

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Sclerotinia sclerotiorum EM TABACO NO SUL DO BRASIL

Marcia Quatrin Peripolli
Bióloga / ULBRA

Dissertação apresentada como um dos requisitos à
obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitotecnia – ênfase
FITOPATOLOGIA

Porto Alegre (RS), Brasil
Maio de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Peripolli, Marcia Quatrin
AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA
DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM TABACO NO SUL DO
BRASIL / Marcia Quatrin Peripolli. -- 2016.
81 f.

Orientadora: José Antônio Martinelli.
Coorientadora: Carla Andrea Delatorre.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2016.

1. Tabaco. 2. *Sclerotinia sclerotiorum*. 3.
Agressividade. 4. Diversidade genética. I.
Martinelli, José Antônio, orient. II. Delatorre,
Carla Andrea, coorient. III. Título.

MARCIA QUATRIN PERIPOLLI
Bióloga ULBRA

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 30.05.2016
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 04.04.2017
Por

JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI
Orientador - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

CARLA ANDRÉA DELATORRE
Coorientadora - PPG Fitotecnia/UFRGS

EDSON BERTOLINI
PPG Fitotecnia/UFRGS

ROBERTO LANNA FILHO
PPG Fitotecnia/UFRGS

FRANCELI RODRIGUES KULCHESKI
Centro de Biotecnologia
PPGBCM/UFRGS

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

A Deus e aos meus pais por terem me dado a
vida A mim, pela persistência e
perseverança
DEDICO

É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.
(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, ao Divino, aos Astros, a Mãe Natureza por permitirem minha existência no planeta Terra.

À minha amorosa família que sempre contribuiu para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, sempre solícitos, dispostos e dedicados; por terem me mostrado o caminho da espiritualidade que sem ele nada é possível em especial, meus pais Olinto e Beatriz, a minha irmã, Claudia, a minha madrinha Terezinha.

Aos meus avós Frederico e Ida, *in memoriam*, pelo exemplo de família e pela educação.

Aos meus amados amigos, Alzira M. Pereira, Bárbara Rasch, Carol Lara, Célia Russo, Damiana Trentini, Dora Peixoto, Guilherme Huff, Maria Moleta, Melina Figueiredo, Marco Aurélio Gonçalves, Núbia M. Soyaux, Sally Portela Goulart, Simone Pohl, Simone Schmidt, Tati Rihan, pela amizade verdadeira, por me estenderem a mão e pelos belos e ricos ensinamentos.

Ao meu marido Paulo Nuñez Ferreira que sempre esteve junto; pela paciência, pelo amor e principalmente pela dedicação.

À minha enteada Luana que me ensinou que o amor incondicional está nos pequenos gestos.

À minha nova família Bunselmeyer Nuñez Ferreira por me receberem afetivamente, em especial meu sogro, João Carlos Bunselmeyer Ferreira pelo amor, pela amizade.

Aos novos tios João Eduardo e Elaine pelo carinho, amizade e principalmente pelas orientações.

Ao grupo SOL pela perseverança na fé.

Aos meus gestores e colegas da Souza Cruz em especial Fernanda Viana, Priscila Cruz, Irving Berger pela oportunidade de realizar este trabalho, por dedicarem tempo para suporte e críticas, mas principalmente por acreditarem na realização deste.

Às gurias do bloco 5, por colocarem cor, “comida” e lulu’s na minha vida, mas principalmente por me mostrarem que a vida vai mais além do “nós”.

Ao Cleder Lautert por toda dedicação e suporte nos testes de agressividade.

À Pati Lius e a DSMA, em especial a Marília, pelo suporte nas análises moleculares.

À Andreia Goelzer pelo valioso suporte estatístico e também por ter tido enorme paciência.

Ao meu querido orientador José Antônio Martinelli, por dedicar parte do seu tempo para me orientar, pelos valiosos ensinamentos; e pela boa vontade, sempre e, também a co-orientação de Carla Andrea DelaTorre.

Às gurias do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a GG, a Mariele Barbieri e Geisa Finger por me darem apoio, força e momentos de muita alegria.

À professora Gertrudes Corção, sempre solícita e dedicada.

A todos os funcionários da Fitossanidade pela ajuda, em especial a Marisa pela sua boa vontade em todos os momentos que precisei.

Aos professores do departamento de Fitossanidade que me deram a

oportunidade para enriquecer os meus conhecimentos, em especial ao Roberto Lanna Filho pelas críticas e sugestões que contribuíram muito para minha vida acadêmica.

À Souza Cruz por proporcionar a realização deste trabalho e principalmente por acreditar no meu desenvolvimento profissional.

Àquelas pessoas que, mesmo não mencionadas, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM TABACO NO SUL DO BRASIL¹

Autor: Marcia Quatrin Peripolli
Orientador: José Antônio Martinelli
Coorientadora: Carla Andrea Delatorre

RESUMO

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), originário dos Andes, pertence à família das Solanaceas e é cultivado em diversos países. A produção de tabaco contribui com a economia de 150 países e gera uma receita de mais de U\$ 2 bilhões de dólares anuais. Porém, alguns fatores podem restringir os ganhos de produtividade. Dentre eles, as doenças se destacam como um dos fatores mais importantes e o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, atinge, principalmente, as lavouras localizadas na região litorânea de Santa Catarina, local que favorece o desenvolvimento do fungo devido às características climáticas. A partir dessa problemática este estudo buscou avaliar a agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* frente a cultivares comerciais de tabaco, bem como e também conhecer o perfil genético dos isolados. Foram utilizadas cinco diferentes cultivares de tabaco e 33 isolados de *S. sclerotiorum* de diferentes municípios dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Para o teste de agressividade, em casa de vegetação, somente dez isolados do fungo foram inoculados em hastes de plantas de tabaco mediante perfuração com palito de dente estéril. Para avaliação do perfil genético utilizou-se a técnica de microssatélites com 33 isolados do fungo. Os resultados mostraram que os isolados apresentaram diferentes perfis de agressividade e diferentes taxas de mortalidade. Os níveis de agressividade observados neste estudo comprovaram que a suscetibilidade da cultivar foi dependente do isolado. Foram detectados 114 alelos com média de 11 alelos por *Locus*. Alguns marcadores apresentaram alelo nulo em alguns genótipos, em especial o marcador 99, o qual foi nulo em 14 isolados. A maioria dos isolados (61%) apresentaram alelos exclusivos e clones não foram observados. A análise da informação do conteúdo de polimorfismo (PIC) foi altamente informativa (PIC > 0.50) para todos os marcadores.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (81 f.). Maio, 2016.

