

THAÍS CAROLINA DA SILVA DAL'SASSO

**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE *Corynespora cassicola*, UM FUNGO  
POLÍFAGO E CAUSADOR DA MANCHA ALVO**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017**

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

T

D151f  
2017 Dal'Sasso, Thaís Carolina da Silva, 1989-  
Filogeografia molecular de *Corynespora cassiicola*, um  
fungo polífago e causador da mancha alvo / Thaís Carolina da  
Silva Dal'Sasso. – Viçosa, MG, 2017.  
viii, 31f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Luiz Orlando de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fungos fitopatogênicos. 2. Filogenia. 3. Sequenciamento  
de nucleotídeo. 4. Genética. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

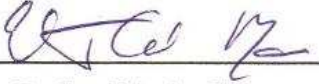
CDD 22 ed. 579.5

THAÍS CAROLINA DA SILVA DAL'SASSO


**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE *Corynespora cassiicola*, UM FUNGO  
POLÍFAGO E CAUSADOR DA MANCHA ALVO**


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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.

  
Eveline Teixeira Caixeta

  
Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

  
Thiago de Freitas Ferreira  
(Coorientador)

  
Luiz Orlando de Oliveira  
(Orientador)

*À minha mãe Maria da Aparecida,  
pelo seu amor e apoio incondicionais.  
Ao meu pai João Batista, in memoriam.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelas inúmeras bênçãos derramadas e por ser a luz que me guia e me conduz sempre ao caminho do bem.

À minha mãe, Maria da Aparecida, pelo amor incondicional e por ser um exemplo de mulher guerreira, que nunca desiste e sempre lutou comigo para que eu pudesse alcançar meus objetivos e realizar os meus sonhos.

Ao meu pai, João Batista, por ter sido um exemplo de homem bom e honesto. Sei que estaria orgulhoso dos passos que segui.

Ao meu padrasto Jair Occhi, pelo carinho, atenção e apoio em todos os momentos.

Ao professor Luiz Orlando de Oliveira, por me aceitar como membro de sua equipe desde a graduação até o mestrado. Obrigada pela orientação, ensinamentos, confiança, amizade e exemplo de profissionalismo.

Ao doutor Thiago de Freitas Ferreira, por aceitar ser parte da minha comissão orientadora, pela ajuda nos experimentos, paciência e, sobretudo, amizade.

Ao doutor Leandro Luiz Borges, por se dispor a me aconselhar e ajudar durante a condução dos experimentos e escrita da dissertação.

Aos estagiários: Marina, Riziane e Victor, pela colaboração nos experimentos, amizade e brincadeiras.

A todos os membros, visitantes e agregados do Laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia com quem convivi durante esses anos: Alberto, Alexander, Ana Maria, Ana Paula, Christina, Érica, Eric, Flávio, Guilherme, Hugo, Jefferson, Juan, Juliana, Magali, Leandro, Rafa, Tiago, Thamyres, Thiago, Prof. Valéria, Vanderson, Vanessa e tantos outros que passaram pelo “Best Lab Ever”, obrigada por tornarem a rotina da pós-graduação menos maçante e cansativa. Todas as conversas, cafezinhos e amizades foram imprescindíveis para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

A todos os meus amigos, de Viçosa, de Ubá e do intercâmbio, por torcerem por mim, pelos momentos de alegria e brincadeiras. Em especial à amiga Rafa, por tornar meus dias longe de casa mais acolhedores e por aceitar conviver comigo no trabalho e, sobretudo, em casa.

À Universidade Federal de Viçosa e a todos os professores e funcionários, que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal desde a graduação, fornecendo ensino e condições de trabalho de excelência.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PPGGM), por me permitir aprimorar meus conhecimentos e desenvolver uma pesquisa científica nessa área fascinante que é a Genética.

Ao grupo de estudos em Genética e Melhoramento (GenMelhor), por me aceitar como membro da equipe e me permitir colaborar com o desenvolvimento de atividades que, de alguma forma, busquem a melhoria do PPGGM.

A todos os funcionários, estudantes e professores do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à CAPES, FAPEMIG e FUNARBE por financiamentos que tornaram a realização deste trabalho possível.

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão desta etapa: muito obrigada!

## BIOGRAFIA

THAÍS CAROLINA DA SILVA DAL’SASSO, filha de Maria da Aparecida Silva Dal’Sasso e João Batista Dal’Sasso, nasceu em 24 de setembro de 1989, em Ubá, Minas Gerais. Concluiu o ensino médio na Escola Estadual Senador Levindo Coelho, em Ubá, em 2007.

Em março de 2009, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais. Durante a graduação, desenvolveu atividades nas linhas de pesquisa de Genética Molecular e Evolutiva de Plantas, por meio de estágio e iniciação científica.

Em janeiro de 2013, iniciou um intercâmbio acadêmico de um ano através do programa Ciência Sem Fronteiras na instituição CAH Vientum University of Applied Sciences, Países Baixos. Durante este período, foi estagiária em Cardiff University, País de Gales, Reino Unido, desenvolvendo atividades na área de Ecologia de Plantas.

Em janeiro de 2014, concluiu o intercâmbio, recebendo certificado de conclusão de curso em “International Horticulture and Management”. Em julho de 2015, graduou-se pela UFV, recebendo o título de Engenheira Agrônoma.

Em agosto de 2015, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração Genética Molecular e de Microrganismos, em nível de mestrado, na UFV, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, no dia 23 de fevereiro de 2017, com defesa de dissertação.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAIS E MÉTODOS .....	4
1. Composição da coleção e isolamento fúngicos .....	4
2. Extração de DNA genômico e reações de amplificação de genes específicos via PCR .....	5
3. Alinhamento das sequências de DNA e de aminoácidos .....	7
4. Montagem dos bancos de dados .....	8
5. Análises de filogenia Bayesiana .....	9
6. Análises filogeográficas, índices de diversidade molecular e teste de neutralidade .....	9
7. Análise da presença de recombinantes .....	10
8. Detecção dos mutantes resistentes .....	10
RESULTADOS .....	11
1. Detecção das isoformas da cassiicolina dentro da coleção .....	11
2. Análise filogenética dos genes da cassiicolina .....	12
3. As análises filogenéticas revelaram três linhagens genealógicas .....	15
4. Associação entre linhagens filogenéticas e isoformas da cassiicolina .....	17
5. Análises de rede – genes nucleares .....	17
6. Análises de rede – gene mitocondrial <i>cyb</i> .....	19
7. Medidas de diversidade nucleotídica e análise de recombinação .....	19
8. Presença das mutações pontuais E198A, F200Y e G143A .....	20
discussão .....	21
1. As três linhagens não estão associadas a hospedeiros ou origem geográfica dos isolados .....	21
2. Associação entre isoformas da cassiicolina e as três linhagens .....	22
3. Ocorrência de mutações e implicações para o manejo do patógeno .....	23
REFERÊNCIAS .....	25
MATERIAL SUPLEMENTAR .....	30

## RESUMO

DAL’SASSO, Thaís Carolina da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Filogeografia molecular de *Corynespora cassiicola*, um fungo polífago e causador da mancha alvo.** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Coorientador: Thiago de Freitas Ferreira.

O fungo fitopatogênico *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei é uma espécie cosmopolita com relatos de ocorrência em folhas, hastes e raízes em diversas espécies de plantas, sendo frequentemente associada como agente causal da mancha alvo em diferentes espécies de importância agrônômica. Este estudo analisou uma coleção de 32 isolados de *C. cassiicola*, obtidos de diferentes hospedeiros e locais no Brasil. Sete genes nucleares e um gene mitocondrial foram parcialmente sequenciados e analisados de modo a explorar as relações filogenéticas e filogeográficas entre os isolados e verificar se existe associação entre o gene precursor da toxina produzida pelo fungo, a cassicolina, e as linhagens encontradas. Adicionalmente, a presença de mutações pontuais independentes – E198A, F200Y e G143A – que conferem resistência a fungicidas foram investigadas. Os isolados se agruparam em três linhagens. A distribuição dos isolados entre as linhagens não esteve associada a hospedeiro ou origem geográfica dos isolados. Isolados da coleção contêm uma de quatro possíveis isoformas da cassicolina. Em geral, associação entre as isoformas e clados filogenéticos foi ausente. As três mutações pontuais que conferem resistência a fungicidas estão presentes (sozinhas ou combinadas) em oito isolados. Duas dessas mutações (E198A e F200Y) nunca haviam sido identificadas em isolados de *C. cassiicola*. As evidências de variabilidade genética entre os isolados e a ocorrência de três mutações pontuais independentes, em conjunto com o hábito polífago de *C. cassiicola*, comprometem as atuais práticas de manejo da doença na agricultura brasileira. As informações obtidas neste estudo poderão ser úteis em análises ecológicas e epidemiológicas de *C. cassiicola*, bem como no desenvolvimento de medidas de manejo da mancha alvo.

## ABSTRACT

DAL'SASSO, Thaís Carolina da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Molecular phylogeography of *Corynespora cassiicola*, a polyphagous fungus that causes the target spot.** Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Co-adviser: Thiago de Freitas Ferreira.

The plant pathogenic fungus *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei is a cosmopolitan species with reports of occurrence in leaves, stems and roots in several plant species, being frequently associated as the causal agent of the target spot in different plant species of agronomic importance. This study analyzed a collection of 32 isolates of *C. cassiicola* obtained from different hosts and locations in Brazil. Seven nuclear genes and a mitochondrial gene were partially sequenced and analyzed in order to explore the phylogenetic and phylogeographic relationships among the isolates and to verify if there is an association between the precursor gene of the toxin produced by the fungus, the cassiicolin, and the lineages we found. Additionally, the presence of independent point mutations - E198A, F200Y and G143A - that confer resistance to fungicides were investigated. The isolates were grouped into three lineages. The distribution of the isolates between the lineages was neither associated with host nor geographical origin of the isolates. The isolates of the collection contain one of four possible cassiicolin isoforms. In general, association between isoforms and phylogenetic clades was absent. The three point mutations that confer resistance to fungicides were present (alone or in combination) in eight isolates. Two of these mutations (E198A and F200Y) had never been identified in isolates of *C. cassiicola*. The evidence of genetic variability among the isolates and the occurrence of three independent point mutations, along with the polyphagous habit of *C. cassiicola*, compromise the current disease management practices in the Brazilian agriculture. Therefore, the information generated may be useful in ecological and epidemiological analysis of *C. cassiicola*, as well as in the development of management measures against the target spot.

