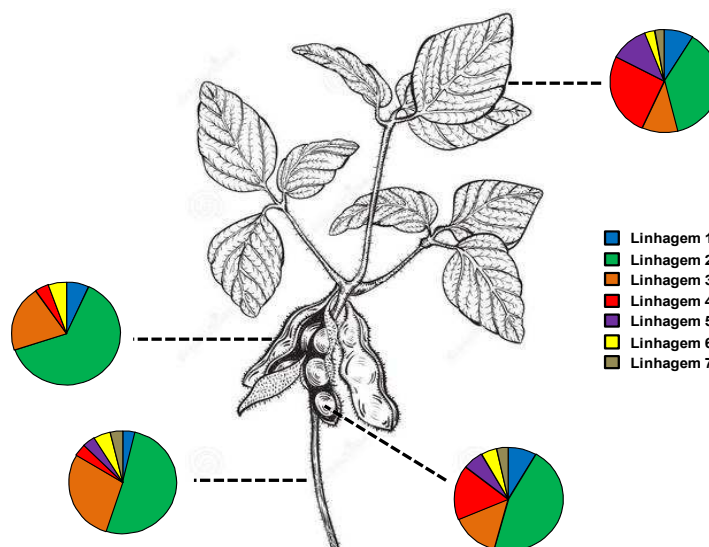


Figura 12. Distribuição geográfica das sete linhagens genealógicas das espécies de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS na soja. As amostras foram provenientes de folhas, sementes, caule e vagem coletadas em lavouras de soja do Brasil e EUA. As sete linhagens são destacadas em cores e a proporcionalidade de cada linhagem é evidenciada no gráfico de setores de cada órgão.

3.10. Distribuição geográfica das linhagens

Houve separação geográfica das sete linhagens ao longo do território brasileiro e EUA (Figura 13). A linhagem 1 tem uma distribuição mais ampla sendo encontrada em cinco locais no Brasil e dois nos EUA. A linhagem 2 tem ampla distribuição sendo encontrada em todas as nove populações do Brasil e não foi encontrada nos EUA. A linhagem 3, restrita ao Brasil, foi encontrada em cinco populações localizadas na região centro sul do Brasil. As linhagens 4 e 5, restritas ao EUA, foram encontradas em três das quatro populações dos EUA. A linhagem 6, restrita ao Brasil, foi encontrada apenas nas populações de Formosa do Rio Preto, Londrina e Passo Fundo. A linhagem 7, foi encontrada no Brasil na população de Alta Floresta e Formosa do Rio Preto; nos EUA ela foi encontrada em Kibler-AR.

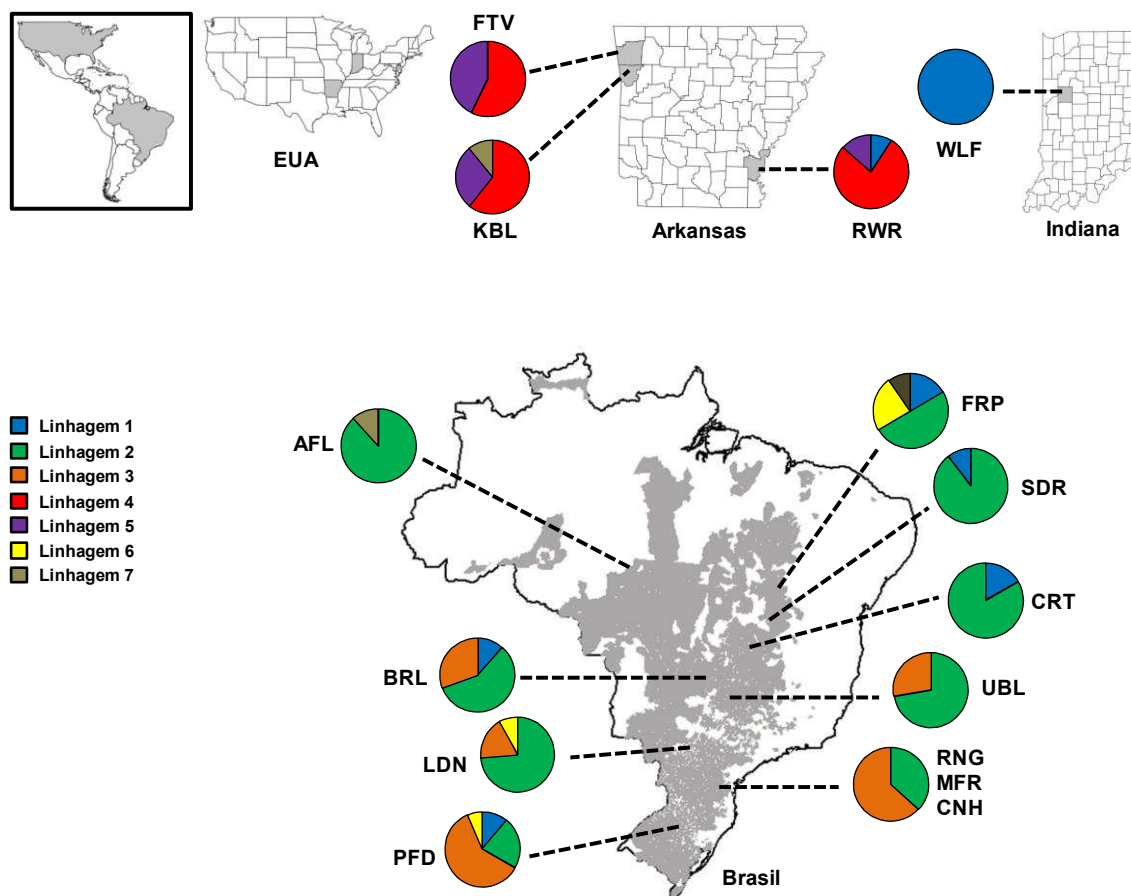


Figura 13. Distribuição geográfica das sete linhagens genealógicas das espécies de *Cercospora* associadas ao CFC e a MPS no Brasil e EUA. No Brasil, a área onde a soja é extensivamente cultivada é destacada na cor cinza. Nos EUA as amostragens foram feitas nos estados do Arkansas e Indiana. Código das populações: AFL=Alta Floresta, BRL=Brasília, CNH=Canoinhas, CRT=Correntina, FTV=Fayetteville, FRP=Formosa do Rio Preto, KBL=Kibler, LDN=Londrina, MFR=Mafra, PFD=Passo Fundo, RNG=Rio Negro, RWR=Rohwer, SDR=São Desidério, UBL=Uberlândia, WLF=West Lafayette.