EVALUATION OF AGRESSIVENESS AND GENETIC DISVERSIY OF *Sclerotinia sclerotiorum* ON TABACO IN SOUTH BRAZIL²

Author: Marcia Quatrin Peripolli
Advisor: José Antônio Martinelli
Co-adviser: Carla Andrea Delatorre

ABSTRACT

Tobacco (*Nicotina tabacum* L.), which is originated from South America, belongs to the Solanaceae family and it is grown in many countries. Tobacco production contributes to the economy of 150 countries, being responsible for U\$ 2 billions dollar of revenue. However, there are many factors affecting the productivity, for example, diseases. White mold, caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, primarily affects crops located in the coastal region of the Santa Catarina state, where mold development is favored by the weather conditions. Because of that, this research aimed to evaluate the *S. sclerotiorum* aggressiveness in commercial tobacco cultivars and assess the genetic diversity of isolates. Five different tobacco cultivars and 33 *S. sclerotiorum* isolates were used. These isolates were collected in different areas of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná and São Paulo states. For the aggressiveness tests in green house, ten isolates were inoculated in tobacco stem plants by the sterile toothpick perforation technique. For the genetic diversity assessment, 33 mold isolates were evaluate by the microsatellite technique. As a result, the tested isolates showed different aggressiveness profiles and mortality rates. The cultivar susceptibility was dependent on isolates. One hundred and fourteen alleles were detected, 11 alleles average per *Locus*. Some markers showed null alleles in some genotypes. Fourteen isolates did not amplify the marker 99. Most of isolates (61%) showed unique alleles, without clone presences. The analysis of polymorphism information content (PIC) was highly informative (PIC> 0:50) for all markers.

² Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (81 p.) May, 2016

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A produção de tabaco.....	3
2.2 O mofo branco.....	5
2.3 Diversidade genética de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	9
2.4 Agressividade do patógeno.....	11
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
4 ARTIGO 1 – Avaliação da agressividade de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em diferentes cultivares de tabaco <i>Nicotiana tabacum</i>	18
4.1 Introdução.....	20
4.2 Material e Métodos.....	21
4.2.1 Coleta e preservação das amostras.....	21
4.2.2 Inoculações.....	23
4.2.3 Avaliação da progressão da lesão.....	23
4.2.4 Delineamento experimental e análise estatística ...	23
4.3 Resultados.....	25
4.4 Discussão.....	27
4.5 Conclusões.....	31
4.6 Referências bibliográficas.....	31
5 ARTIGO 2 - Caracterização populacional de isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> obtida de diferentes municípios do Brasil	37
5.1 Introdução.....	39
5.2 Material e Métodos.....	41
5.2.1 Coleta e preservação das amostras.....	41
5.2.2 Extração de DNA.....	42
5.2.3 Análise dos microssatélites.....	42
5.2.4 Análise da diversidade genética.....	43
5.3 Resultados.....	44
5.4 Discussão.....	49
5.5 Conclusões.....	52
5.6 Referências bibliográficas.....	52
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	58
7 APÊNDICES.....	59

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
ARTIGO 1	
1. Código do inóculo, município, estado e hospedeiro de origem dos isolados utilizados nos experimentos de agressividade.....	22
2 Porcentagem de plantas mortas do experimento 1.....	26
3 Resultado médio de comprimento longitudinal da lesão (mm) no caule das plantas de tabaco inoculadas com os isolados do grupo 2 (1, 4, 5, 54, 56). Cultivares x isolados – independente do isolado e do tempo.....	26
ARTIGO 2	
1 Locus, Motivo de repetição (Sirjusingh e Kohn, 2001), número de alelos, tamanho dos pares de base (pb) e informação do conteúdo de polimorfismo (PIC) dos dez marcadores SSR utilizados.....	45

RELAÇÃO DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	Página
1 Distribuição dos municípios produtores de tabaco nos três estados da Região Sul do Brasil – Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Fonte: Sinditabaco, 2015.....	4
2 Lavoura de tabaco atacada pelo fungo <i>S. sclerotiorum</i> . Um dos sintomas da doença são plantas com amarelecimento, seguido de murcha e morte. PERIPOLLI, M, (2015).....	5
3 Sintomas da doença – a) lesão na haste da planta de tabaco, de cor parda com característica encharcada; b) folha apodrecida, senescente com presença de micélio de coloração branca PERIPOLLI, M. (2014).....	6
4 Ciclo de vida de <i>S. sclerotiorum</i> . A figura mostra as duas fases do ciclo de vida do patógeno: a) germinação carpogênica e b) germinação miceliogênica. A sobrevivência dos escleródios no solo, após condições favoráveis germinam originando apotécios.....	7
5 Morfologia de <i>S. sclerotiorum</i> . a) micélio branco de <i>S. sclerotiorum</i> associado a escleródios cultivado em ágar batata dextrose. b) Escleródios. c) Produção in vitro de apotécios em areia estéril. d) Liberação dos ascósporos através dos apotécios.	8
 ARTIGO 2	
1 Dispersão gráfica a partir da Análise dos Principais Componentes PC1=26,8%: e PC2=19,1%. Isolados em vermelho 39 obtidos no Paraná; em azul no Rio Grande do Sul e em verde em Santa Catarina. Números em azuis correspondem aos marcadores. Setas verdes indicam o quanto a variável marcador é responsável pelo distanciamento da amostra.....	47
2 Análise de Agrupamento pelo índice de Bray Curtis. Estados: Vermelho: PR- Paraná; Azul: RS – Rio Grande do Sul; Verde: SC40 – Santa Catarina.....	48

1 INTRODUÇÃO

Produzido em diversos países para a fabricação de cigarros, charutos e assemelhados, o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) movimenta bilhões de dólares anualmente na economia mundial e contribui com a economia de mais de 150 países. O Brasil é o segundo maior produtor de tabaco e se destaca por ser o principal exportador. Além disso, o tabaco gera uma receita superior a R\$ 5 bilhões e mais de 2,2 milhões de pessoas são envolvidas no setor (Afubra, 2014). Muitas doenças podem interferir nos ganhos de produtividade (Viana, 2010; Grabicoski, 2012). Dentre as doenças pode-se destacar o mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary que pode devastar lavouras e causar prejuízos (Ahmadi, 2013; Aghajani, 2013).