## INTRODUÇÃO

*Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei é um fungo pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Dothiomycetes*, na ordem *Pleosporales* (Schoch et al., 2009). A espécie é cosmopolita, frequentemente abundante nos trópicos, com relatos de ocorrência em folhas, hastes e raízes de diversos hospedeiros (Farr e Rossman, 2016; Shimomoto et al., 2011). O fungo é capaz de infectar mais de 530 espécies de plantas de 380 gêneros diferentes (Dixon et al., 2009), sendo que muitas dessas espécies apresentam grande importância econômica, com destaque para: seringueira (Wei, 1950), soja (Kilpatrick e Johnson, 1953), algodão (Norse, 1974), pepino (Norse, 1974), feijão (Williams e Liu, 1976), eucalipto (Crous et al., 1989), tomate (Dixon et al., 2009), café (Souza et al., 2009).

O fungo é considerado um dos mais destrutivos patógenos em plantações de seringueira no leste asiático, causando epidemias esporádicas e elevadas perdas econômicas nos campos comerciais da cultura (Déon et al., 2012a). No Brasil, *C. cassiicola* já foi isolado de folhas de seringueira não sintomáticas obtidas em plantios comerciais no estado da Bahia (Déon et al., 2012b), embora nenhuma epidemia ainda tenha sido registrada no país. No Japão, *C. cassiicola* tem sido responsável por danos severos nas culturas de pepino (*Cucumis sativus*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (Shimomoto et al., 2011). No Brasil, *C. cassiicola* tem sido o patógeno responsável por perdas cada vez maiores em culturas como a soja (*Glycine max*) e algodão (*Gossypium hirsutum*) (Almeida et al., 2005; Galbieri et al., 2014) com perdas de rendimento podendo chegar a 20-30% (Kreycki e Mentem, 2013).

Os sintomas mais comuns causados por *C. cassiicola* caracterizam-se por manchas de formato circular nas folhas. Essas manchas geralmente apresentam anéis concêntricos, halo amarelado e centro escuro, lembrando o formato de um alvo (Almeida et al., 2005).

*Corynespora cassiicola* é isolado de tecidos vegetais apresentando sintomas típicos da mancha alvo. A espécie também pode ser saprófita ou endofítico, sendo neste caso encontrado em restos de materiais orgânicos ou de tecidos vivos não sintomáticos (Déon et al., 2014). Essa característica combinada

ao grande número de hospedeiros conhecidos de *C. cassiicola* contribuem para a sobrevivência do patógeno no campo por longos períodos (Déon et al., 2012a, Pernezny e Simone, 1999).

Assim como outras espécies de fungos fitopatogênicos, *C. cassiicola* produz uma toxina fitotóxica denominada cassiicolina, inicialmente descrita a partir de isolado obtido de seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Breton et al., 2000; Onesirosan et al., 1975). A cassiicolina é uma toxina hospedeiro-específica, que compartilha a mesma gama de hospedeiros do fungo da qual foi isolada. Essa toxina desempenha papel importante na patogenicidade de *C. cassiicola*, podendo levar à plasmólise celular e, em casos extremos, ao rompimento da membrana plasmática (Barthe et al., 2007).

O gene que codifica a cassiicolina é expresso na fase inicial da infecção, imediatamente antes da ocorrência dos primeiros sintomas (Déon et al., 2012a). Até o momento, seis isoformas da cassiicolina são conhecidas (cas1, cas2, cas3, cas4, cas5 e cas6), sendo as isoformas 1, 3, 4 e 5 relatadas apenas em isolados obtidos de seringueira e as isoformas 2 e 6 relatadas em isolados de diferentes hospedeiros, tais como soja e algodão (Déon et al., 2014). Em casos raros, é possível haver dois genes codificando duas isoformas em um mesmo isolado; no entanto, em muitos isolados, nenhum gene precursor da cassiicolina é detectável, sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos na virulência de *C. cassiicola* (Déon et al., 2014).

A caracterização correta e o entendimento da variabilidade genética de *C. cassiicola* são elementos chaves para análises ecológicas, bem como o desenvolvimento de medidas de manejo da doença (Shimomoto et al., 2011). Sendo assim, diversos estudos de diversidade genética envolvendo *C. cassiicola* têm sido desenvolvidos. Em um dos estudos mais abrangentes de diversidade genética de *C. cassiicola*, Dixon et al. (2009) avaliaram 143 isolados provenientes de diversas regiões geográficas e de hospedeiros diferentes, fornecendo uma amostragem global da variabilidade genética da espécie. Foram encontradas seis linhagens genealógicas de *C. cassiicola*, sendo estas positivamente relacionadas com o hospedeiro de origem, patogenicidade e taxa de crescimento. Nenhuma correlação entre os dados filogenéticos e a localização geográfica foi observada, fornecendo evidências para um recente movimento global dos isolados das

linhagens filogenéticas (Dixon et al., 2009).

Em uma tentativa de relacionar a diversidade do gene precursor da cassiicolina com linhagens genealógicas do fungo, uma investigação mais recente comparou resultados de análises filogenéticas das seis isoformas conhecidas da cassiicolina com análises filogenéticas que fizeram uso conjunto dos genes actina e ITS e de marcadores microssatélites para os locos *caa5* e *ga4* (Déon et al., 2014). O estudo mostrou haver associação entre as linhagens filogenéticas e as isoformas do gene precursor da cassiicolina, com isolados portadores de determinada isoforma da cassiicolina alocados dentro do mesmo clado filogenético. Adicionalmente, foram encontrados indícios de especialização de hospedeiros e a diferenciação geográfica dos isolados (Déon et al., 2014). Isso sugere que o gene precursor da cassiicolina contribui significativamente para a estruturação genética de *C. cassiicola*, sendo este gene importante na biologia e na evolução do fungo.

Com relação ao controle da doença, diversas estratégias são recomendadas, tais como o uso de cultivares resistentes, tratamento de sementes, rotação/sucessão de culturas e pulverizações com fungicidas (Pernezny e Simone, 1999; Almeida et al., 2005). Embora tratamentos com fungicidas sejam o componente chave no manejo integrado de vários patógenos, incluindo *C. cassiicola*, o aparecimento de genótipos resistentes é um fator limitante da eficácia e da vida útil dos fungicidas desenvolvidos a custos cada vez mais elevados (Ma e Michailides, 2005).

A resistência a fungicidas pode ser conferida por diferentes mecanismos, incluindo um sítio alvo alterado, o que reduz a ligação do fungicida, e a síntese de uma enzima alternativa capaz de substituir a enzima-alvo (Ma e Michailides, 2005). Algumas mutações pontuais na sequência de DNA são amplamente reconhecidas por conferirem resistência a fungicidas, tais como: i) E198A/G/K e F200Y, que surgem no gene que codifica  $\beta$ -tubulina e conferem resistência a fungicidas da classe dos benzimidazóis; ii) G143A, no gene que codifica citocromo B e conferem resistência às estrobilurinas (FRAC, 2016).

Embora existam relatos da ocorrência da mutação G143A em isolados de *C. cassiicola* provenientes de cultivos de pepino em ambiente protegido no Japão (Ishii, 2006; Ishii et al., 2007), não há relatos de ocorrência desta ou de outras

mutações pontuais que conferem resistência a fungicidas em populações do fungo associadas a outras culturas. Diante do alto risco de desenvolvimento de resistência em patógenos-alvo, é plausível que existam isolados mutantes em território brasileiro. Logo, o monitoramento de populações de *C. cassiicola* é imprescindível para a verificação da ocorrência desses mutantes e a sua frequência de modo a elaborar formas de manejo da doença que garantam a eficiência do controle químico por períodos de tempo mais longos.

O presente trabalho utiliza ferramentas de filogenia Bayesiana e filogeografia molecular para avaliar isolados de origem brasileira e responder as seguintes perguntas: i) Quais as relações filogenéticas entre isolados de *C. cassiicola* obtidos de diferentes hospedeiros? ii) Existe associação entre as isoformas do gene que codifica para a cassiicolina e clados filogenéticos? iii) As mutações pontuais que conferem resistência aos fungicidas da classe dos benzimidazóis (E198A e F200Y) e das estrobilurinas (G143A) em isolados de *C. cassiicola* estão presentes no Brasil?

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Composição da coleção e isolamento fúngicos

Foram utilizados neste estudo 29 isolados de *C. cassiicola* obtidos de diferentes hospedeiros e oriundos de diferentes regiões geográficas do Brasil. Adicionalmente, foram incluídos três isolados de *C. cassiicola* obtidos de pepino proveniente do Japão. No total, formou-se uma coleção de 32 isolados, que foram obtidos entre os anos de 1997 e 2016. Desses, 26 isolados foram gentilmente cedidos pelo Dr. Álvaro M. R. Almeida, EMBRAPA SOJA. O isolamento foi realizado de folhas sintomáticas que foram lavadas sequencialmente com soluções de etanol 70% (v/v) por 1 min., hipoclorito sódio 1,5% (v/v) por 1 min. e duas lavagens em água destilada autoclavada por 1 min. As folhas foram colocadas em câmara úmida por 48 h a  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  de modo a induzir a esporulação do patógeno. Posteriormente, as lesões dos tecidos foram avaliadas sob microscópio estereoscópico (Olympus SZ-40, Tóquio, Japão). Com o auxílio de uma agulha, os conídios típicos de *C. cassiicola* foram coletados e espalhados sobre uma placa de Petri (90 mm x 15 mm) contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e solução

de ácido clorídrico 0,1M. As placas foram, então, mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h por 10 dias a  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  para crescimento das colônias.

Para garantir a uniformidade genética, os isolados foram convertidos em isolados monospóricos. Colônias de aproximadamente 10 dias foram avaliadas sob microscópio estereoscópico. Com o auxílio de uma agulha, conídios mais jovens foram raspados da placa de Petri e espalhados sobre uma nova placa de Petri contendo meio BDA e solução de ácido clorídrico 0,1M e 400  $\mu\text{L}$  de água destilada autoclavada sobre a superfície do meio. Após cerca de 30 min., as placas foram analisadas novamente sob o microscópio estereoscópico para a identificação de esporos típicos de *C. cassiicola*. Uma vez identificados e com auxílio de uma agulha, um pequeno bloco de meio contendo um único esporo foi cortado e levado para uma nova placa de Petri, sendo esta incubada a  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 h por 10 dias para crescimento da colônia a partir de um único esporo.