4. DISCUSSÃO

4.1. Coleção dos isolados e genes amplificados

Foram obtidos 329 isolados monospóricos de *Cercospora* associadas ao CFC e a MPS provenientes de folhas, caule, sementes e vagens de soja coletados no Brasil e quatro dos EUA. Os estudos conduzidos com espécies de *Cercospora* causadoras do CFC e MPS somente utilizam isolados provenientes de folha e sementes. Porém neste trabalho foram obtidos 143 isolados de vagem e caule, o que mostra que esses órgãos são potencialmente relevantes tanto para a epidemiologia quanto para as questões genéticas associadas a esses patossistemas.

Nas análises de polimorfismos das regiões genômicas estudadas confirmou-se a adequabilidade dos genes *cfp* e *tub*, a baixa resolução da região ITS e a identificação de uma nova região, *mcm7*, filogeneticamente informativa para fins de separação das linhagens de *Cercospora* spp. associadas ao CFC e MPS. Como verificado em estudo preliminar, os fragmentos de genes *cfp* e *tub* tiveram um padrão marcante de separação dos isolados em linhagens (Soares et al. 2015). Outra região que exibiu alta variabilidade foi a do fragmento do gene *mcm7*. Esse gene de cópia única tem sido aplicado em estudos de filogenia de ascomicetos por apresentar grande número de polimorfismos e alto poder de resolução de clados (Schmitt et al. 2009; Tretter et al. 2013). A região ITS, apontada como uma região de DNA identificadora de espécies de fungos (Schoch et al. 2012), apresentou baixa variabilidade entre os 329 isolados deste estudo, evidenciando que essa região pode não tem boa resolução na separação de espécies de *Cercospora*.

4.2. Sete linhagens de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS

Neste trabalho foi utilizada uma abordagem filogenética e filogeográfica para analisar o número de linhagens genealógicas no Brasil e em dois estados nos EUA. Além das cinco linhagens causadoras de CFC e MPS já descritas (Soares et al. 2015), outras duas linhagens, que aparentemente ocorrem em baixa frequência, foram encontradas. Das sete linhagens de *Cercospora* aqui descritas, algumas estão associadas a espécies conhecidas enquanto para outras linhagens não foi possível identificar associação com uma espécie já bem caracterizada. Contudo, estas linhagens não

associadas a espécies conhecidas compartilham a capacidade de causar o CFC e a MPS na soja.

Os membros da linhagem 1 se agruparam com a espécie tipo de *C. kikuchii* e daqui em diante serão referidos como membros dessa espécie. Desde os primeiros relatos da doença no início da década de 1920, a espécie *C. kikuchii* era considerada como o único agente causal do CFC e a MPS na soja. Essa afirmação foi contestada simultaneamente por dois trabalhos independentes demonstrando a presença de outros agentes causais (Soares et al. 2015; Bakhshi et al. 2015). No Brasil, *C. kikuchii* parece ser estritamente relacionada com a soja, uma vez que não foi encontrada em outros hospedeiros até o momento (Borges et al. 2016, dados não publicados). Dois isolados da população de Rhower-AR formaram um clado monofilético com a espécie *C. cf. sigesbeckiae*. Esses dois isolados foram provenientes de diferentes órgãos, Arck 26 de folha e Arck 84 de semente, o que reforça a afirmação de que *C. cf. sigesbeckiae* também é causadora do CFC e a MPS da soja e que sua ocorrência nesse hospedeiro não é apenas um fato acidental, como mencionado por Albu et al. (2016). No entanto, testes de inoculação artificial ainda precisam ser feitos para cumprir os postulados de Koch e confirmar que *C. cf. sigesbeckiae* é um dos agentes causais do CFC e a MPS. Os dois isolados de *C. cf. sigesbeckiae* (haplótipo 8) foram conectados diretamente com a espécie tipo de *C. kikuchii* (haplótipo 1) demonstrando uma genealogia muito próxima entre as duas espécies.

A linhagem 2 foi a linhagem mais numerosa com 164 isolados que se agruparam com as espécies *Cercospora* sp. P e *Cercospora* sp. Q, que são espécies não resolvidas pertencentes ao complexo *C. apii*. Soares et al. (2015) já haviam demonstrado que os membros da linhagem 2 de *Cercospora* associadas ao CFC e a MPS também se agruparam com as espécies P e Q. Utilizando os mesmos cinco genes deste trabalho, Groenewald et al. (2013) afirmaram que não foi possível separar as duas espécies e que provavelmente elas são um complexo único de espécies. Serão necessários estudos adicionais de taxonomia e a inclusão de mais genes para delimitar com clareza as espécies, mas como a maioria dos isolados das espécies P e Q foram provenientes do hospedeiro *Dioscorea* sp., o nome *C. dioscoreae-pyrifoliae* é sugerido para essa espécie (Groenewald et al. 2013). A rede de haplótipos da linhagem 2 foi dividida em 4 subgrupos separados por 12 ou 15 passos mutacionais evidenciando um certo distanciamento entre essas sublinhagens. De fato, dentro de cada sublinhagem não foram encontrados indivíduos recombinantes, mas eventos de recombinação entre as sublinhagens foram encontrados revelando não haver barreiras ao fluxo gênico entre as

sublinhagens. A ocorrência de uma sexualidade críptica ou ciclo parasexual podem ser os mecanismos geradores dessa variabilidade, como exemplificado pela ocorrência de pelo menos seis grupos de compatibilidade vegetativa em '*C. kikuchii*' (Cai e Schneider 2004). A maioria dos isolados desta linhagem pertence à sublinhagem 2C divididos em dois haplótipos predominantes (44 e 53) indicando que essa sublinhagem é a mais ancestral e que as sublinhagens 2A, 2B e 2D são mais recentes por serem constituídas majoritariamente de singletons.

A linhagem 3 foi a segunda linhagem mais numerosa e não se agrupou com nenhuma outra espécie de *Cercospora* filogeneticamente próxima a *C. kikuchii*. Em outros trabalhos, isolados dessa linhagem se agruparam a espécie tipo de *C. alchemillicola* (Soares et al. 2015; Borges et al. 2016, dados não publicados). Outras nove espécies de *Cercospora* foram incluídas numa análise posterior e não houve agrupamento com nenhuma outra espécie (dados não mostrados). Estudos taxonômicos adicionais deverão ser realizados para identificar a espécie a qual pertencem os membros da linhagem 3. Possivelmente, os membros da linhagem 3 não se agruparam com *C. alchemillicola* devido a falta da sequência do gene *cal* para seis das oito amostras desse clado. De fato, dados perdidos diminuem a acurácia da análise (Wiens 2006). A rede de haplótipos da linhagem 3 teve uma estrutura semelhante a da linhagem 2, mas somente três sublinhagens foram encontradas. Como nenhum evento de recombinação foi encontrado, essa diferenciação das sublinhagens pode ser explicada pela ocorrência de mutações e fixação por deriva genética.