O fungo encontra-se amplamente distribuído e pode atacar mais de 400 espécies hospedeiras (Boland & Hall, 1994). No Brasil, o patógeno é responsável por muitos danos na produção de feijão, sendo a doença mais severa na cultura do feijão comum (Conçalves, 2012). Além do feijão, lavouras de tabaco inteiras são perdidas devido ao ataque do patógeno. Nos EUA as perdas ultrapassam 200 milhões de dólares anuais Willians *et al.* (2011),

S. sclerotiorum é um dos mais devastadores patógenos de plantas (Souza, 2012), e a alta diversidade genética da população tem sido alvo de estudos

(Attanayake *et al.*, 2012). São diversos os estudos que relatam a diversidade genética do patógeno, mostrando que o polimorfismo pode ocorrer dentro e entre populações de *S. sclerotiorum*, (Meinhardt *et al.* 2002; Sun *et al.*, 2005; Gomes *et al.* 2010). Conhecer a estrutura e a dinâmica da população de *S. sclerotiorum* é a chave para entender a história e a distribuição geográfica do patógeno nos mais diferentes hospedeiros (Gomes *et al.*, 2010). Além da diversidade genética do patógeno, outros estudos relatam que diferentes isolados de *S. sclerotiorum* também podem desenvolver diferentes perfis de agressividade em plantas (Li *et al.* 2009; Ge *et al.*, 2011; Yanar & Onaran, 2011; Jhala *et al.* 2014).

São muitos os desafios para o controle do mofo branco na agricultura do tabaco. Melhorias no sistema de manejo e o uso de cultivares resistentes podem contribuir para a diminuição da doença no campo. Os programas de melhoramento genético de plantas, a fim de desenvolverem cultivares de tabaco resistente a doença, necessitam entender e conhecer os padrões genéticos populacionais do patógeno. Com isso, buscou-se com este trabalho determinar a capacidade de agressividade dos isolados de *S. sclerotiorum* em diferentes cultivares de tabaco e avaliar a diversidade genética do fungo nas áreas produtoras de tabaco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A produção de tabaco

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), planta nativa da América do Sul tropical e subtropical pertence à família das solanáceas e sua produção, em maior parte, tem fins comerciais (Landoni, 1990). Mundialmente, o Brasil é o segundo país que mais produz tabaco, ficando logo atrás da China e, desde 1993, o Brasil destaca-se por ser o principal exportador (Sinditabaco, 2015).

No Brasil a produção de tabaco, se dá em maior parte nos três estados da região sul, a qual participa com 97,4%, safra 2012/13, do volume de tabaco brasileiro (Afubra, 2014) (Figura 1). Na safra de 2014, foram produzidas 706 mil toneladas de tabaco, da qual 52% produzidas no Rio Grande do Sul, 29% em Santa Catarina e 19% no Paraná, gerando renda para o campo e para a cidade (Sinditabaco, 2015).

No Brasil, o tabaco gera uma receita superior a cinco bilhões de reais e mais de 2,2 milhões de pessoas são envolvidas no setor (Afubra, 2014). Em 2015, o tabaco representou 1,14% do total das exportações brasileiras. Da safra de 2014/15 mais de 85% da produção foi destinada ao mercado externo, contribuindo com 2,19 bilhões de dólares (Sinditabaco, 2015).

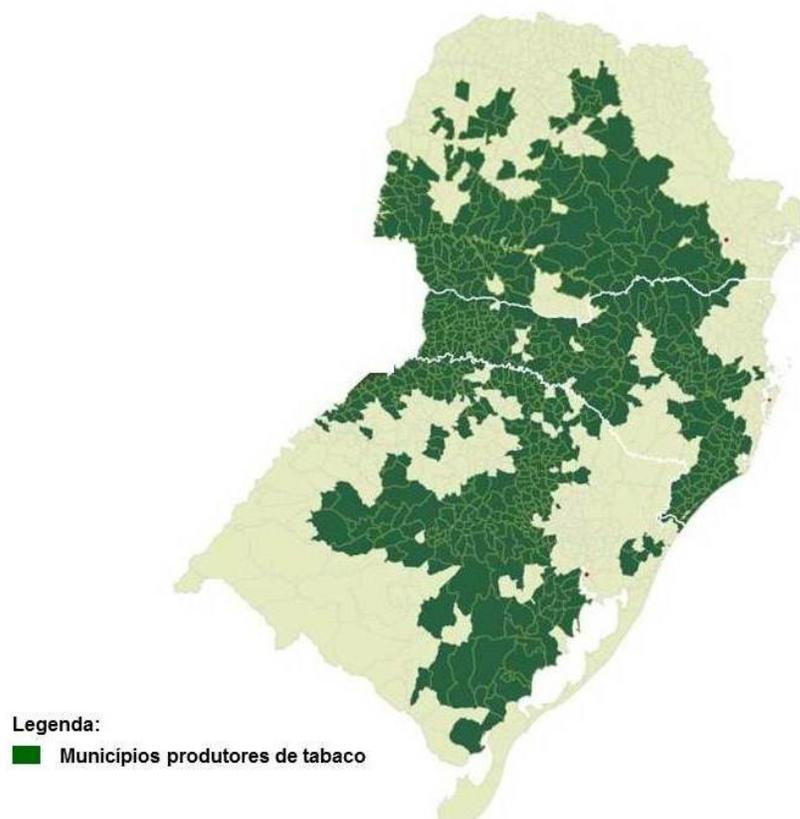


FIGURA 1. Distribuição dos municípios produtores de tabaco nos três estados da Região Sul do Brasil – Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Fonte: Sinditabaco, 2015

Porém, são muitos os fatores que restringem os ganhos de produtividade, como manejo inadequado, falta de boas práticas agrícolas e ocorrência de doenças (Viana, 2010; Grabicoski, 2012). Dentre as doenças, podem-se destacar as que são causadas por fungos, como o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Figura 2), que pode devastar lavouras e causar prejuízos (Ahmadi, 2013; Aghajani, 2013).