Todos os isolados encontram-se preservados em solução de glicerol 30% (v/v) e mantidos em  $-80^{\circ}\text{C}$ , em papéis desidratados em sílica gel (Smith e Onions, 1994) como parte da coleção micológica do Laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa (UFV). Todos os isolados utilizados neste estudo e seus respectivos códigos, espécies hospedeiras, ano e local de amostragem são mostrados na Tabela S1.

## **2. Extração de DNA genômico e reações de amplificação de genes específicos via PCR**

Após crescimento das colônias em meio BDA por 10 dias a  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente 200mg de micélio foram removidos de cada cultura para realizar a extração de DNA genômico total pelo método CTAB conforme protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). A concentração dos ácidos nucleicos foi determinada em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies). Posteriormente, o DNA genômico foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso subsequente.

As amplificações de DNA foram conduzidas por meio da ‘*Polymerase*

*Chain Reaction*' (PCR) utilizando pares de *primers* específicos para o gene mitocondrial citocromo B (*cyb*) e para os seguintes sete genes nucleares: actina (*act*), cassiicolina (*cas*), histona H3 (*his*), espaçadores internos transcritos e subunidade 5.8S nrDNA (ITS), fator de alongação 1- $\alpha$  (*tef*), *minichromosome maintenance complex component 7* (*mcm7*) e  $\beta$ -tubulina (*tub*).

Para a amplificação dos genes *cas* e *mcm7*, foi necessário o desenho de pares de *primers*. Para o gene *cas*, foram utilizadas sequências do gene precursor da cassiicola previamente publicadas e depositadas no GenBank por Déon et al. (2014). As sequências dos acessos JF915148, JF915160, JF915164, JF915167, JF915168, JF915170, JF915171, JF915174, JF915181, JF915183 foram importadas e alinhadas no programa Sequencher versão 4.8 (Gene Codes Corp.) e o programa Primer3 Plus (Andreas et al., 2007) foi utilizado para desenhar os primers CasF1 (5' – CCTGTCCYATAYATTTGCTAC – 3') e CasR1 (5' – TGTAARRAGTGTGGTGT – 3'). Para o gene *mcm7*, foi utilizada a sequência do gene do genoma de *C. cassiicola* sequenciado (Grigoriev et al., 2013) e a sequência do gene previamente publicada para a espécie (Schmitt et al., 2009). As sequências do gene para o genoma de *C. cassiicola* disponível no MycoCosm (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) e do acesso JN672981 disponível no GenBank foram importadas e alinhadas no programa Sequencher versão 4.8 (Gene Codes Corp.) e o programa Primer3 Plus (Andreas et al., 2007) foi utilizado para desenhar os primers CoryMCM7\_F2 (5' - CCTGTCACGACCAAGCAGT - 3') e CoryMCM7\_R1 (5' - CACGAATACGCATTCCATCA - 3'). Os primers utilizados neste trabalho estão listados na Tabela S2.

As amostras foram amplificadas utilizando termociclador BioRad T100™ (BioRad Laboratories, Inc.) num volume final de 25  $\mu$ L contendo os reagentes nas seguintes concentrações: Tampão Green GoTaq 1X (Promega Corporation); 0,05 mM de cada dNTP (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific Inc.); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2  $\mu$ M de cada *primer* (IDT, Integrated DNA Technologies Inc.), 80 ng de DNA genômico e 1,25 unidades de GoTaq Flexi DNA polimerase (Promega). Para os genes *act*, *his* e ITS, as reações também foram compostas pela adição de 3% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich Co.). Os ciclos de amplificação para os genes ITS e *tub* foram: 94°C por 3 min.; 35 ciclos compostos de desnaturação a

94°C por 30 s, anelamento dos primers a 55-56°C (Tabela S2) por 30 s e extensão a 72°C por 90 s; extensão final a 72°C por 7 min. Os ciclos de amplificação para o gene *cyb*: 94°C por 3 min.; 35 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento dos primers a 42°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min.; extensão final a 72°C por 7 min. Para os demais *primers*, 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 48-58°C (Tabela S2) por 30 s e extensão a 72°C por 1 min.; extensão final a 72°C por 7 min.

Os produtos de PCR obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídeo em solução tampão TBE 1X (500 mM Tris-HCl, 60 mM ácido bórico e 83 mM EDTA) a 100 V por 40 min. juntamente com marcador de DNA 100 pb (Promega). Sob fluorescência UV (L-Pix Image Systems, Loccus Biotecnology), um único fragmento no tamanho esperado para cada gene foi visualizado. Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit ExoSap-IT (GE Healthcare), seguindo a recomendação do fabricante, e enviados para serem sequenciados. O serviço de sequenciamento foi conduzido pela empresa Macrogen (Macrogen Inc., Coreia do Sul), utilizando *primers* usados em amplificações de PCR.

### **3. Alinhamento das sequências de DNA e de aminoácidos**

As sequências foram importadas e alinhadas no programa Sequencher versão 4.8 (Gene Codes Corp.). Intervalos entre os nucleotídeos foram inseridos manualmente de modo a compensar a presença de inserções e deleções (*indels*). Finalmente, as extremidades das sequências foram aparadas de modo a eliminar segmentos não obtidos para todas as sequências. O banco de dados continha sequências dos genes *cas* (Déon et al., 2014) disponíveis no GenBank, sendo sequências de três isolados (55\_BR\_Gm, 57\_BR\_Gm e 59\_BR\_Gh) incorporadas duas vezes por apresentarem simultaneamente duas cópias diferentes do gene.

Para a detecção das diferentes isoformas da proteína cassiicolina presentes entre os 18 isolados que amplificaram para o gene *cas*, sequências homólogas das seis isoformas conhecidas do gene (Déon et al., 2014) foram selecionadas como referência (acessos JF915148, JF915168, JF915170, JF915172, JF915176, JF915181). A dedução dos aminoácidos foi conduzida no programa Sequencher

versão 4.8 (Gene Codes Corp.) e as sequências de aminoácidos preditos foram alinhadas no programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

#### 4. Montagem dos bancos de dados

Diferentes conjuntos de dados foram montados de acordo com a necessidade particular de cada análise. Por isso, foram montados um total de 13 conjuntos de dados.

O conjunto de dados 1 (N=33, 3121 pb) contém informações de seis genes nucleares (*act*, *his*, ITS, *mcm7*, *tef* e *tub*) e explora as relações filogenéticas entre os 32 isolados obtidos para este estudo.

O conjunto de dados 2 (N=39, 458pb) contém informações do gene *cas* e explora as relações filogenéticas entre 18 isolados desta coleção que amplificaram para o gene e 18 isolados obtidos do GenBank cujas isoformas do gene precursor da cassiicolina são conhecidas (Déon et al., 2014).

Para as análises de rede foram criados dois conjuntos de dados, para informações dos genomas nuclear e mitocondrial, respectivamente. O conjunto 3 (N = 32, 3105 pb) foi composto por seis genes nucleares concatenados (*act*, *his*, ITS, *mcm7*, *tef* e *tub*), enquanto que o conjunto 4 (N = 23, 676 pb) contém o fragmento do gene mitocondrial *cyb*.

Para as análises da presença de recombinantes intragênicos, dividiu-se o conjunto de dados 3 em seis subconjuntos, cada um correspondente a um dos genes nucleares: conjunto 5 (N = 32, 287 pb) ; conjunto 6 (N = 29, 341 pb); conjunto 7 (N = 32, 499 pb); conjunto 8 (N = 32, 474 pb); conjunto 9 (N= 31, 573 pb) e conjunto 10 (N = 32, 948 pb)) referentes aos genes *act*, *his*, ITS, *mcm7*, *tef* e *tub*, respectivamente.

Para as análises de diversidade molecular, condução dos testes de neutralidade e análise da presença de recombinantes dentro das linhagens, dividiu-se o conjunto de dados 3 em três subconjuntos (conjunto 11 (N = 6, 3105 pb), conjunto 12 (N = 4, 3105 pb) e conjunto 13 (N = 22, 3105 pb)), referentes à cada uma das três linhagens (1, 2 e 3, respectivamente) que foram reveladas nas análises anteriores. Deste modo, foi analisada a variação molecular dentro de cada uma das linhagens.

## 5. Análises de filogenia Bayesiana

As relações filogenéticas entre os isolados de *C. cassicola* foram inferidas por filogenia Bayesiana. Os conjuntos de sequências de cada um dos seis genes nucleares (conjunto de dados 1) e as sequências do gene *cas* (conjunto de dados 2) foram introduzidos independentemente no programa MrModeltest v.2.3 (Nylander, 2004). O critério de informação de Akaike (Akaike, 1973) foi utilizado para identificar o modelo de evolução mais adequado dentre os 24 modelos de evolução molecular disponíveis para cada um dos subconjuntos. Para o conjunto de dados 1, foram adotados os seguintes modelos de evolução: GTR (para os genes *act* e *tef*), HKY (*his* e ITS), HKY+I (*tub*) e SYM+I (*mcm7*). Para o conjunto de dados 2, foi adotado o modelo de evolução HKY+I (gene *cas*).

As relações filogenéticas foram inferidas por filogenia Bayesiana numa análise particionada. As análises de filogenia Bayesiana foram conduzidas no programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), utilizando duas corridas simultâneas com dez 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 entre as duas corridas foi diagnosticada pela divergência nos desvios padrões das duas corridas e pelo tamanho amostral de cada parâmetro, analisado no programa Tracer v.1.6 (Drummond et al., 2012). A árvore consenso foi construída após o descarte das 250 árvores iniciais, bem como a obtenção da probabilidade posterior dos clados. As árvores filogenéticas foram visualizadas no programa FigTree v.1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## 6. Análises filogeográficas, índices de diversidade molecular e teste de neutralidade

A genealogia dos genes foi inferida usando o método *Median-Joining* (Bandelt et al., 1999) implementado no programa Network 4.613 (Fluxus Technology Ltd.). A análise de rede foi realizada para os conjuntos de dados 3 e 4 e *indels* foram considerados como sendo um quinto caráter e codificado de modo

que cada *indel*, independente do tamanho, foi considerado como uma mutação única.

Os índices de diversidade molecular: número de haplótipos (H), diversidade de gênica ( $H_d$ ), diversidade nucleotídica ( $P_i$ ), média da diversidade nucleotídica (K) e número de sítios variáveis (S) foram estimados e o teste D de Tajima (Tajima, 1989) foi conduzido utilizando o programa DNAsp v.5.10.1 (Librado e Rozas, 2009). As análises foram conduzidas nos bancos de dados 3, 11 - 13.