À semelhança de relatos anteriores, as linhagens 4 e 5 formaram um clado monofilético com a espécie *C. cf. flagellaris*, mas com uma formação de dois subclados (Groenewald et al. 2013; Albu et al. 2016). *Cercospora cf. flagellaris* pode ser considerada um complexo de espécies e a confirmação da existência de espécies crípticas demandarão mais estudos taxonômicos (Bakhshi et al. 2015). A linhagem 4 apresentou uma rede de haplótipos em formato de estrela, com um haplótipo mais abundante e ancestral numa posição central circundado por diversos haplótipos mais recentes, que são os singletons. A topologia estrelada de uma rede de haplótipos expressa uma rápida expansão do tamanho populacional, o que coincide com o valor negativo do teste D de Tajima indicando uma expansão populacional ou seleção purificadora. A linhagem 5 também apresentou uma topologia estrelada com os haplótipos separados por apenas um ou dois passos mutacionais como resultado da baixa diferença nucleotídica entre os membros dessa linhagem.

Duas novas linhagens (6 e 7) foram encontradas neste trabalho. Os membros da linhagem 7 se agruparam com a linhagem 2, devido a baixa resolução do conjunto de cinco genes utilizados e a linhagem 6 também não se agrupou com nenhuma outra espécie conhecida. Como as linhagens 3, 6 e 7 não se agruparam com outras espécies de *Cercospora* descritas, uma análise adicional foi realizada com outras nove espécies de *Cercospora* filogeneticamente próximas. Contudo, não foi possível identificar agrupamento com espécies conhecidas (dados não mostrados). Futuras análises incluindo outras espécies de *Cercospora* filogeneticamente mais distantes deverão ser realizadas para identificação dessas espécies. Apenas três haplótipos foram identificados nas linhagens 6 e 7. Provavelmente, a baixa frequência de isolados destas linhagens resultou na menor capacidade de identificação de haplótipos. O grande número de passos mutacionais separando os três haplótipos da linhagem 7 pode ser explicado pela existência de recombinação entre os indivíduos o que eleva diversidade nucleotídica e haplotípica dessa linhagem.

4.3. Distribuição das sete linhagens nos órgãos

As sete linhagens foram encontradas nos quatro órgãos amostrados, exceto na vagem onde as linhagens 5 e 7 não foram encontradas. A ausência dessas duas linhagens nas vagens pode ser explicada pelo fato de apenas dois isolados de vagem serem coletados nos EUA, local onde todos os membros da linhagem 5 foram amostrados. Os três isolados da linhagem 7 foram coletados em folha, semente e caule. A ausência dessa linhagem nas vagens possivelmente ocorreu pela rara ocorrência dessa linhagem. Como isolados de todos os órgãos estiveram presentes em todas as linhagens verifica-se que padrão de agrupamento dos isolados das espécies de *Cercospora* causadoras do CFC e MPS independe do órgão de origem, como mostrado anteriormente (Cai e Schneider 2004).

4.4. Distribuição geográfica das sete linhagens

A linhagem 1, de *C. kikuchii*, foi encontrada em cinco populações do Brasil, sendo a terceira linhagem mais numerosa, contrastando com estudo prévio no qual ela foi a mais numerosa (Soares et al. 2015). Membros da linhagem 1 também foram encontrados na população de Indiana (EUA), mostrando que *C. kikuchii* também é causadora do CFC e MPS da soja nos EUA, o que não ocorreu em outros trabalhos

(Soares et al. 2015; Albu et al. 2016). De fato, o primeiro relato de *C. kikuchii* no ocidente ocorreu no estado de Indiana (Gardner 1925). Os isolados Arck 26 e Arck 84, pertencentes *C. cf. sigesbeckiae* só foram encontrados na população de Rohwer-AR, localizada ao sul do Estado do Arkansas e próximo ao estado da Louisiana, onde outros cinco isolados de *C. cf. sigesbeckiae* foram recentemente encontrados (Albu et al. 2016).

O grande número de isolados da linhagem 2 e sua presença em todas as populações coletadas no Brasil demonstra que os membros dessa linhagem estão amplamente distribuídos e adaptados as diferentes condições ambientais brasileiras. A linhagem 3 foi encontrada em cinco populações da região centro sul do Brasil. As linhagens 2 e 3 não foram encontradas nos EUA, onde a soja vem sendo cultivada extensivamente há mais tempo que no Brasil. Uma explicação plausível para esta constatação é que os membros dessa linhagem passaram a ter a soja como hospedeira recentemente devido ao avanço da cultura no país (Soares et al. 2015).

As linhagens 4 e 5, cujos membros pertencem a *C. cf. flagellaris*, foram encontradas somente nos EUA. De fato essa espécie ainda não foi encontrada no Brasil (Farr e Rossman 2016), mas foi descrita como causadora do CFC e MPS em soja nos EUA, Irã e Argentina (Bakhshi et al. 2015; Soares et al. 2015; Albu et al. 2016). A espécie *C. cf. flagellaris* é amplamente distribuída e generalista sendo descrita em 24 famílias como *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Salicaceae*, *Pontederiaceae*, dentre outras (Groenewald et al. 2013). A ausência dessa espécie nas lavouras de soja, bem como em outras culturas do Brasil ainda não está clara. Devido a ausência de uma espécie tipo, um membro da coleção de Chupp (1954) ou Crous e Braun (2003) deve ser epitificado para fornecer DNA de modo que genes adicionais sejam sequenciados e seja estabelecido um nome definitivo para os membros dos dois clados dessa linhagem (Bakhshi et al. 2015). A linhagem 6 foi encontrada em duas populações localizadas na região sul do Brasil (LDN e PFD) e uma na região nordeste (FRP). Essa linhagem foi restrita ao Brasil. Mesmo o vento sendo uma importante forma de dispersão de esporos de fungos causadores do CFC e MPS (Kudo et al. 2011) é mais provável que o comércio de sementes contaminadas de áreas tradicionais de cultivo da soja no sul do Brasil para novas fronteiras tenha sido uma forma de dispersão do patógeno (Almeida et al. 2005b). A linhagem 7 foi encontrada tanto no Brasil quanto nos EUA. Como essa linhagem foi de rara ocorrência, provavelmente trata-se de uma espécie ainda não descrita que está presente em ambos os países, possivelmente em baixa frequência, e que possui a capacidade de causar o CFC e MPS.