FIGURA 2. Lavoura de Tabaco atacada pelo fungo *S sclerotiorum*. Um dos sintomas da doença são plantas com amarelecimento, seguido de murcha e morte. PERIPOLLI, M, (2015)

2.2 O mofo branco

O mofo branco está mundialmente distribuído e possui mais de 400 espécies hospedeiras (Boland & Hall, 1994). Desde 1921, primeiro relato da doença no Brasil, na cultura da batata, essa doença tem sido diagnosticada nas mais diferentes culturas de importância econômica, destacando-se a soja, feijão, girassol e tabaco (Venturoso, 2013). A doença é causada pelo fungo *S. Sclerotiorum*, o qual foi descrito, primeiramente como *Peziza sclerotiorum*, em 1837 por Libert (Purdy, 1979).

As perdas causadas por *S. sclerotiorum*, nos EUA, ultrapassam 200 milhões de dólares anuais por ser um patógeno de difícil controle, seja cultural ou químico (Willians *et al.* 2011). No Brasil, o patógeno é responsável por 30 a 100% de danos na produção de feijão, sendo a doença mais severa na cultura do feijão

comum (Gonçalves, 2012). Na cultura do tabaco, a doença, em muitos casos devasta a lavoura toda, impedindo ganhos de produção. Em algumas regiões o plantio de tabaco é sucessivo, não havendo intervalo para rotação de cultura, favorecendo a permanência da doença no campo.

Os sintomas e os sinais expressos na planta originam os nomes da doença: mofo branco ou podridão branca. Presença de micélio e escleródios no caule e morte da planta são sintomas bem comuns da doença (Boland & Hall, 1988). Nos órgãos afetados em tabaco, as lesões na haste de cor parda têm características encharcada e mole (Figura 3a); nas folhas os sintomas iniciais são amarelamento, seguido de murchamento, apodrecimento e morte (Figura 3b).o micélio branco geralmente contonoso é nitidamente visível (Figura 3b).

Taxonomicamente o fungo pertence ao filo Ascomycota, à ordem Helotiales e à família Sclerotinaceae (Neto *et al.*, 2008). Como característica da ordem Helotiales, o fungo produz estruturas de resistência chamadas escleródios, os quais podem permanecer no solo por vários anos (Clarkson *et al.*, 2007), conservando seu poder patogênico (Venturoso, 2013). *S. sclerotiorum* é um fungo haploide, multinucleado, predominantemente homotático (Clarkson *et al.*, 2013).



FIGURA 3. Sintomas da doença – a) lesão na haste da planta de tabaco, de cor parda com característica encharcada; b) folha apodrecida, senescente com presença de micélio de coloração branca. PERIPOLLI, M. (2014);

Em condições favoráveis de umidade e temperatura, os escleródios podem germinar de duas formas: miceliogênica e carpogênica (Figura 4). De teor epidêmico reduzido, a germinação do micélio produz hifas septadas hialinas (Gonçalves, 2012). Por outro lado, a germinação carpogênica é fonte primária de disseminação da doença.

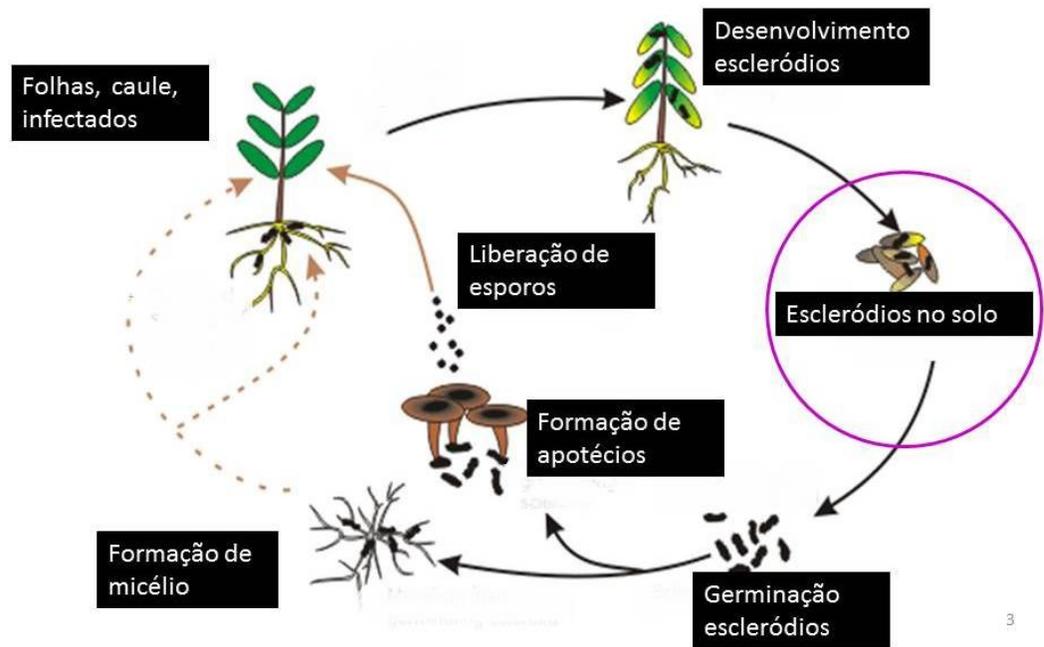


FIGURA 4. Ciclo de vida de *S. sclerotiorum*. A figura mostra as duas fases do ciclo de vida do patógeno: **a)** germinação carpogênica e **b)** germinação miceliogênica. A sobrevivência dos escleródios no solo, após condições favoráveis germinam originando apotécios (a)
 Fonte: <http://www.metos.at/tiki/tiki-index.php?page=Sclerotinia+sclerotiorum+on+rape>

Os escleródios (Figura 5b) quando germinam podem formar até 20 apotécios (Figura 5c), liberam milhões de ascósporos (Figura 5d) (Lehner, 2011). Os ascósporos são liberados no ambiente e são disseminados pelo vento até atingirem plantas hospedeiras em um raio de 50 a 100 m de distância da fonte do inóculo (Gonçalves, 2012).