## **7. Análise da presença de recombinantes**

As análises de recombinação foram conduzidas no programa RDP4 v.4.56 (Martin et al., 2015). Como entrada foram utilizados os bancos de dados 3, 5 – 13 e a 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.

## **8. Detecção dos mutantes resistentes**

A identificação dos mutantes, portadores das mutações que conferem resistência aos benzimidazóis (E198A e F200Y) e estrobilurinas (G143A), foi obtida com base na análise dos dados de sequenciamento dos genes da  $\beta$ -tubulina e citocromo B, respectivamente. A identificação dos polimorfismos já descritos na literatura como responsáveis pela resistência aos fungicidas em estudo foi feita pela análise manual do alinhamento realizado no programa Sequencher v. 4.8 (Gene Codes Corp.).

## RESULTADOS

### 1. Detecção das isoformas da cassiicolina dentro da coleção

A amplificação via PCR possibilitou identificar que 18 dos 32 isolados de *C. cassiicola*, equivalente a 56,25%, possuem um gene que codifica para cassiicolina. Não foi observada a presença de duas isoformas coexistindo em um mesmo isolado.

O alinhamento das sequências preditas de aminoácidos dos 18 isolados comparadas às isoformas conhecidas da cassiicolina revelou que a coleção de isolados investigada neste estudo conta com quatro isoformas para o gene *cas*: *cas1*, *cas2*, *cas3* e *cas6* (Figura 1).

A isoforma 2 foi a mais frequente, presente em oito isolados obtidos de diferentes hospedeiros: cinco isolados de pepino (*Cucumis sativus*), um isolado de soja (*Glycine max*), um isolado de trapoeraba (*Commelina benghalensis*) e um isolado de hortêncica (*Hydrangea macropylla*). A isoforma 6 foi a segunda mais frequente, presente em seis isolados, todos obtidos de soja.

As isoformas 1 e 3 ocorreram em dois isolados cada uma. A isoforma 1 foi encontrada em dois isolados de algodão (*Gossypium hirsutum*) e a isoforma 3 ocorreu em um isolado de hortêncica e um de *Rudbeckia* sp.

Dentre os 18 isolados que possuem alguma isoforma da cassiicolina, 14 foram obtidos de plantas de importância agrônômica (soja, algodão e pepino), três de plantas ornamentais (hortêncica e *Rudbeckia* sp.) e um de uma planta daninha (trapoeraba).

```

cas1  MKYLPILISAFVAAVAAAPQDPSAV-APVLPRTCVSCVNFNGNFCGDNC-GNSWACSGC
Cc_31 ????????.
Cc_32 ????????.
cas2  .....F.....V.....AA.AI.....S.....D.....
Cc_01 ???????F.....V.....AA.AI.....S.....D.....
Cc_05 ???????F.....V.....AA.AI.....S.....D.....
Cc_07 ???????F.....V.....AA.AI.....S.....D.....
Cc_08 ???????F.....V.....AA.AI.....S.....D.....
Cc_19 ???????F.....V.....AA.AI.....S.....D.....
Cc_25 ???????F.....V.....AA.AI.....S.....D.....
Cc_26 ???????F.....V.....AA.AI.....S.....D.....
Cc_27 ???????F.....V.....AA.AI.....S.....D.....
cas3  .....IT.....L.....S.....
Cc_11 ????????.IT.....L.....S.....
Cc_28 ????????.IT.....L.....S.....
cas6  ...F.....G...A.A.....AF.EY...Y..NT.T.D...N.
Cc_04 ????????.G...A.A.....AF.EY...Y..NT.T.D...N.
Cc_12 ????????.G...A.A.....AF.EY...Y..NT.T.D...N.
Cc_13 ????????.G...A.A.....AF.EY...Y..NT.T.D...N.
Cc_29 ????????.G...A.A.....AF.EY...Y..NT.T.D...N.
Cc_30 ????????.G...A.A.....AF.EY...Y..NT.T.D...N.
Cc_35 ????????.G...A.A.....AF.EY...Y..NT.T.D...N.
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1         11        21        31        41        51

```

**Figura 1.** Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas precursoras da cassiicolina (cas1, cas2, cas3 e cas6) e das sequências de aminoácidos deduzidos para as proteínas de 18 isolados de *C. cassiicola*. Em cas1, os aminoácidos em negrito indicam o domínio maduro da cassiicolina; sublinhado está o peptídeo sinal. Pontos (.) indicam aminoácidos idênticos a aminoácidos de cas1, interrogações (?) indicam que a dedução do aminoácido não foi possível a partir do fragmento de DNA disponível para análise.

## 2. Análise filogenética dos genes da cassiicolina

A filogenia Bayesiana para as sequências do gene *cas* dos 18 isolados da coleção que apresentaram o gene, em conjunto com isolados depositados no GenBank por Déon et al. (2014), mostrou a formação de seis clados, com suporte acima de 83% em probabilidade superior (PP), que correspondem às seis isoformas da cassiicolina (Figura 2).

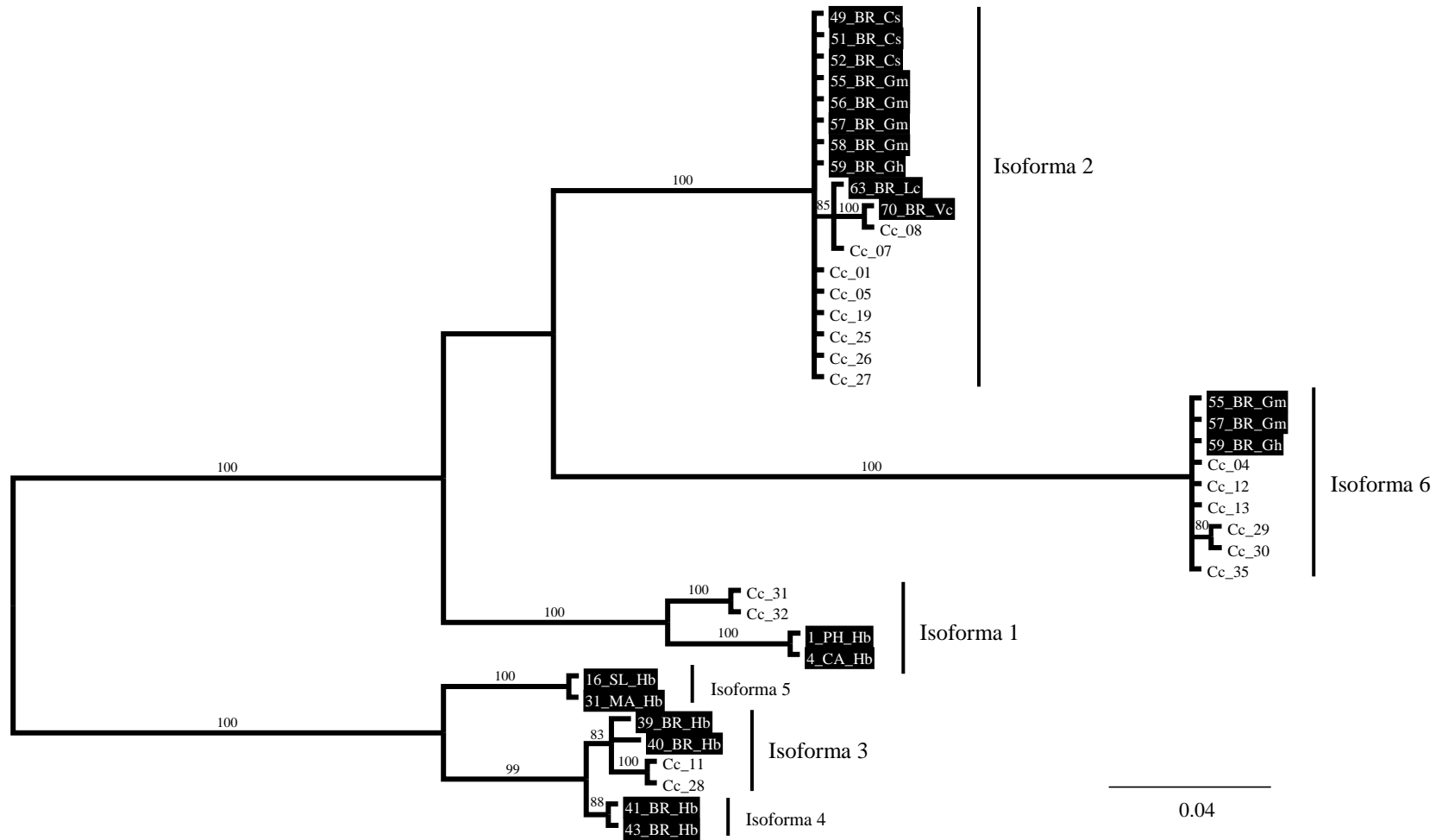
O clado da isoforma 1 inclui os isolados Cc\_31 e Cc\_32, obtidos de algodão, e dois isolados de referência portadores de cas1, obtidos de seringueira. Está é a primeira vez que isoforma 1 é descrita em isolados que não sejam de seringueira.

O clado da isoforma 2 inclui os oito isolados da coleção (Figura 2) e dez isolados de referência portadores de cas2. Tanto os isolados de referência quanto os isolados da coleção foram obtidos de hospedeiros diversos.

O clado da isoforma 3 inclui os isolados Cc\_11 e Cc\_28, obtidos de *Rudbeckia* sp. e boldo (*Plectranthus barbatus*), respectivamente, e dois isolados de referência portadores de cas3, obtidos de seringueira. Está é a primeira vez que isoforma 3 é descrita em isolados que não sejam de seringueira.

Os cladogramas das isoformas 4 e 5 foram compostos unicamente por isolados de referência obtidos de seringueira, uma vez que nenhum dos 18 isolados da coleção possui as isoformas 4 ou 5 de acordo com o alinhamento dos aminoácidos deduzidos a partir das sequências de DNA (Figura 1).

O clado da isoforma 6 inclui seis isolados da coleção (Figura 2) e três isolados de referência portadores de cas6. Todos os isolados da coleção e dois isolados de referência foram obtidos de soja, o terceiro isolado de referência foi obtido de algodão.