Assim, a presença de múltiplas espécies causando o CFC e a MPS alertam para o erro na identificação de doenças com base apenas no hospedeiro. A semelhança nos sintomas que ocorre no CFC e MPS pode levar a identificação incorreta do agente causal o que implica em problemas no manejo da doença. A identificação correta de um fitopatógeno representa não apenas um nome, mas possibilita acessar outras importantes características como sua história evolutiva, ciclo de vida, resistência a drogas e métodos de controle e questões comerciais relativas à ocorrência de pragas quarentenárias (Rossman e Palm-Hernández 2008). A existência de múltiplas espécies causadoras do CFC e a MPS demandará mais esforços para os programas de melhoramento de soja, uma vez que a identificação correta da espécie de *Cercospora* será um pré-requisito nos testes de inoculação para desenvolvimento de cultivares resistentes. Além disso, todas as espécies causadoras do CFC e a MPS deverão ser testadas para liberação de cultivares com resistência mais duradoura.

5. REFERÊNCIAS

- Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of maximum likelihood principle. Pages 267-281 in: Second International Symposium on Information Theory. B. N. Petrov and F. Csaki, eds. Akademiai Kiado, Budapest.
- Albu, S., Schneider, R. W., Price, P. P., Doyle, V. P. 2016. *Cercospora* cf. *flagellaris* and *C. cf. sigesbeckiae* are associated with *Cercospora* leaf blight and purple seed stain on soybean in North America. *Phytopathology* 106:1376-1385.
- Alloatti, J., Chen, P., Zeng, A., Li, S., Rupe, J., Florez-Palacios, L., Orazaly, M. 2015. Inheritance of and molecular markers for purple seed stain resistance in soybean. *Euphytica*:1-9.
- Almeida, A. M. R., Ferreira, L. P., Yorinori, J. T., Silva, J. E. V., Henning, A. A. 2005a. Doenças da soja. Page 663 in: Manual de Fitopatologia - Doenças de Plantas Cultivadas, vol. 2. H. Kimati, L. Amorim, J. A. M. Resende, A. Bergamin Filho and L. E. A. Camargo, eds. Agronômica Ceres, Piracicaba, SP.
- Almeida, A. M. R., Piuga, F. F., Marin, S. R. R., Binneck, E., Sartori, F., Costamilan, L. M., Teixeira, M. R. O., Lopes, M. 2005b. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatol. Bras.* 30:594-602.
- Bakhshi, M., Arzanlou, M., Babai-ahari, A., Groenewald, J. Z., Braun, U., Crous, P. W. 2015. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. *Persoonia* 34:65-86.
- Bandelt, H. J., Forster, P., Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48.
- Borges, L. L., Ferreira, T. F., Lana, M. G., Bluhm, B. H., Oliveira, L. O. 2016. Multihost pathogens cause cercospora leaf blight and purple seed stain in soybeans. Dados não publicados.
- Carbone, I., Kohn, L. M. 1999. A Method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.
- Cai, G., Schneider, R. W. 2004. Population structure of *Cercospora kikuchii* from soybean. *Phytopathology* 94:257-261.
- Chupp, C. 1954. A monograph of the fungus genus *Cercospora*. The Ronald Press, New York.
- Crous, P. W., Braun, U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., M., R. J., Hywel-Jones, N. L. 2004. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Stud. Mycol.* 50:415-429.

- Davidson, R. M., Hanson, L. E., Franc, G. D., Panella, L. 2006. Analysis of β -tubulin gene fragments from benzimidazole-sensitive and-tolerant *Cercospora beticola*. J. Phytopathol. 154:321-328.
- DeAngelis, M. M., Wang, D. G., Hawkins, T. L. 1995. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. Nucleic Acids Res. 23:4742-4743.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol. Biol. Evol. 29:1969-1973.
- Farr, D. F., Rossman, A. Y. 2016. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: < <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> >. Acessado em: 12 Mai. 2016.
- Fuckel, K. W. G. L. 1863. Fungi Rhenani exsiccati, Fasc. I-IV. Hedwigia 2:132-136.
- Gardner, M. W. 1925. Indiana plant diseases, 1924. Proc. Indiana Acad. Sci. 35:237-257.
- Gibbs, M. J., Armstrong, J. S., Gibbs, A. J. 2000. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. Bioinformatics 16:573-582.
- Goodwin, S. B., Dunkle, L. D., Zismann, V. L. 2001. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. Phytopathology 91:648-658.
- Grigoriev, I. V., Nordberg, H., Shabalov, I., Aerts, A., Cantor, M., Goodstein, D., Kuo, A., Minovitsky, S., Nikitin, R., Ohm, R. A., Otilar, R., Poliakov, A., Ratnere, I., Riley, R., Smirnova, T., Rokhsar, D., Dubchak, I. 2012. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. Nucleic Acids Res. 40:D26-D32.
- Groenewald, J. Z., Nakashima, C., Nishikawa, J., Shin, H. D., Park, J. H., Jama, A. N., Groenewald, M., Braun, U., Crous, P. W. 2013. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. Stud. Mycol. 75:115-170.
- Groenewald, M., Groenewald, J. Z., Braun, U., Crous, P. W. 2006. Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola* and description of *C. apiicola*, a novel species from celery. Mycologia 98:275-285.
- Hartman, G. L., Sinclair, J. B., Rupe, J. C. 1999. Compendium of soybean diseases. American Phytopathological Society (APS Press), Saint Paul.
- Imazaki, I., Ishikawa, K., Yasuda, N., Miyasaka, A., Kawasaki, S., Koizumi, S. 2006a. Incidence of thiophanate-methyl resistance in *Cercospora kikuchii* within a single lineage based on amplified fragment length polymorphisms in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 72:77-84.