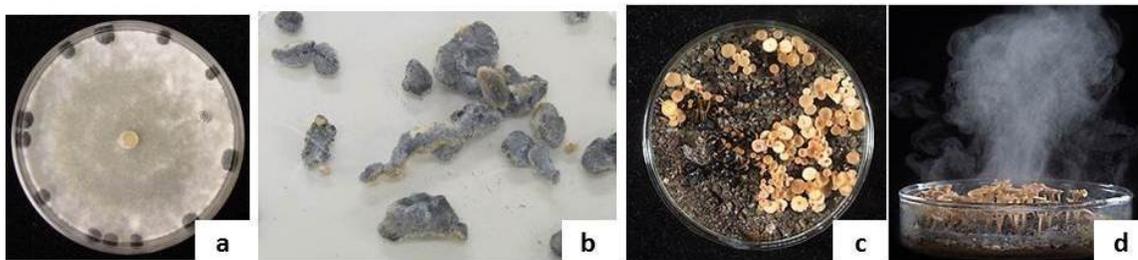


FIGURA 5. Morfologia de *S. sclerotiorum*. **a)** micélio branco de *S. sclerotiorum* associado a escleródios cultivado em ágar batata dextrose. **b)** Escleródios. **c)** Produção in vitro de apotécios em areia estéril. **d)** Liberação dos ascósporos através dos apotécios. **Fonte:** **a,** ROLINS J. (2009); **b,** PERIPOLLI, M. (2014); **c e d,** PETHYBRIDGE, J.S. (2015).

Tanto em condições desfavorável quanto na ausência de hospedeiro suscetível, o fungo pode permanecer viável no solo vários anos (Gonçalves; Souza 2012). Os escleródios, mesmo enterrados até 5 cm de profundidade, podem germinar e formar os apotécios na superfície do solo (Lehner, 2011).

A época do plantio e o manejo adequado são medidas fundamentais para a redução da doença no campo. Evitar épocas de alta umidade e baixas temperaturas, evitar adubações excessivas de nitrogênio (Souza, 2012) e boas práticas agrícolas podem contribuir para a redução do inóculo (Lehner, 2015). Na cultura do feijão, por exemplo, o aumento do espaçamento entre plantas é uma estratégia utilizada que favorece a aeração e modifica o microclima. Essas medidas podem evitar a germinação dos escleródios e impedir a migração do micélio de planta a planta (Vieira *et al.*, 2010). Schuartz & Steadman (1977) observaram que a população diminui com a sucessão de culturas não hospedeiras. Em casos extremos de incidência de doença, áreas inteiras são abandonadas isso porque o insucesso dos controles químico e cultural, falta de cultivares resistentes ao patógeno e a persistência dos escleródios no solo são alguns dos problemas encontrados no combate à

doença (Souza, 2012). Os escleródios, ao caírem no solo, podem ser incorporados às restegas culturais durante o preparo do solo para o plantio (Lehner, 2011). Além disso, *S. sclerotiorum* pode servir de inóculo para outras plantas suscetíveis utilizadas na rotação de cultura (Scott *et al.*, 2014).

2.3 Diversidade genética de *Sclerotinia sclerotiorum*

S. sclerotiorum é um dos mais agressivos patógenos de plantas (Saharan & Mehta, 2003) e muitos estudos relatam que a diversidade genética do patógeno é alta (Attanayake *et al.*, 2012). A estrutura e a dinâmica da população de *S. sclerotiorum* é a chave para entender a história e a distribuição geográfica do patógeno nos mais diferentes hospedeiros (Gomes *et al.*, 2010).

As técnicas da biologia molecular são hoje a base para a caracterização de inúmeras populações. Essas ferramentas proporcionam o estudo da filogenia, evolução e variabilidade intra e entre espécies (Agrios, 2005). Métodos de análise de DNA, como Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição – RFLP; Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso – RAPD; Elementos Extragênicos Palindrômicos Repetitivos – REP; Marcadores Microssatélites – Sequências Simples Repetidas – SSR, entre outras, são vastamente utilizados para verificação da diversidade genética de microrganismos. O uso dos primers de Sequências Intergênicas Consensuais Repetitivas de Enterobactérias – ERIC; REP e Sequências de DNA entre elementos BOX são largamente utilizadas para análises de fitobactérias por possuírem sequências conservadas e repetitivas do genoma bacteriano (Louws *et al.*, 1994; Mahuka *et al.*, 2006). No entanto, essas

técnicas têm se mostrado úteis também na caracterização de populações de fungos, incluindo *Magnaporthe grisea* (George *et al.*, 1997), *Tilletia* spp. (McDonald *et al.*, 2000), *Drechslera avenae* e *Stemphylium solani* (Mehta *et al.*, 2002) e *S. sclerotiorum* (Karimi *et al.*, 2011). As técnicas de REP e ERIC-PCR são amplamente utilizadas, porém são menos específicas que a técnica de microssatélite.

Microssatélites são marcadores baseados em sequências curtas repetitivas (2 a 5 pares de bases), amplificadas a partir de sequências únicas que flanqueiam as repetições havendo, portanto, necessidade de conhecimento prévio do genoma. Microssatélites desenvolvidos para uma espécie podem ser utilizados eficientemente para espécies próximas. Este tipo de marcador é amplamente utilizado para caracterização de populações de *S. sclerotiorum* (Attanayake *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2010; Mert-Turk *et al.*, 2007; Sexton *et al.*, 2004).

Na Austrália, 250 isolados de girassol foram analisados através da técnica RAPD, a qual revelou uniformidade genética. O estudo demonstrou que os 250 isolados compreendiam a um mesmo genótipo. Pesquisadores sugerem que essa uniformidade pode ser mantida por vários anos (Ekins *et al.*, 2011). No entanto, alta diversidade genética entre e intra populações foi observada na China e no Canadá com isolados de cenoura e soja, respectivamente, utilizando a mesma técnica de RAPD (Sun *et al.*, 2005).