**Figura 2.** Filogenia Bayesiana dos genes precursores da cassiicolina de isolados de *C. cassicola* de diferentes hospedeiros. O banco de dados utilizado na análise foi criado a partir de fragmentos de 458 pb. O comprimento dos ramos foi desenhado em escala e a confiabilidade dos nós é expressa em probabilidade posterior (%) em cima dos ramos (quando  $\geq 80\%$ ). A barra de escala corresponde ao número esperado de substituições por sítio. Barras verticais em frente aos ramos identificam as isoformas da cassiicolina. Os isolados destacados pela cor preta são oriundos do trabalho de Déon et al. (2014).

### 3. As análises filogenéticas revelaram três linhagens genealógicas

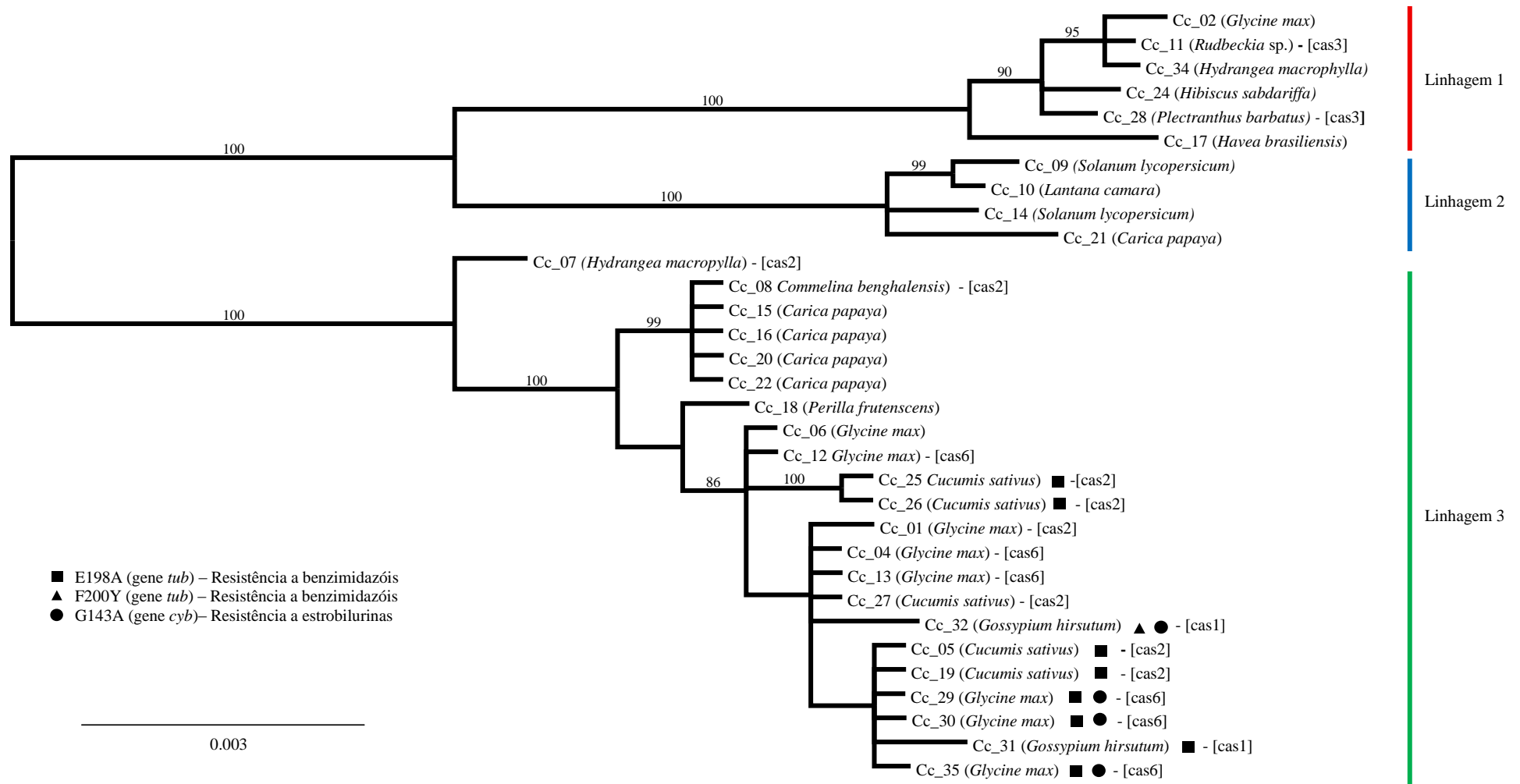
A filogenia Bayesiana baseada em seis genes (*act*, *his*, ITS, *mcm7*, *tef* e *tub*) mostrou três clados principais com 100% de suporte em PP (Figura 3).

O primeiro clado, denominado linhagem 1, foi composto por um subgrupo (PP=95%) formado por isolados obtidos de soja, hortêncica e *Rudbeckia* sp.; um subgrupo (PP=90%) por isolados de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) e um último subgrupo composto pelo isolado de seringueira. Os isolados desta linhagem foram coletados nos estados do Paraná, Minas Gerais, Amazonas e Maranhão.

O segundo clado, denominado Linhagem 2, foi composto por um subgrupo (PP=99%) composto por um isolado de tomate (*Solanum lycopersicum*) e um de camará (*Lantana camara*). A linhagem 2 também foi composta por um isolado de mamão (*Carica papaya*) e um segundo isolado de tomate. Os isolados desta linhagem foram coletados nos estados do Amazonas, Maranhão e Minas Gerais.

O terceiro clado, denominado linhagem 3, foi predominantemente maior, contendo 21 dos 32 isolados, o que corresponde a 65,63% dos isolados. A Linhagem 3 foi dividida em três subgrupos. O subgrupo maior (PP=86%) foi composto por isolados obtidos de soja, algodão e pepino, sendo os isolados deste subgrupo provenientes dos estados de Paraná, Mato Grosso e Goiás e os dois isolados de pepino provenientes do Japão (que formaram um grupo com 100% de suporte em PP). O segundo subgrupo foi composto pelo isolado japonês obtido de perilla (*Perilla frutescens*). O terceiro subgrupo (PP=99%), composto por quatro isolados obtidos de mamão e um isolado obtido de trapoeraba coletados nos estados do Amazonas e Maranhão.

O isolado Cc\_07 obtido de hortêncica, coletado no estado do Maranhão, não se agrupou com outro isolado neste estudo.



**Figura 3.** Filogenia Bayesiana (árvore consenso) mostrando as relações filogenéticas entre isolados de *C. cassiicola*. Os isolados foram obtidos a partir de diferentes hospedeiros, que estão indicados após o código do isolado. O banco de dados utilizado na análise foi criado a partir da concatenação dos fragmentos de seis genes (*act*, *his*, ITS, *mcm7*, *tef* e *tub*) e contém 3121 pb. O comprimento dos ramos foi desenhado em escala e a confiabilidade dos nós é expressa em probabilidade posterior (%) em cima dos ramos (quando  $\geq 85\%$ ). A barra de escala corresponde ao número esperado de substituição por sítio. Barras verticais em frente aos ramos identificam três linhagens genealógicas: vermelho, linhagem 1; azul, linhagem 2; verde, linhagem 3. A presença de mutações pontuais (E198A, F200Y e G143A) que conferem resistência a fungicidas está indicada conforme legenda. Entre colchetes é indicada a isoforma do gene precursor da cassiicolina quando este estiver presente no isolado. Código dos genes: *act*, actina; *his*, histona H3; ITS, espaçadores internos transcritos e subunidade 5.8S nrDNA; *mcm7*, *minichromosome maintenance complex component 7*; *tef*, fator de alongação 1- $\alpha$ ; *tub*,  $\beta$ -tubulina; *cyb*, citocromo B.

#### **4. Associação entre linhagens filogenéticas e isoformas da cassiicolina**

As análises com base nas sequências de aminoácidos preditos para sequências de DNA revelaram a presença das isoformas cas1, cas2, cas3 e cas6 em 18 dos 32 isolados de *C. cassiicola* (Figura 1). Sendo, isoforma cas1 (isolados Cc\_31, Cc\_32); cas2 (Cc\_01, Cc\_05, Cc\_07, Cc\_08, Cc\_19, Cc\_25, Cc\_26, Cc\_27); cas3 (Cc\_11, Cc\_28) e cas6 (Cc\_04, Cc\_12, Cc\_13, Cc\_29, Cc\_30, Cc\_35).

Os dois isolados de algodão (Cc\_31 e Cc\_32) que carregam a isoforma 1 estão localizados no subgrupo maior da linhagem 3 (Figura 3). Os seis isolados que carregam a isoforma 6 também estão localizados no subgrupo maior da linhagem 3. No mesmo subgrupo da linhagem 3, estão localizados seis dos oito isolados que carregam a isoforma 2. Os demais isolados que carregam a isoforma 2 estão no subgrupo menor da linhagem 1 e o isolado Cc\_07, que não pertence à linhagem 3 mas é filogeneticamente próximo a esta.

Os dois isolados que carregam a isoforma 3 (Cc\_11 e Cc\_28) foram atribuídos à linhagem 1, juntamente com outros quatro isolados que não amplificaram para o gene *cas*.