- Imazaki, I., Iizumi, H., Ishikawa, K., Sasahara, M., Yasuda, N., Koizumi, S. 2006b. Effects of thiophanate-methyl and azoxystrobin on the composition of *Cercospora kikuchii* populations with thiophanate-methyl-resistant strains. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:292-300.
- Jackson, E. W., Fenn, P., Chen, P. 2006. Inheritance of resistance to purple seed stain caused by *Cercospora kikuchii* in PI 80837 Soybean. *Crop Sci.* 46:1462-1466.
- Jackson, E. W., Feng, C., Fenn, P., Chen, P. 2008. Genetic mapping of resistance to purple seed stain in PI 80837 soybean. *J. Hered.* 99:319-322.
- Jenns, A. E., Daub, M. E., Upchurch, R. G. 1989. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 79:213-219.
- Katoh, K., Kuma, K.-I., Toh, H., Miyata, T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* 33:511-518.
- Kudo, A. S., Blum, L. E. B., Lima, M. A. 2011. Aerobiologia de *Cercospora kikuchii*. *Cienc. Rural* 41:1682-1688.
- Lehman, S. G. 1950. Purple stain of soybean seeds. *N. C. ARS. Tech. Bull.* 369:1-11.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Martin, D., Rybicki, E. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16:562-563.
- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1:vev03
- Matsumoto, T., Tomoyasu, R. 1925. Studies on the purple speck of soybean seed. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 1:1-14.
- Murakishi, H. H. 1951. Purple seed stain of soybean. *Phytopathology* 41:305-318.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Padidam, M., Sawyer, S., Fauquet, C. M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218-225.
- Pollack, F. G. 1987. An annotated compilation of *Cercospora* names. *Mycol. Memoirs* 12:1-212.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rossmann, A. Y., Palm-Hernández, M. E. 2008. Systematics of plant pathogenic fungi: why it matters. *Plant Dis.* 92:1376-1386.
- Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Method Mol. Biol.* 132:365-386.

- Salminen, M. O., Carr, J. K., Burke, D. S., McCutchan, F. E. 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 11:1423-1425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74:5463-5467.
- Schmitt, I., Crespo, A., Divakar, P. K., Fankhauser, J. D., Herman-Sackett, E., Kalb, K., Nelsen, M. P., Nelson, N. A., Rivas-Plata, E., Shimp, A. D., Widhalm, T., Lumbsch, H. T. 2009. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia* 23:35-40.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Consortium, F. B. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109:6241-6246.
- Smith, D., and Onions, A. H. S. 1994. *The preservation and maintenance of living fungi*. CAB International, Wallingford, UK.
- Smith, J. M. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.* 34:126-129.
- Soares, A. P. G., Guillin, E. A., Borges, L. L., Silva, A. C. T., Almeida, A. M. R., Grijalba, P. E., Gottlieb, A. M., Bluhm, B. H., Oliveira, L. O. 2015. More *Cercospora* species infect soybeans across the Americas than meets the eye. *PloS one* 10:e0133495.
- Srisombun, S., Supapornhem, P. 1993. Inheritance of soybean resistance to purple seed stain. *Soybean Genet. Newsl.* 20:92-93.
- Suzuki, K. 1921. Studies on the cause of “Shihan” of soybean. *Chosen Nakaiho* 16:24-28.
- Tretter, E. D., Johnson, E. M., Wang, Y., Kandel, P., White, M. M. 2013. Examining new phylogenetic markers to uncover the evolutionary history of early-diverging fungi: comparing MCM7, TSR1 and rRNA genes for single- and multi-gene analyses of the Kickxellomycotina. *Persoonia* 30:106-125.
- Walters, H. J. 1980. Soybean leaf blight caused by *Cercospora kikuchii*. *Plant Dis.* 64:961-962.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, eds. Academic Press, Inc., New York.
- Wiens, J. J. 2006. Missing data and the design of phylogenetic analyses. *J. Biomedical Info.* 39:34-42.
- Wilcox, J. R., Laviolette, F. A., Martin, R. J. 1975. Heritability of purple seed stain resistance in soybeans. *Crop Sci.* 15:525-526.

6. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Informações dos primers usados e desenvolvidos neste estudo.

Gene alvo	Primer	Sequência (5'→3')	Ta (°C) ¹	Tamanho (pb)	Referência
Actina	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	53,0	226	Carbone and Kohn (1999)
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT			Carbone and Kohn (1999)
Calmodulina	CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	56,0	561	Carbone and Kohn (1999)
	CAL-737R	CATCTTTCTGGCCATCATGG			Carbone and Kohn (1999)
B-Tubulina (tub-1)	Ck_Betatub-F1	TGCGTGAAATCGTGAGTCCTCAC	58,0	538	Soares et al. (2015)
	Bt516R	ACGAAGTTGTCTGGGCGGAAAAG			Davidson et al. (2006)
B-Tubulina (tub-2)	Tub-F1	GGTCATTACACTGAGGGTGC	55,0	834	Imazaki et al. (2006a)
	Tub-R1	GACAAGATCGTTCATGTTGGACTC			Imazaki et al. (2006a)
Cercosporin facilitator protein	F1771	ATTGGTTGGAGCGACTTTTG	58,0	935	Soares et al. (2015)
	R2706	CAGGACAGTCTGGACAGCAA			Soares et al. (2015)
	CFP_F5	CACTTTATGCTGGGCTGGTTGG		980	Este estudo
	CFP_R5	GCTTGTGCCCCGCTGGAATCTGA			Este estudo
Histona	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	57,0	412	Crous et al. (2004)
	CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG			Crous et al. (2004)
Espaçador transcrito interno	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	51,0	560	White et al. (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			White et al. (1990)
Minichromosome maintenance complex component 7	CercMCM7_F1	CCNCTGCTACCTCGNCCAG	58,5	789	Este estudo
	CercMCM7_R1	TCAGGTCCGNGGTGAGCATC			Este estudo
Citocromo B	Cytb-F2	GGAAGAGGTCTATACTATGG	45,0	696	Imazaki et al. (2006b)
	Cytb-R1	CGTGATTAGCACCTAATTGC			Imazaki et al. (2006b)
Fator de alongação - 1 alfa	TEF_F1	CCGGCAAGTCGACAACCACCG	57,0	605	Soares et al. (2015)
	TEF_R1	TCACGGTGACCTGGGGCGTC			Soares et al. (2015)

¹TA = Temperatura de anelamento dos primers.

Tabela S2. Informações dos isolados, local e órgão de origem com sua respectiva linhagem, haplótipo nuclear e haplótipo mitocondrial.