Meinhardt *et al.* (2002) identificaram a presença de dois grupos de compatibilidade micelial (GCM) após análise de 21 isolados de feijão, um de batata e um de pimentão. Porém, através de análises de RFLP, os pesquisadores não observaram diversidade genética entre os isolados. Estudos em lavouras de

canola, soja, repolho e kiwi na América do Norte, Europa, Nova Zelândia e Austrália verificaram que clones são facilmente encontrados em lavouras (Malvárez *et al.*, 2007). Em contrapartida, Gomes *et al.* (2010) ao estudarem isolados de quatro lavouras de feijão no cerrado brasileiro alta variabilidade genética dentro e entre as populações de *S. sclerotiorum*.

2.4 Agressividade do patógeno

Agressividade pode ser definida como a capacidade relativa de um patógeno de colonizar e causar danos às plantas, sem distinguir entre aspectos quantitativos e qualitativos. Agressividade é muitas vezes separada em caracteres quantitativos elementares do ciclo de vida do patógeno, como a eficiência de infecção, período de latência, período infeccioso ou tamanho da lesão (Pariaud, *et al.*, 2009). Assim sendo, muitos estudos puderam observar diferentes níveis de agressividade em diferentes isolados e distintas cultivares (Li *et al.* 2009; Ge *et al.*, 2011; Yanar & Onaran, 2011; Jhala *et al.* 2014). Além disso, Viteri *et al.* 2015 em estudos com feijão, observaram diferentes níveis de agressividade ao longo do tempo independente da variedade cultivada e do isolado. Os mesmos pesquisadores afirmaram que as plantas de feijão podem ser infectadas pelo patógeno em diferentes períodos independente do ciclo da planta.

A agressividade tem uma base genética, geralmente poligênica abrindo oportunidades para adaptação do patógeno. Esta adaptação só é possível, no entanto, se existem variações genéticas hereditárias nas populações de patógenos para essas características. Assumindo que a variação genética dos

mecanismos de agressividade existente em populações de patógenos, a evolução da agressividade será moldado por interações diferenciais entre hospedeiros e isolados patogênicos, a qual pode ser mensurada através da porcentagem da doença no órgão afetado (Pariaud, *et al.*, 2009). Essa teoria pode ser observada no estudo de Li *et al.* (2009), no qual, diferenças significativas de níveis de agressividade foram encontradas em 205 isolados de *S. sclerotiorum* obtidos de vários países. Os autores, através da análise de compatibilidade micelial, observaram que esses isolados pertenciam ao mesmo agrupamento, porém apresentando diferentes níveis de agressividade. Resultado semelhante foi observado na Turquia entre 119 isolados do fungo obtidos da cultura do pepino (Yanar & Onaran, 2011).

Através dessa abordagem e da carência de pesquisas do agente patogênico *S. Sclerotiorum* na cultura do tabaco, o estudo proposto teve o objetivo de avaliar a agressividade e diversidade genética de *S. sclerotiorum* isolados de lavouras de tabaco. Com isso, os resultados deste trabalho servirão de base para futuras pesquisas em epidemiologia e melhoramento de genético de plantas, haja vista insuficiência de publicações relacionadas a este tema.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFUBRA. Associação dos Fumicultores do Brasil. Disponível em: <http://www.afubra.com.br>. Acesso em: 02/04/2014.

AGHAJANI, M. A.; SAFAIE, N. ALIZADEH, A. Yield loss assessment of *Sclerotinia stem* rot of canola in Iran. Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran. **Journal of Crop Protection**, Tehran, v. 2, n.2, p. 229-240, 2013.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Academic Press, 2005. 922p.

AHMADI, B. V. et al. Reducing the impact of *Sclerotinia* disease by determining optimum crop rotations using dynamic programming. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE AGRICULTURAL ECONOMICS SOCIETY, 87., 2013, University of Warwick, United Kingdom. [**Proceedings**]. United Kingdom, 2013.

ATTANAYAKE, R.N. et al. Genetic and phenotypic diversity and random association of DNA markers of isolates of the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* from soil on a fine geographic scale. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 55, p. 28-36, 2012.

ATTANAYAKE, R.N. et al. Inferring outcrossing in the homothallic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* using linkage disequilibrium decay. **Heredity**, Oxford, v. 113, p. 353-363, 2014.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 16, p. 93–108, 1994.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Epidemiology of *Sclerotinia* Stem Rot of Stem of Soybean in Ontario. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 1241-1245, 1988.

CLARKSON J.P. et al. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in crop and wild hosts in UK. **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, p. 309-324, 2013.

CLARKSON, J. P. et al. Forecasting *Sclerotinia* Disease on Lettuce: A Predictive Model for Carpopogenic Germination of *Sclerotinia sclerotiorum* Sclerotia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 621-631. 2007.

EKINS, M.G. et al. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on sunflower in Australia. *Australasian Plant Pathology*, Clayton, v. 40, p. 99–108, 2011.

GE X. T. et al. Delineation of *Sclerotinia sclerotiorum* pathotypes using differential resistance responses on *Brassica napus* and *B. juncea* genotypes enables identification of resistance to prevailing pathotypes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 127, p. 248-258, 2012.

GEORGE, M.L.C. et al. Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive DNA Sequences. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 88, p. 223-229, 1997.

GOMES, E. V. et al. Microsatellite Markers Reveal Genetic Variation within *Sclerotinia sclerotiorum* Populations in Irrigated Dry Bean Crops in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, 2010. (Version of Record online: 3 AUG 2010).

GONÇALVES, P. R. C. **Reação de Progênies de Feijão, Derivadas de Seleção Recorrente para Mofo Branco, ao Ácido Oxálico**. 2012. 56 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, MG, 2012.

GRABICOSKI, E. M. G. **Caracterização Morfológica e Patogênica de Isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e Detecção em sementes de Soja**. 2012. 136f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Área Concentração Fitopatologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR, 2012.

JHALA, R. et al. Characterized isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* can facilitate identification and verification of resistance to white mold in dry and snap beans. **Annual Report of the Bean Improvement Crops**, East Lansing, v. 57 p. 57–58, 2014.