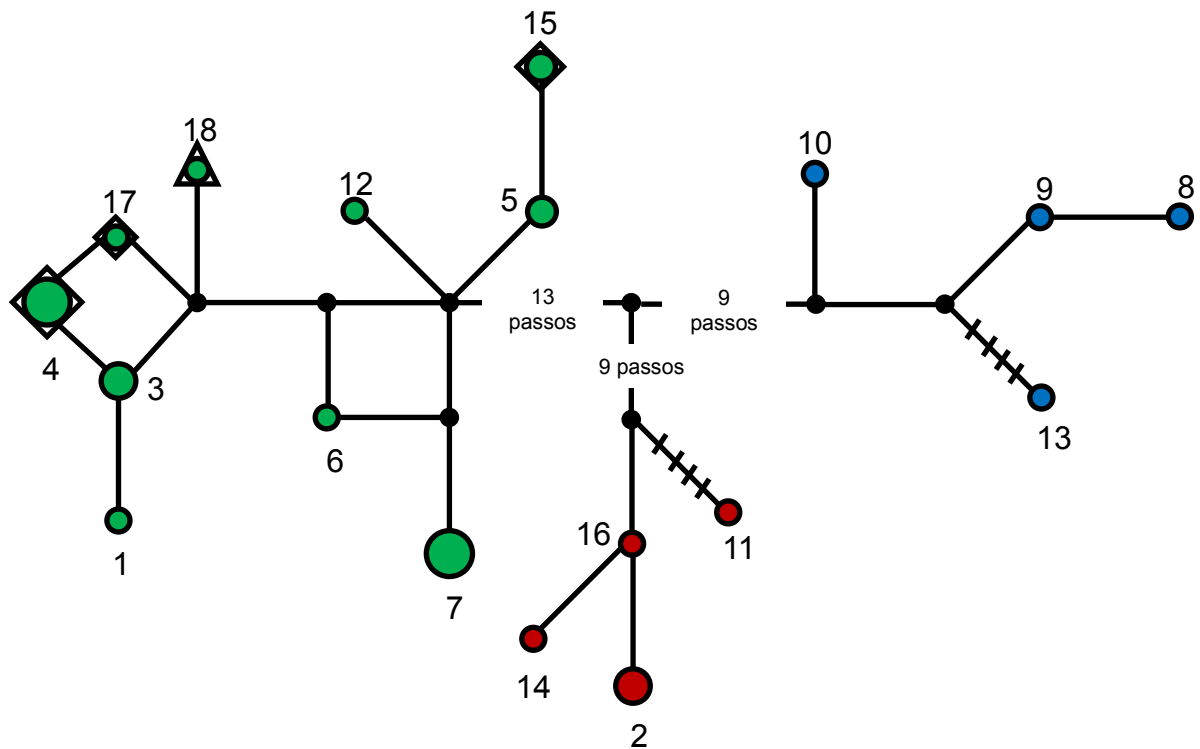
Embora dentro das três linhagens estejam presentes isolados que não amplificaram para o gene da cassiicolina, apenas a linhagem 2 é composta exclusivamente por isolados que não carregam nenhuma das isoformas conhecidas para a cassiicolina.

#### **5. Análises de rede – genes nucleares**

A genealogia dos haplótipos foi inferida utilizando um banco de dados contendo seis genes nucleares concatenados (*act*, *his*, ITS, *mcm7*, *tef* e *tub*) e todos os 32 isolados. Foram identificados 18 haplótipos, distribuídos em três haplogrupos que coincidem com as três linhagens filogenéticas (Figura 3). O número de passos mutacionais entre os haplogrupos variou de 9 a 13 passos, sendo maior que o número de passos mutacionais dentro de cada um dos haplogrupos.

O haplogrupo 1 (que corresponde à Linhagem 1) possui quatro haplótipos, sendo três singletons. O número de passos mutacionais dentro do haplogrupo 1 variou entre 1-5 passos. O haplogrupo 2 (Linhagem 2) contém quatro haplótipos, sendo todos singletons separados por 1-6 passos mutacionais. O haplogrupo 3 (Linhagem 3) possui 10 haplótipos, sendo cinco deles singletons separados por 1-3 passos mutacionais.

A topologia da rede de haplótipos nucleares reforça a ausência de correlação entre o padrão de agrupamento de cada haplogrupo e a origem geográfica dos isolados.

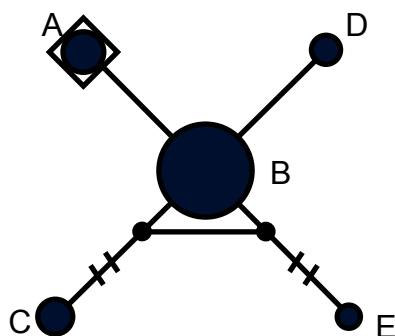


**Figura 4.** Rede de haplótipos construída com base no algoritmo *Median-Joining* na qual são mostradas as relações entre e dentro das três linhagens genealógicas de *C. cassicola*. A rede foi construída a partir da concatenação de seis genes nucleares (*act*, *his*, ITS, *mcm7*, *tef* e *tub*). Cada círculo corresponde a um haplótipo (identificado por um número) e o tamanho corresponde à frequência dos haplótipos. Barras indicam o número de mutações que separam os haplótipos, quando mais que duas (a menos que indicado pelo número de passos). As cores dos haplótipos representam os haplogrupos: vermelho, haplogrupo1; azul, haplogrupo 2; verde, haplogrupo 3. Presença de mutações no gene  $\beta$ -tubulina (*tub*) que conferem resistência a fungicidas da classe dos benzimidazóis: losangos, E198A ; triângulo, F200Y.

## 6. Análises de rede – gene mitocondrial *cyb*

A rede de haplótipos construída com o gene mitocondrial *cyb* agrupou 23 isolados em cinco haplótipos (Figura 5). O haplótipo B ocupou uma posição central, circundado pelos haplótipos A, C, D, E. O haplótipo B foi o mais frequente, contando com 13 isolados e o haplótipo E foi constituído por singleton. O número de passos mutacionais variou de 1-3 passos.

O haplótipo B ocorreu em isolados de diferentes hospedeiros e diversas regiões geográficas. O haplótipo A ocorreu em isolados obtidos de soja e algodão nos estados de Mato Grosso e Goiás; o haplótipo C em três isolados da linhagem 4, sendo dois isolados obtidos de tomate, nos estados de Maranhão e Amazonas, e o um isolado obtido de camará em Minas Gerais; o haplótipo D em dois isolados obtidos de pepino no Paraná; haplótipo E em um isolado de soja, linhagem 7, obtido no Paraná.



**Figura 5.** Rede de haplótipos construída com base no algoritmo *Median-Joining* na qual são mostradas as relações genealógicas entre haplótipos mitocondriais de *C. cassicola*. A rede foi construída a partir do conjunto de dados de 676 pb do gene mitocondrial citocromo B (*cyb*) para 23 isolados de *C. cassicola*. Cada círculo corresponde a um haplótipo (identificado por uma letra) e o diâmetro corresponde à frequência dos haplótipos. Barras indicam o número de passos mutacionais que separam os haplótipos, quando mais que duas. Losango representa a presença da mutação G143A, que confere resistência a fungicidas da classe das estrobilurinas.

## 7. Medidas de diversidade nucleotídica e análise de recombinação

Após a identificação das três linhagens, foram criados conjuntos de dados contendo os seis genes nucleares concatenados (*act*, *his*, ITS, *mcm7*, *tef* e *tub*) para estimação dos parâmetros de diversidade nucleotídica (Tabela 1). A maior diversidade gênica encontrada (1.000) foi observada no banco de dados contendo

os isolados que compõem a linhagem 2, composta unicamente por singletons. A menor variabilidade gênica dentro das linhagens ocorreu na linhagem 1. O teste D de Tajima foi não significativo para as três linhagens encontradas ( $p > 0.05$ ), suportando a hipótese de evolução neutra para esses indivíduos. Nenhum indivíduo recombinante foi identificado dentro de linhagens ou para todas as linhagens analisadas conjuntamente.

**Tabela 1.** Variação molecular e teste de neutralidade em três linhagens de *C. cassicola*.

Grupos <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	S <sup>3</sup>	H <sup>4</sup>	Hd ± SD <sup>5</sup>	Pi <sup>6</sup>	K <sup>7</sup>	D <sup>8</sup> (p-valor)
<b>Linhagem 1</b>	6/3105	7	4	0.800 ± 0.172	0.00119	2.600	-0.88 (p>0.05)
<b>Linhagem 2</b>	4/3105	10	4	1.000 ± 0.177	0.00169	5.167	-0.53 (p>0.05)
<b>Linhagem 3</b>	22/3105	15	10	0.892 ± 0.040	0.00141	3.913	-0.188 (p>0.05)
<b>Total</b>	32/3105	53	18	0.944 ± 0.022	0.00677	14.837	

<sup>1</sup>Os bancos de concatenados foram criados usando os genes *act*, *his*, ITS, *mcm7*, *tef* e *tub*. <sup>2</sup>N = número de amostras/número de sítios totais. <sup>3</sup>Número de sítios polimórficos. <sup>4</sup>Número de haplótipos. <sup>5</sup>H<sub>d</sub> ± SD = diversidade gênica ± desvio padrão. <sup>6</sup>Pi = diversidade nucleotídica. <sup>7</sup>K = número médio de diferenças nucleotídicas. <sup>8</sup>Teste D de Tajima.

## 8. Presença das mutações pontuais E198A, F200Y e G143A

Três mutações independentes (E198A e F200Y no gene *tub* e, G143A no gene *cyb*) que conferem resistência a fungicidas estão presentes (sozinhas ou combinadas) em alguns isolados (Figura 3). Duas dessas mutações (E198A e F200Y) nunca haviam sido identificadas em isolados de *C. cassicola*.

A mutação E198A (haplótipos 4, 15 e 17; Figura 4) foi a mais frequente, ocorrendo em oito isolados, todos coletados a partir do ano 2000 e sendo: quatro destes isolados obtidos da cultura do pepino (Cc\_05, Cc\_19, Cc\_25, Cc\_26), três da cultura da soja (Cc\_29, Cc\_30, Cc\_35) e um da cultura do algodão (Cc\_31). A mutação F200Y foi de rara ocorrência (haplótipo 15; Figura 4), sendo identificada em um único isolado obtido da cultura do algodão (Cc\_32).

A mutação G143A foi a segunda mais frequente (haplótipo A; Figura 5), ocorrendo em quatro isolados, todos coletados após 2009, sendo três isolados obtidos de soja (Cc\_29, Cc\_30, Cc\_35) e um isolado obtido de algodão (Cc\_32).

As mutações E198A e F200Y formaram dois grupos, de acordo com a rede de haplótipos. Os haplótipos 4 e 17 (mutação E198A) e 18 (mutação F200Y) formaram um grupo, enquanto o haplótipo 15 (mutação E198A) localiza-se distante dos demais haplótipos que carregam as duas mutações que conferem resistência a benzimidazóis (Figura 4). A mutação G143A ocorreu em isolados pertencentes a um único haplótipo (haplótipo A, Figura 5).

As análises mostraram que as mutações que conferem resistência a fungicidas das classes dos benzimidazóis (E198A e F200Y) e das estrobilurinas (G143A) estão presentes em isolados de *C. cassiicola* do Brasil, sendo identificada a mutação E198A nos estados do Paraná, Mato Grosso e Goiás; a mutação F200Y no Mato Grosso e a mutação G143A nos estados de Mato Grosso e Goiás. Todos os isolados que carregam as mutações E198A, F200Y e G143A, sozinhas ou combinadas, pertencem à linhagem 3 (Figura 3).

## DISCUSSÃO

### **1. As três linhagens não estão associadas a hospedeiros ou origem geográfica dos isolados**

Este estudo usa de abordagens filogenética e filogeográfica com base na sequência de sete genes nucleares e um mitocondrial para inferir sobre as linhagens genealógicas de *C. cassiicola* que ocorrem no território brasileiro. Os genes escolhidos possibilitaram discriminar três linhagens dentre os isolados.