Isolado	Origem	Órgão	Linhagem	Haplótipo nuclear	Haplótipo mitocondrial
Ckik_CPC_5068	Japão (C. kikuchii – Esp. tipo)	S	1	1	A
Ck_A110	Silvania GO	S	2	37	B
Ck_654	Fortaleza dos Vales RS	S	3	94	C
Arck_07	Rohwer AR	F	4	133	D
Arck_22	Arkansas City KS	F	5	147	E
218	Passo Fundo RS	S	1	2	L
236	Passo Fundo RS	F	1	2	L
240	Passo Fundo RS	F	1	3	L
284	Correntina Rosário BA	F	1	4	L
314	São Desidério BA	S	1	4	L
318	São Desidério BA	S	1	2	L
430	Brasília DF	V	1	2	L
463	Formosa do Rio Preto BA	V	1	2	L
464	Formosa do Rio Preto BA	C	1	5	L
467	Formosa do Rio Preto BA	V	1	2	L
Inck_1	West Lafayette IN	F	1	6	A
Inck_2	West Lafayette IN	F	1	6	A
Inck_3	West Lafayette IN	F	1	6	A
Inck_4	West Lafayette IN	F	1	6	A
Inck_5	West Lafayette IN	F	1	7	A
Arck_26	Rohwer AR	F	1	8	L
Arck_84	Rohwer AR	S	1	8	A
10	Alta Floresta MT	F	2A	11	F
26	Alta Floresta MT	V	2A	31	F
34	Alta Floresta MT	F	2A	29	B
45	Alta Floresta MT	F	2A	27	K
47	Alta Floresta MT	V	2A	10	H
71	Alta Floresta MT	S	2A	30	H
74	Alta Floresta MT	C	2A	28	F
76	Alta Floresta MT	S	2A	13	F
99	Alta Floresta MT	F	2A	12	F
115	Londrina PR	F	2A	20	B
126	Londrina PR	V	2A	19	B
168	Londrina PR	F	2A	15	B
183	Mafra SC	S	2A	20	B
189	Mafra SC	V	2A	17	L
228	Passo Fundo RS	F	2A	14	B
241	Passo Fundo RS	S	2A	22	B
276	Rosa Velha São Desidério BA	F	2A	23	B
290	Correntina Rosário BA	V	2A	14	F
312	São Desidério BA	C	2A	24	L
315	São Desidério BA	V	2A	21	F
316	São Desidério BA	C	2A	17	B
319	São Desidério BA	V	2A	9	F
320	São Desidério BA	C	2A	21	F
321	São Desidério BA	F	2A	14	B
323	São Desidério BA	V	2A	25	F
342	Uberlândia MG	C	2A	17	L
368	Uberlândia MG	F	2A	18	B
425	Brasília DF	F	2A	17	F
427	Brasília DF	C	2A	16	B
459	Formosa do Rio Preto BA	V	2A	16	B
469	Formosa do Rio Preto BA	F	2A	26	L
4	Alta Floresta MT	C	2B	39	B
11	Alta Floresta MT	S	2B	36	J
19	Alta Floresta MT	V	2B	32	F
25	Alta Floresta MT	S	2B	33	G
67	Alta Floresta MT	F	2B	41	H
73	Alta Floresta MT	V	2B	35	G

F=folha, S=semente, C=caule, V=vagem

Tabela S2. Continuação.

Isolado	Origem	Orgão	Linhagem	Haplótipo nuclear	Haplótipo mitocondrial
89	Alta Floresta MT	S	2B	34	B
104	Londrina PR	V	2B	32	F
109	Londrina PR	F	2B	40	H
235	Passo Fundo RS	C	2B	32	F
255	Passo Fundo RS	C	2B	33	G
420	Brasília DF	C	2B	38	F
49	Alta Floresta MT	C	2C	60	F
51	Alta Floresta MT	S	2C	53	F
93	Alta Floresta MT	V	2C	53	F
103	Londrina PR	F	2C	66	F
108	Londrina PR	C	2C	63	F
118	Londrina PR	S	2C	53	F
128	Londrina PR	S	2C	63	F
130	Londrina PR	V	2C	53	F
135	Londrina PR	S	2C	43	B
139	Londrina PR	S	2C	53	B
149	Londrina PR	V	2C	53	B
153	Londrina PR	V	2C	44	F
155	Londrina PR	S	2C	61	F
156	Londrina PR	F	2C	53	F
161	Londrina PR	V	2C	52	F
162	Londrina PR	C	2C	53	B
164	Londrina PR	F	2C	53	B
170	Londrina PR	S	2C	53	B
172	Londrina PR	V	2C	44	F
174	Londrina PR	S	2C	53	B
177	Mafra SC	F	2C	53	B
179	Mafra SC	S	2C	45	F
182	Mafra SC	V	2C	53	F
184	Mafra SC	C	2C	57	L
195	Rio Negro PR	V	2C	53	L
245	Passo Fundo RS	S	2C	66	F
247	Passo Fundo RS	C	2C	53	F
248	Passo Fundo RS	F	2C	63	F
250	Passo Fundo RS	V	2C	53	F
279	Rosa Velha São Desidério BA	C	2C	53	F
281	Rosa Velha São Desidério BA	S	2C	44	F
282	Rosa Velha São Desidério BA	V	2C	49	B
283	Rosa Velha São Desidério BA	C	2C	44	B
285	Correntina Rosário BA	S	2C	53	F
286	Correntina Rosário BA	V	2C	62	F
291	Correntina Rosário BA	C	2C	56	F
294	São Desidério BA	C	2C	48	F
300	São Desidério BA	C	2C	44	F
302	São Desidério BA	S	2C	44	F
303	São Desidério BA	V	2C	44	F
304	São Desidério BA	C	2C	44	B
305	São Desidério BA	F	2C	62	F
306	São Desidério BA	S	2C	44	B
309	São Desidério BA	F	2C	59	F
310	São Desidério BA	S	2C	53	B
311	São Desidério BA	V	2C	44	B
313	São Desidério BA	F	2C	44	B
317	São Desidério BA	F	2C	44	F
322	São Desidério BA	S	2C	44	B
325	São Desidério BA	F	2C	64	F
328	São Desidério BA	C	2C	66	F
331	Uberlândia MG	V	2C	42	B
333	Uberlândia MG	S	2C	62	B

F=folha, S=semente, C=caule, V=vagem

Tabela S2. Continuação.