KARIMI, E.; SAFAIE, N.; SHAMS-BAKHSI, M. Assessment of genetic diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* populations in canola fields by rep-pcr. **Trakia Journal of Sciences**, Stara Zagora, v. 9, p. 62-68, 2011.

KOHN, L. M. et al. Mycelial Incompatibility and Molecular Markers Identify Genetic Variability in Field Populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 480-485, 1990.

LANDONI, J. H. de. *Nicotiana tabacum* L. **IPCS INCHEM**, Córdoba, mar. 1990.

LEHNER M. S. et al. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. **Plant Pathology**, Oxford, v. 64 p. 921-931, 2015.

LEHNER, M d' S. **Estrutura Genética da População de Sclerotinia sclerotiorum em Feijoads de Minas Gerais**. 2011. 33f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

Li Z. Q. et al. Genetic diversity and differentiation of *Sclerotinia sclerotiorum* populations in sunflower. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 37 p. 77–85, 2009.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; DE BRUIJN, F.J.; Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 2286-2295, 1994.

MAHUKA, G. S. et al. Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* var. *fuscans* rep-PCR and PCR-RFLP of the ribosomal genes. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 35-44, 2006.

MALVAREZ, G. et al. New populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in California and peas and lentils in Washington. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 470–483, 2007.

McDONALD, J.G.; WONG, E.; WHITE, G.P. Differentiation of *Tilletia* Species by rep-PCR Genomic Fingerprinting. **Plant disease**, Saint Paul, v. 84, p. 1121-1125, 2000.

MEHTA, A.; MEHTA, Y. R.; ROSATO, Y. B. ERIC- and REP-PCR amplify non-repetitive fragments from the genome of *Drecheslera avenae* and *Stemphylium solani*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 211 p. 51-55, 2002.

MEINHARDT, L.W. et al. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27 p. 211–215, 2002.

MERT-TÜRK, F. et al. Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Çanakkale Province of Turkey. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 182–187, 2007.

MUELLER D. S.; HARTMAN G.L.; PEDERSEN W. L.; Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83 p. 1113-1115, 1999.

NETO, A. L F. et al. **Podridão-vermelha-da-raiz e Mofo-Branco na cultura da Soja**. Planaltina, DF.: Embrapa Cerrados, 2008. 27 p.

PETROFEZA, S.; NASSER, C. B. Case Study: *Sclerotinia sclerotiorum*: Genetic Diversity and Disease Control. In: THE MOLECULAR basis of plant genetic diversity. Rijeka: In Tech, 2012. Cap.13, p.275-296.

PRESSL INSTRUMENTS. **Sclerotinia sclerotiorum on rape**. Disponível em: <http://www.metos.at/tiki/tiki-index.php?page=Sclerotinia+sclerotiorum+on+rape>. Acesso em: 03 mar. 2016.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 875–880, 1979.

SCHWARTZ H. F.; STEADMAN J. R. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 383-388, 1977.

SCOTT J. B. et al. Spatiotemporal characterization of *Sclerotinia* crown rot epidemics in pyrethrum. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, p. 267-274, 2014.

SEXTON, A.C.; HOWLETT, B.J. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. **Current Genetics**, New York, v. 46, p. 357–365, 2004.

SINDITABACO. **Área de exportação**. Disponível em: <<http://sinditabaco.com.br/>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

SOUZA CRUZ. **[Informações obtidas no site]**. Disponível em: <<http://www.souzacruz.com.br/>>_Acesso em: 29 out. 2014.

SOUZA D. A. de. **Efeito da seleção recorrente para resistência à macha angular na reação ao mofo branco em alelos SSR de progênies de feijão**. 2012. 98p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SUN, J.M. et al. Analysis of the genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations from different regions and host plants by random amplified polymorphic DNA markers. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 47, p. 385–395, 2005.

VENTUROSOSO, L. d' R. et al. Produção de soja e germinação carpopogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes coberturas de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 615-626, mar./abr. 2013.

VIANA, F. C.; BERGER, I. J.; DUARTE, V. Characterization of *Ralstonia solanacearum* Smith populations in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.37, n. 2, mar./apr. 2012.

VIEIRA R. F.; PAULA JUNIOR T. J.; TEIXEIRA H. White Mold Management in Common Bean by Increasing Within-Row Distance Between Plants. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 361-367, 2010.

VITERI D. M. et al. Use of four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different aggressiveness, three inoculations per plant, and delayed multiple evaluations to select common beans with high levels of white mold resistance. **Euphytica**, Wageningen, v 204 p. 457-472, 2015.

WILLIAMS B. et al. Tippingthe Balance: *Sclerotinia sclerotiorum* Secreted Oxalic Acid Suppresses Host Defenses by Manipulating the Host Redox Environment. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, 2011.

YANAR, Y; ONARAN, A. Mycelial compatibility groups and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary causal agent of white mold disease of greenhouse grown cucumber in Antalya-Turkey. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10 p. 3739–3746, 2011.

4 ARTIGO 1¹

Avaliação da agressividade de *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes cultivares de tabaco *Nicotiana tabacum*

Marcia Peripolli¹, José Antônio Martinelli², Carla Andrea Delatorre³

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (ênfase em Fitopatologia);
Departamento de Fitossanidade e, de Plantas de Lavouras, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000,
Porto Alegre, RS, Brasil;

ABSTRACT

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) originated from South America and tobacco production contributes to the economy of 150 countries. However, there are many factors that limit yield. Among the diseases, the white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* affects mainly the crops located in the coastal region of Santa Catarina, a place that favors the development of the fungus due to climatic characteristics. Genetic diversity studies show that there is polymorphism within and among populations of *S. sclerotiorum* and the different isolates has different

¹ Artigo formatado conforme as normas da Revista Summa Phytopathologica.

levels of aggressiveness. Therefore, this study aimed to evaluate the performance of five tobacco cultivars infected with ten isolates of *S. sclerotiorum* from different regions. In greenhouse two experiments were conducted in different conditions arranged in completely randomized design. The results showed that isolates indicated different profiles of different aggressiveness and mortality rates. Aggressiveness levels observed in this study showed that the susceptibility of the cultivar was dependent isolated. None of the tested cultivars was resistant to disease, indicating the importance of further study.