As linhagens 1 e 2, compostas por isolados obtidos de diferentes hospedeiros e de diferentes localidades, sugerem que os fatores hospedeiro e origem geográfica não possuem efeito na estruturação das populações de *C. cassiicola*. Esse padrão de agrupamento dentro das linhagens colabora com a hipótese de que uma linhagem progenitora de *C. cassiicola* possa ter se espalhado sistematicamente pelo sistema agrícola no passado, possivelmente através da disseminação de material vegetal de propagação, como mudas e sementes (Shimomoto et al., 2011).

A linhagem 3 foi a mais numerosa, com 21 isolados coletados em regiões geográficas distintas e de hospedeiros diferentes, o que demonstra a

predominância desta linhagem no Brasil. Dentro desta linhagem, foi observado um subgrupo bem suportado (PP=99%) constituído majoritariamente por isolados obtidos de mamão, assim como em estudos anteriores (Silva et al., 2003; Dixon et al., 2009; Qi et al., 2011). A formação de grupos contendo isolados de um único hospedeiro, como o mamoeiro, poderia evidenciar a existência de uma especificidade de hospedeiro ocorrendo nas populações de *C. cassiicola*. Entretanto, neste trabalho, o isolado (Cc\_08) obtido de trapoeraba (*Commelina benghalensis*), considerada uma planta daninha em diversas culturas (Webster et al., 2005), agrupou-se com os isolados do mamoeiro (Figura 3). Isso evidencia indiretamente que este patógeno não possui especificidade de hospedeiro, podendo ser encontrado em várias plantas próximas às culturas de interesse econômico. A presença de um isolado de mamão na linhagem 2 colabora para hipótese que isolados obtidos do mamoeiro possam ser patogênicos a outras espécies de plantas. De fato, a patogenicidade de isolados de *C. cassiicola* provenientes do mamão já foi comprovada para seringueira e tomate (Qi et al., 2011).

A presença de isolados de diferentes hospedeiros e diferentes localidades, incluindo os isolados do Japão, no subgrupo maior da linhagem 3 (Figura 3) evidencia a ausência de correlação entre dados filogenéticos e a origem geográfica e reforça a hipótese de um movimento global recente de isolados de *C. cassiicola* (Dixon et al., 2009). Adicionalmente, a dispersão de esporos do patógeno pelo vento (Almeida et al., 2005) e o transporte de material vegetal assintomático mediado pelo homem pode ter favorecido a ausência de correlação genética entre isolados de origens geográficas distintas.

## **2. Associação entre isoformas da cassiicolina e as três linhagens**

As análises a partir da amplificação dos genes *cas* via PCR não permitiram identificar nenhuma isoforma da cassiicolina para 14 isolados da coleção, uma vez que não houve presença de banda em gel de agarose 1% (v/v). Isso pode ter ocorrido porque os *primers* utilizados para as reações de PCR não permitiram a amplificação dos genes ou porque esses genes não estão presentes nos 14 isolados.

A filogenia utilizando o gene *cas* não possibilitou verificar alto grau de associação entre os clados formados pelas isoformas (Figura 2) e as linhagens (Figura 3): as isoformas 1, 2 e 6 se mostraram presentes na linhagem 3 e a isoforma 3, presente apenas em isolados da linhagem 1. A presença de isolados cuja identificação de isoformas da cassiicolina não foi possível em todas as linhagens e, principalmente, a ocorrência de uma linhagem composta unicamente por isolados onde não foi possível a identificação da toxina sugerem a perda desses genes ao longo da história evolutiva do patógeno. Possivelmente, outros efetores ainda não caracterizados possam estar envolvidos na colonização das plantas e na patogenicidade de *C. cassiicola*. De fato, enzimas que promovem a degradação da parede celular, como é o caso da cassiicolina, apesar de essenciais para a patogenicidade, podem ser codificadas por famílias multigênicas (Idnurm e Howlett, 2001). Isso significa que a ruptura de um gene pode não ter efeito sobre a patogenicidade, uma vez que outros genes podem mascarar a inatividade daquele que foi perdido.

A ausência de recombinantes intragênicos entre as três linhagens aponta para uma possível ausência de ciclo sexual de *C. cassiicola*, reforçando a hipótese que a variabilidade do patógeno provém, principalmente, do acúmulo de mutações espontâneas (Shimomoto et al., 2011). Entretanto, ausência de uma associação bem definida entre os as isoformas da cassiicolina e os clados formados neste estudo sugere que possa estar ocorrendo o intercâmbio de isoformas entre linhagens. A avaliação de um número maior de isolados pode levantar evidências para uma possível sexualidade críptica ou recombinação parassexual em *C. cassiicola*, uma vez que os dados de variação molecular apontam para alta variação genética dentro das linhagens (Tabela 1).

### **3. Ocorrência de mutações e implicações para o manejo do patógeno**

Neste trabalho, foi levantada a hipótese de que as mutações pontuais E198A e F200Y, que ocorrem no gene *tub* e conferem resistência a fungicidas da classe dos benzimidazóis, e a mutação G143A, que ocorre no gene *cyb* e confere resistência a fungicidas da classe das estrobilurinas, pudessem estar presentes em isolados de *C. cassiicola* no Brasil, uma vez que o número de aplicações de fungicidas de ambas as classes, sozinhos ou combinados, em grandes lavouras

brasileiras é elevado e considerado o componente chave para o manejo integrado de diversas doenças fúngicas (Almeida et al., 2005; Ma e Michailides, 2005)

Foram encontradas as três mutações pontuais diferentes nos isolados através do sequenciamento dos genes  $\beta$ -tubulina e citocromo B. Todos os isolados brasileiros que possuem pelo menos uma das mutações foram obtidos após 2005 a partir de três culturas: soja, pepino e algodão. Isso pode ser explicado por um aumento na pressão de seleção de indivíduos resistentes devido ao uso indiscriminado de fungicidas nessas culturas (Clark et al., 2011; Avozani et al., 2014).

Através da rede de haplótipos para os seis genes nucleares (Figura 4), é possível verificar que o haplótipo 15, portador da mutação E198A, possui origem independente das demais mutações. Isso possivelmente ocorreu pela rede de haplótipos nuclear ter sido construída partir de seis genes concatenados (*act*, *his*, *ITS*, *mcm7*, *tef* e *tub*) e não apenas o gene *tub*, no qual ocorre a mutação. O grande número de nucleotídeos diferentes dentro de cada um desses genes separadamente pode ter contribuído para que o haplótipo 15 estivesse localizado distante dos demais que carregam a mesma mutação na rede de haplótipos nuclear. A ocorrência de uma mutação rara (F200Y) colabora para hipótese que os fungicidas utilizados nessas culturas exercem alta pressão de seleção contra populações do patógeno, consequentemente, resultando na seleção de indivíduos resistentes e favorecendo a aparição de populações resistentes (Soares et al., 2015).

Por meio da rede de haplótipos mitocondrial, verifica-se que a mutação G143A, que confere resistência às estrobilurinas, esteve presente apenas nos quatro isolados que compõem o haplótipo A (Figura 5), o que significa que a mutação possui origem única e colabora com a hipótese que a resistência a fungicidas emerge de um número limitado de origens (Borges et al., 2017).

A coleção contém isolados de diferentes hospedeiros e diferentes estados brasileiros. As evidências de variabilidade genética entre os isolados e ocorrência de três mutações pontuais independentes, em conjunto com o hábito polífago de *C. cassicola*, comprometem as atuais práticas de manejo do patógeno nas lavouras do país. Este trabalho fornece informações importantes que poderão ser utilizadas em futuros estudos de variabilidade genética do patógeno no Brasil e que busquem propor formas de manejo mais eficazes contra o fungo.

## REFERÊNCIAS

- Akaike, H. (1973). Information theory and an extension of maximum likelihood principle. In F. Petrov, B. N. e Csaki (Ed.), *Second International Symposium on Information Theory* (pp. 267–281). Budapest: Akademiai Kiado.
- Almeida, A. M. R.; Ferreira, L. P.; Yorinori, J. T.; Silva, J. E. V.; Henning, A. A. (2005). Doenças da soja. In et al. Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.), *Manual de Fitopatologia, vol. 2, doenças das plantas cultivadas* (pp. 569–588). São Paulo, SP: Agronômica Ceres.
- Andreas, U.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R.; Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*.
- Avozani, A.; Reis, E. M.; Tonin, R. B. (2014). Sensitivity loss by *Corynespora cassiicola*, isolated from soybean, to the fungicide carbendazim. *Summa Phytopathologica*, 40(2), 273–276.
- Bandelt, H. J.; Forster, P.; Rohl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Barthe, P.; Pujade-Renaud, V.; Breton, F.; Gargani, D.; Thai, R.; Roumestand, C.; de Lamotte, F. (2007). Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. *Journal of Molecular Biology*, 367(1), 89–101.
- Borges, L. L.; Ferreira, T. F.; Lana, M. G.; Bluhm, B. H.; Oliveira, L. O. (2017). Multihost pathogens cause cercospora leaf blight and purple seed stain in soybeans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (In Press).
- Breton, F.; Sanier, C.; D’Auzac, J. (2000). Role of cassiicolin, a host-selective toxin in pathogenicity of *C. cassiicola*, causal agent of leaf disease of *Hevea*. *Journal of Natural Rubber Research*, 3(2), 115–128.
- Carbone, I. e Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553–556.
- Clark, J. S., Blythe, E. K., Copes, W. E., Windham, A. S., Bost, S. C., and Windham, M. T. (2011). Growth sensitivity of *Corynespora cassiicola* to thiophanate-methyl, iprodione, and fludioxonil. *Plant Health Progress, Online*.
- Crous, P.W.; Knox-Davies, P.S.; Wingfield, M. J. (1989). A list of *Eucalyptus* leaf fungi and their potential importance to South African Forestry. *South African Forest Journal*, (149), 17–29.
- Déon, M.; Bourré, Y.; Gimenez, S.; Berger, A.; Bieysse, D.; de Lamotte, F.; et al. (2012a). Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora*

- cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Science*, 185–186, 227–237.
- Déon, M.; Scomparin, A.; Tixier, A.; Mattos, C. R. R.; Leroy, T.; Seguin, M.; et al. (2012b). First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. *Fungal Diversity*, 54(1), 87–99.
- Déon, M.; Fumanal, B.; Gimenez, S.; Bieysse, D.; Oliveira, R. R.; Shuib, S. S.; et al. (2014). Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. *Fungal Biology*, 118(1), 32–47.
- Dixon, L. J.; Schlub, R. L.; Pernezny, K.; Datnoff, L. E. (2009). Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, 99(9), 1015–1027.
- Doyle, J. J. e 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. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969–1973.
- Farr, D.F. e Rossman, A. Y. (2016). Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>> Acessado em 3 de outubro de 2016.
- FRAC. (2016). FRAC Code List 2016: : Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Disponível em <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf?sfvrsn=4>> Acessado em 2 de outubro de 2016.
- Galbieri, R.; Araújo, D. C. E. B.; Kobayasti, L.; Giroto, L.; Matos, J. N.; Marangoni, M. S.; et al (2014). *Corynespora* leaf blight of cotton in Brazil and its management, *American Journal of Plant Sciences*, (5), 3805–3811.
- 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.
- Grigoriev, I. V.; Nikitin, R.; Haridas, S.; Kuo, A.; Ohm, R.; Otilar, R.; et al. (2013). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D699.
- Idnurm, A. e Howlett, B. J. (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*, 2(4), 241–255.