Isolado	Origem	Orgão	Linhagem	Haplótipo nuclear	Haplótipo mitocondrial
333	Uberlândia MG	S	2C	62	B
335	Uberlândia MG	C	2C	53	F
337	Uberlândia MG	V	2C	62	F
345	Uberlândia MG	V	2C	53	F
346	Uberlândia MG	C	2C	53	F
350	Uberlândia MG	F	2C	58	B
352	Uberlândia MG	V	2C	50	B
355	Uberlândia MG	S	2C	53	F
358	Uberlândia MG	F	2C	63	L
361	Uberlândia MG	C	2C	65	F
367	Uberlândia MG	C	2C	44	F
370	Uberlândia MG	V	2C	65	F
372	Uberlândia MG	F	2C	53	F
373	Uberlândia MG	S	2C	62	L
374	Uberlândia MG	V	2C	44	F
375	Uberlândia MG	C	2C	53	F
378	Uberlândia MG	C	2C	53	B
380	Uberlândia MG	S	2C	53	B
381	Uberlândia MG	V	2C	53	F
390	Brasília DF	S	2C	62	F
392	Brasília DF	C	2C	63	F
401	Brasília DF	S	2C	44	F
402	Brasília DF	C	2C	44	B
413	Brasília DF	V	2C	44	F
419	Brasília DF	V	2C	51	F
421	Brasília DF	V	2C	62	F
423	Brasília DF	V	2C	53	L
426	Brasília DF	V	2C	65	F
429	Brasília DF	S	2C	65	L
436	Brasília DF	V	2C	63	F
440	Formosa do Rio Preto BA	V	2C	53	F
441	Formosa do Rio Preto BA	C	2C	47	F
442	Formosa do Rio Preto BA	F	2C	42	F
444	Formosa do Rio Preto BA	C	2C	55	B
449	Formosa do Rio Preto BA	F	2C	53	F
457	Formosa do Rio Preto BA	F	2C	65	F
461	Formosa do Rio Preto BA	F	2C	63	F
466	Formosa do Rio Preto BA	S	2C	54	B
468	Formosa do Rio Preto BA	C	2C	53	F
471	Formosa do Rio Preto BA	V	2C	46	L
474	Formosa do Rio Preto BA	C	2C	67	F
52	Alta Floresta MT	F	2D	73	F
63	Alta Floresta MT	C	2D	81	L
78	Alta Floresta MT	V	2D	84	F
95	Alta Floresta MT	F	2D	70	F
111	Londrina PR	C	2D	75	F
125	Londrina PR	F	2D	83	B
134	Londrina PR	C	2D	75	F
150	Londrina PR	C	2D	81	F
151	Londrina PR	S	2D	75	F
169	Londrina PR	V	2D	72	F
219	Passo Fundo RS	V	2D	80	B
249	Passo Fundo RS	S	2D	72	F
280	Rosa Velha São Desidério BA	F	2D	69	B
289	Correntina Rosário BA	S	2D	75	L
295	São Desidério BA	F	2D	82	F
298	São Desidério BA	S	2D	76	F
299	São Desidério BA	V	2D	75	F
307	São Desidério BA	V	2D	85	F
308	São Desidério BA	C	2D	72	F

F=folha, S=semente, C=caule, V=vagem

Tabela S2. Continuação.

Isolado	Origem	Orgão	Linhagem	Haplótipo nuclear	Haplótipo mitocondrial
327	São Desidério BA	V	2D	71	L
336	Uberlândia MG	S	2D	75	B
349	Uberlândia MG	C	2D	74	F
354	Uberlândia MG	F	2D	77	F
357	Uberlândia MG	C	2D	71	B
434	Brasília DF	F	2D	68	Q
438	Formosa do Rio Preto BA	F	2D	78	L
454	Formosa do Rio Preto BA	S	2D	79	L
175	Mafra SC	V	3A	87	I
176	Mafra SC	C	3A	95	I
178	Mafra SC	V	3A	91	N
180	Mafra SC	C	3A	90	I
185	Mafra SC	F	3A	91	O
186	Mafra SC	V	3A	90	I
188	Mafra SC	C	3A	90	I
192	Canoinhas SC	F	3A	87	I
200	Passo Fundo RS	C	3A	91	I
205	Passo Fundo RS	V	3A	93	I
212	Passo Fundo RS	V	3A	91	I
214	Passo Fundo RS	F	3A	87	I
216	Passo Fundo RS	C	3A	92	I
217	Passo Fundo RS	F	3A	95	I
221	Passo Fundo RS	F	3A	91	I
222	Passo Fundo RS	S	3A	88	I
224	Passo Fundo RS	C	3A	91	I
226	Passo Fundo RS	V	3A	91	N
229	Passo Fundo RS	S	3A	91	I
230	Passo Fundo RS	V	3A	91	I
243	Passo Fundo RS	C	3A	90	I
244	Passo Fundo RS	F	3A	87	I
246	Passo Fundo RS	V	3A	89	I
251	Passo Fundo RS	C	3A	90	P
274	Passo Fundo RS	C	3A	86	I
159	Londrina PR	S	3B	100	I
187	Mafra SC	S	3B	98	I
194	Canoinhas SC	C	3B	101	I
213	Passo Fundo RS	C	3B	98	I
232	Passo Fundo RS	F	3B	101	I
239	Passo Fundo RS	C	3B	101	I
254	Passo Fundo RS	V	3B	102	I
262	Passo Fundo RS	C	3B	101	I
263	Passo Fundo RS	F	3B	98	I
270	Passo Fundo RS	C	3B	102	I
332	Uberlândia MG	C	3B	99	I
360	Uberlândia MG	V	3B	96	I
369	Uberlândia MG	S	3B	100	I
382	Uberlândia MG	C	3B	98	I
400	Brasília DF	C	3B	97	I
418	Brasília DF	S	3B	103	I
422	Brasília DF	C	3B	102	I
124	Londrina PR	C	3C	104	I
127	Londrina PR	C	3C	109	I
154	Londrina PR	C	3C	109	I
167	Londrina PR	S	3C	107	I
191	Mafra SC	C	3C	106	I
197	Rio Negro PR	C	3C	110	I
237	Passo Fundo RS	S	3C	111	I
238	Passo Fundo RS	V	3C	108	I
257	Passo Fundo RS	S	3C	106	I
334	Uberlândia MG	V	3C	114	I

F=folha, S=semente, C=caule, V=vagem

Tabela S2. Continuação.