- Imazaki, I.; Ishikawa, K.; Yasuda, N.; Miyasaka, A.; Kawasaki, S.; Koizumi, S. (2006). Incidence of thiophanate-methyl resistance in *Cercospora kikuchii* within a single lineage based on amplified fragment length polymorphisms in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 72(2), 77–84.
- Ishii, H. (2006). Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40(3), 205–211.
- Ishii, H.; Yano, K.; Date, H.; Furuta, A.; Sagehashi, Y.; Yamaguchi, T.; et al. (2007). Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. *Phytopathology*, 97(11), 1458–66.
- Kilpatrick, R.A. e Johnson, H. W. (1953). Fungi isolated from soybean plants at Stoneville, Mississippi, in 1951-52. *Plant Disease Reporter*, 37, 98–100.
- Kreyci, P. F. e Mentem, J. O. M. (2013). Limitadoras de produtividade. In Revista Cultivar, *Caderno Técnico Cultivar*, Abril.
- Librado, P.; Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
- Ma, Z. e Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24(10), 853–863.
- 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(1), 1–5.
- Martin, D. e Rybicki, E. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16(6), 562–563.
- Norse, D. (1974). Plant diseases in Barbados. *Phytopathological Paper*, 18, 1–38.
- Nylander, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Onesirosan, P.; Mabuni, C. T.; Durbin, R. D.; Morin, R. B.; Rich, D. H.; Army, D. C. (1975). Toxin production by *Corynespora cassiicola*. *Physiological Plant Pathology*, 5(3), 289–295.
- Padidam, M.; Sawyer, S; Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 265(2), 218–225.
- Pernezny, K. e Simone, G. W. (1999). Target spot of several vegetable crops. *Plant Pathology Fact Sheet*, (December), 39–43.

- Qi, Y. X.; Zhang, X.; Pu, J. J.; Liu, X. M.; Lu, Y., Zhang, H.; et al. (2011). Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 130(1), 83–95.
- Ronquist, F. e Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574.
- 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 Research and Human Retroviruses*, 11(11), 1423–1425.
- Schmitt, I., Crespo, A., Divakar, P. K., Fankhauser, J. D., Herman-Sackett, E., Kalb, K., ... Lumbsch, H. T. (2009). New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 23(6), 35–40.
- Schoch, C. L.; Crous, P. W.; Groenewald, J. Z.; Boehm, E. W. A.; Burgess, T. I.; de Gruyter, J.; et al. (2009). A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology*, 64, 1-15.
- Shimomoto, Y.; Sato, T.; Hojo, H.; Morita, Y.; Takeuchi, S.; Mizumoto, H.; et al. (2011). Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. *Plant Pathology*, 60(2), 253–260.
- Silva, W. P. K.; Karunanayake, E. H.; Wijesundera, R. L. C.; Priyanka, U. M. S. (2003). Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relationship between host origin and virulence. *Mycological Research*, 107(5), 567–571.
- Smith, D. e Onions, A. H. S. (1994). *The preservation and maintenance of living fungi*. Wallingford, UK: CAB International.
- Smith, J. M. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution*, (34), 126–129.
- Soares, A. P. G.; Guillin, E. A.; Borges, L. L.; Da Silva, A. C. T.; De Almeida, Á. M. R.; Grijalba, P. E.; et al. (2015). More *Cercospora* species infect soybeans across the Americas than meets the eye. *PLoS ONE*, 10(8), 1–20.
- Souza, A. F.; Costa, H.; Zambolim, L.; Mendes, C.; Freitas, R L.; Zambolim, E. M., Jr.; Jesus, W. C.; Pereira, O. L. (2009). First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and berry spots on *Coffea canephora* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 4, 72–74.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.

- Webster, T. M.; Burton, M. G.; Culpepper, A. S.; York, A. C.; Protsko, E. P. (2005). Tropical Spiderwort (*Commelina benghalensis*): a tropical invader threatens agroecosystems of the Southern United States. *Weed Technology*, 19(501–508).
- Wei, C. T. (1950). Notes on *Corynespora*. *Mycological Papers*, 34, 1–10.
- White, T. J.; Bruns, S.; Lee, S.; Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Shinsky, J. J. e White, T. J. (Ed.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp.315-322). New York: Academic Press, Inc.
- Williams, T.H. e Liu, P. S. W. (1976). A host list of plant diseases in Sabah, Malaysia. *Phytopathological Paper*, 19, 1–67.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela S1.** Informação dos isolados, local e ano de coleta, hospedeiro de origem e sua respectiva linhagem, haplótipo nuclear e haplótipo mitocondrial.

Isolado	Local	Ano	Hospedeiro	Linhagem	Haplótipo nuclear	Haplótipo mitocondrial
Cc_01	Sarandi, PR	1997	<i>Glycine max</i>	3	1	B
Cc_02	Campo Mourão, PR	1997	<i>Glycine max</i>	1	2	E
Cc_04	Campo Mourão, PR	1997	<i>Glycine max</i>	3	3	B
Cc_05	Japão	2000	<i>Cucumis sativus</i>	3	4	B
Cc_06	Sorriso, MT	2005	<i>Glycine max</i>	3	5	B
Cc_07	São Luiz, MA	2004	<i>Hydrangea macrophylla</i>	-	6	B
Cc_08	São Luiz, MA	2004	<i>Commelina benghalensis</i>	3	7	B
Cc_09	São Luiz, MA	2004	<i>Solanum lycopersicum</i>	2	8	C
Cc_10	Viçosa, MG	2003	<i>Lantana camara</i>	2	9	C
Cc_11	Viçosa, MG	2003	<i>Rudbeckia</i> sp.	1	2	-
Cc_12	Sorriso, MT	2000	<i>Glycine max</i>	3	5	B
Cc_13	Sertãoópolis, PR	2000	<i>Glycine max</i>	3	3	-
Cc_14	Manaus, AM	2000	<i>Solanum lycopersicum</i>	2	10	C
Cc_15	Manaus, AM	2000	<i>Carica papaya</i>	3	7	B
Cc_16	Manaus, AM	2000	<i>Carica papaya</i>	3	7	B
Cc_17	Manaus, AM	2000	<i>Hevea brasiliensis</i>	1	11	-
Cc_18	Japão	2000	<i>Perilla frutescens</i>	3	12	-
Cc_19	Japão	2000	<i>Cucumis sativus</i>	3	4	B
Cc_20	São Luiz, MA	1998	<i>Carica papaya</i>	3	7	B
Cc_21	São Luiz, MA	1998	<i>Carica papaya</i>	2	13	-
Cc_22	São Luiz, MA	1998	<i>Carica papaya</i>	3	7	B
CC_24	São Luiz, MA	1998	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	1	14	-
Cc_25	Maringá, PR	2005	<i>Cucumis sativus</i>	3	15	D
Cc_26	Maringá, PR	2005	<i>Cucumis sativus</i>	3	15	D
Cc_27	Maringá, PR	2005	<i>Cucumis sativus</i>	3	3	-
Cc_28	Viçosa, MG	2003	<i>Plectranthus barbatus</i>	1	16	-
Cc_29	Tapurah, MT	2016	<i>Glycine max</i>	3	4	A
Cc_30	Tapurah, MT	2016	<i>Glycine max</i>	3	4	A
Cc_31	Alto Taquari, MT	Desconhecido <sup>1</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	3	17	B
Cc_32	Campo Verde, MT	Desconhecido <sup>1</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	3	18	A
Cc_34	Viçosa, MG	2016	<i>Hydrangea macrophylla</i>	1	2	-
Cc_35	Rio Verde, GO	Desconhecido <sup>1</sup>	<i>Glycine max</i>	3	4	A

<sup>1</sup>Isolado coletado entre 2009 e 2016.

**Tabela S2.** Informações dos primers usados e desenvolvidos neste estudo.

<b>Gene Alvo</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'→ 3')</b>	<b>Ta (°C)<sup>1</sup></b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Referência</b>
<b>Actina</b>	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	56	285	Carbone e Kohn (1999)
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT			
<b>β-Tubulina</b>	tub-F1	CCTCCAACCCGGTCAATG	55	948	Shimomoto et al. (2011)
	tub-R2	CTGGGTCAACTCGGGGAC			
<b>Cassiicolina</b>	CasF1	CCTGTCCYATAYATTTGCTAC	48	548	Este estudo
	CasR1	TGTAAARRAGTGTGGTGT			
<b>Citocromo B</b>	Cytb-F2	GGAAGAGGTCTATACTATGG	42	678	Imazaki et al. (2006)
	Cytb-R1	CGTGATTAGCACCTAATTGC			
<b>Fator de alongação 1-α</b>	TEF_F1	CCGGCAAGTCGACAACCACCG	58	573	Soares et al. (2015)
	TEF_R1	TCACGGTGACCTGGGGCGTC			
<b>Histona H3</b>	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	57	341	Carbone e Kohn (1999)
	CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG			
<b>Espaçadores internos transcritos e subunidade 5.8S nrDNA</b>	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	56	499	White et al. (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
<b>Minichromosome maintenance complex component 7</b>	CoryMCM7_F2	CCTGTCACGACCAAGCAGT	50	581	Este estudo
	CoryMCM7_R1	ACGAATACGCATTCCATCA			

<sup>1</sup>Ta = Temperatura de anelamento dos primers.