Isolado	Origem	Orgão	Linhagem	Haplótipo nuclear	Haplótipo mitocondrial
339	Uberlândia MG	F	3C	115	I
343	Uberlândia MG	F	3C	112	I
347	Uberlândia MG	S	3C	106	I
356	Uberlândia MG	V	3C	113	I
379	Uberlândia MG	F	3C	111	I
399	Brasília DF	V	3C	116	I
432	Brasília DF	V	3C	115	I
435	Brasília DF	S	3C	105	I
Arck_25	Rohwer AR	F	4	130	E
Arck_27	Rohwer AR	F	4	135	E
Arck_29	Rohwer AR	F	4	124	R
Arck_30	Rohwer AR	F	4	124	R
Arck_31	Rohwer AR	F	4	136	E
Arck_32	Rohwer AR	F	4	128	R
Arck_34	Rohwer AR	F	4	137	E
Arck_35	Fayetteville AR	F	4	138	S
Arck_41	Fayetteville AR	F	4	121	S
Arck_42	Fayetteville AR	F	4	131	T
Arck_44	Fayetteville AR	F	4	139	S
Arck_45	Fayetteville AR	F	4	134	S
Arck_46	Fayetteville AR	F	4	130	S
Arck_47	Fayetteville AR	F	4	130	S
Arck_48	Fayetteville AR	F	4	130	S
Arck_50	Kiebler AR	F	4	132	S
Arck_51	Kiebler AR	F	4	123	T
Arck_53	Kiebler AR	F	4	117	S
Arck_55	Kiebler AR	F	4	129	S
Arck_57	Kiebler AR	F	4	130	S
Arck_58	Kiebler AR	F	4	130	S
Arck_60	Kiebler AR	F	4	130	T
Arck_63	Kiebler AR	F	4	117	S
Arck_64	Kiebler AR	F	4	130	S
Arck_65	Kiebler AR	F	4	129	S
Arck_66	Kiebler AR	F	4	123	S
Arck_67	Kiebler AR	C	4	134	S
Arck_69	Kiebler AR	S	4	126	T
Arck_70	Kiebler AR	S	4	117	S
Arck_71	Kiebler AR	S	4	130	S
Arck_72	Kiebler AR	S	4	121	S
Arck_73	Kiebler AR	S	4	120	S
Arck_74	Rower AR	S	4	130	S
Arck_75	Rower AR	S	4	123	S
Arck_77	Rower AR	S	4	122	S
Arck_79	Rower AR	S	4	119	S
Arck_81	Rower AR	S	4	130	S
Arck_82	Rower AR	S	4	127	E
Arck_83	Rower AR	S	4	129	S
Arck_85	Rower AR	S	4	130	S
Arck_86	Rower AR	S	4	118	S
Arck_89	Rower AR	V	4	125	T
Arck_36	Fayetteville AR	F	5	141	T
Arck_37	Fayetteville AR	F	5	149	S
Arck_38	Fayetteville AR	F	5	148	S
Arck_39	Fayetteville AR	F	5	148	S
Arck_40	Fayetteville AR	F	5	146	S
Arck_43	Fayetteville AR	F	5	146	U
Arck_49	Kiebler AR	F	5	148	S
Arck_52	Kiebler AR	F	5	142	U
Arck_59	Kiebler AR	F	5	142	E
Arck_61	Kiebler AR	F	5	142	T

F=folha, S=semente, C=caule, V=vagem

Tabela S2. Continuação.

Isolado	Origem	Orgão	Linhagem	Haplótipo nuclear	Haplótipo mitocondrial
Arck_62	Kiebler AR	F	5	143	T
Arck_68	Kiebler AR	C	5	142	T
Arck_76	Rower AR	S	5	140	S
Arck_80	Rower AR	S	5	145	S
Arck_87	Rower AR	S	5	144	S
171	Londrina PR	F	6	151	M
234	Passo Fundo RS	V	6	151	I
439	Formosa do Rio Preto BA	S	6	152	M
451	Formosa do Rio Preto BA	V	6	151	I
456	Formosa do Rio Preto BA	C	6	152	I
470	Formosa do Rio Preto BA	S	6	150	I
472	Formosa do Rio Preto BA	C	6	151	M
21	Alta Floresta MT	C	7	153	B
462	Formosa do Rio Preto BA	S	7	154	F
Arck_54	Kiebler AR	F	7	155	V
348	Uberlândia MG	V	IL	156	I
359	Uberlândia MG	S	IL	156	I
365	Uberlândia MG	F	IL	156	I
Arck_28	Rohwer AR	F	IL	158	E
Arck_33	Rohwer AR	F	IL	159	E
Arck_78	Rower AR	S	IL	157	S
Arck_88	Rower AR	S	IL	158	X
6	Alta Floresta MT	V			F
7	Alta Floresta MT	C			G
8	Alta Floresta MT	S			H
9	Alta Floresta MT	S			I
17	Alta Floresta MT	S			F
87	Alta Floresta MT	C			F
152	Londrina PR	F			F
163	Londrina PR	S			I
233	Passo Fundo RS	S			B
252	Passo Fundo RS	F			I
265	Passo Fundo RS	V			I
330	Uberlândia MG	S			F
340	Uberlândia MG	S			I
424	Brasília DF	C			F
Arck_56	Kiebler AR	F			E

F=folha, S=semente, C=caule, V=vagem, IL=interlinhagem

CONCLUSÕES GERAIS

Espécies de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS podem ser encontradas em plantas daninhas presentes nas lavouras de soja bem como em plantas ornamentais. Isolados de *Cercospora* obtidos da soja e de outros hospedeiros não diferem na produção de cercosporina, demonstrando o importante papel dessa toxina na patogenicidade das espécies de *Cercospora*. As mutações G143A e E198G, que conferem resistências às estrobilurinas e aos benzimidazóis, possuem maior incidência em isolados de *Cercospora* provenientes da soja que de outros hospedeiros, possivelmente devido a uma maior pressão seletiva ocasionada pela maior frequência de aplicação de fungicidas nessa cultura.

Ao todo, sete linhagens genealógicas de *Cercospora* associadas ao CFC e MPS foram encontradas nas lavouras de soja do Brasil e dois estados dos EUA. Algumas espécies pertencentes a essas linhagens puderam ser identificadas como: *C. kikuchii*, *C. alchemillicola*, *C. cf. flagellaris*, *C. cf. sigesbeckiae*, *C. sp. P* e *C. sp. Q*. Entretanto, outras espécies ainda não puderam ser identificadas. Algumas dessas linhagens são encontradas somente no Brasil ou nos EUA, enquanto que outras estão presentes nos dois países. As sete linhagens foram encontradas nas folhas, sementes e caule da soja nos dois países, comprovando não haver diferenças no padrão de agrupamento dos isolados obtidos de diferentes órgãos.

A existência de múltiplas espécies causando o CFC e MPS dificulta o trabalho de melhoristas, uma vez que todas as espécies causadoras das doenças deveriam ser testadas previamente para a liberação de cultivares de soja resistentes as duas doenças. A existência de espécies crípticas possui um risco inestimado podendo ocasionar diversos problemas de vigilância fitossanitária e de segurança alimentar.