Key words: Aggressiveness, *Sclerotinia sclerotiorum*, Tobacco

RESUMO

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) oriundo dos Andes é cultivado em mais de 150 países. Porém, são muitos os fatores que restringem os ganhos de produtividade. Dentre as doenças, o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, atinge, principalmente, as lavouras localizadas na região litorânea de Santa Catarina, local que favorece o desenvolvimento do fungo devido às características climáticas. Estudos de agressividade com *S. sclerotiorum* relatam que um mesmo isolado desenvolve níveis diferentes de agressividade em diversos hospedeiros. Além disso, especialização fisiológica e presença da patotipos também são relatadas em populações de *S. sclerotiorum*.

Assim sendo, este trabalho objetivou avaliar a agressividade de dez isolados *S. sclerotiorum* de diferentes regiões do Brasil frente a cinco cultivares de tabaco. Em casa de vegetação foram realizados dois experimentos em diferentes condições dispostos em delineamento completamente casualizado. Os resultados

mostraram que os isolados apresentaram diferentes perfis de agressividade e diferentes taxas de mortalidade. Os níveis de agressividade observados neste estudo comprovaram que a suscetibilidade da cultivar foi dependente do isolado. Nenhuma das cultivares testadas foi resistente à doença, indicando a importância de estudos mais aprofundados.

Palavras-chave: Agressividade, *Sclerotinia sclerotiorum*, Tabaco

4.1 INTRODUÇÃO

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), planta nativa dos Andes, pertence à família das solanáceas e sua produção comercial é a única fonte de renda de muitos produtores (Landoni, 1990). Produzido em diversos países para a fabricação de cigarros, charutos e assemelhados, o tabaco movimenta bilhões de dólares anualmente na economia mundial (Souza Cruz, 2014). A produtividade do tabaco pode ser afetada pelo manejo inadequado, pela ausência de boas práticas agrícolas e ocorrência de moléstias (Viana, 2010; Grabicoski, 2012). Dentre as doenças, podem-se destacar as que são de natureza fúngica, como o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, que pode interferir na produtividade e ocasionar prejuízos financeiros (Ahmadi, 2013; Aghajani, 2013). No Brasil as perdas oriundas da doença podem chegar a 100% (Gonçalves, 2012) e nos EUA os prejuízos ultrapassam 200 milhões de dólares anuais (Willians *et al.* 2011).

As plantas de tabaco infectadas pela doença, inicialmente apresentam uma mancha na haste de cor marrom e aspecto encharcado, as folhas começam com murcha seguido de podridão e morte. Nos estágios finais da

doença, o caule internamente fica preenchido por escleródios levando a morte de toda a planta (Boland & Hall, 1988). O plantio deve ser evitado em períodos de umidade relativa do ar alto e temperaturas amenas, por isso a determinação da época do plantio é de fundamental importância (Souza, 2012). O uso das boas práticas agrícolas pode contribuir para a redução do inóculo (Lehner, 2015), bem como o aumento do espaçamento entre plantas são ferramentas utilizadas para evitar o desenvolvimento da doença. Essas medidas podem evitar a germinação dos escleródios e impedir a migração do micélio de planta a planta (Vieira *et al.*, 2010). Por se tratar de uma doença altamente agressiva, muitos estudos sobre agressividade de *S. sclerotiorum* tem sido relatados (Li *et al.* 2009; Ge *et al.*, 2011; Yanar & Onaran, 2011; Jhala *et al.* 2014). Um trabalho realizado por Li *et al.* (2009), com 205 isolados de *S. sclerotiorum* oriundos vários países, mostraram que os diferentes isolados causaram variados níveis de agressividade em genótipos de Brassicas. Esse resultado é corroborado por muitos outros estudos (Li *et al.* 2009; Ge *et al.*, 2011; Yanar & Onaran, 2011; Jhala *et al.* 2014; Viteri *et al.* 2015).

Com base nessas afirmações objetivou-se com este trabalho avaliar a agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* em cultivares de tabaco.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta e preservação das amostras

As oito amostras de plantas infectadas contendo escleródios de *S. sclerotiorum* foram obtidas de lavouras tabaco dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e do Paraná. Além disso, um isolado adquirido da cultura da

alface e um isolado obtido da cultura do feijão foram cedidos pela Universidade Federal do Rio Grande Sul (UFRGS) também foi utilizado no teste de agressividade (Tabela 1).

TABELA 1. Código do inóculo, município, estado e hospedeiro de origem dos isolados nos utilizados experimentos de agressividade.

<u>Código do inóculo</u>	Município	UF	Hospedeiro
1	Campo do Tenente	PR	Tabaco
4	Irati	PR	Tabaco
5*	Anta Gorda	RS	Tabaco
54	Santa Maria	RS	Alface
56	Piracicaba	SP	Feijão
10	Araranguá	SC	Tabaco
11	Içara	SC	Tabaco
17	Sombrio	SC	Tabaco
19	Santa Rosa do Sul	SC	Tabaco
21	Araranguá	SC	Tabaco

* utilizado somente no experimento 1

Os escleródios foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) acidificado com ácido láctico a 25%. Inicialmente os escleródios foram desinfestados por um minuto em álcool 70%, seguido da desinfestação de hipoclorito de sódio a 1% por um minuto e enxaguados com água destilada estéril. Os escleródios foram cultivados em BDA e as placas foram incubadas em BOD à 20°C por sete dias. As colônias que não apresentaram contaminação foram selecionadas e delas retirados os escleródios, os quais foram colocados em placas de Petri e mantidos por 24 horas em incubadora à 27°C para secagem. Posterior às 24 horas os escleródios, já secos, foram armazenados em microtubos e acondicionados em freezer a -20°C para a preservação.

4.2.2 Inoculações

Em casa de vegetação foram realizados dois experimentos para avaliar a agressividade. As inoculações foram realizadas na haste das plantas mediante perfuração com palito de dente estéril contendo um disco de micélio do fungo. As plantas dos experimentos 1 e 2 foram inoculadas 77 e 91 dias após a semeadura, respectivamente. Cada planta foi individualizada em vaso de polietileno com capacidade de 500 ml contendo substrato a base de turfa e acondicionadas em casa de vegetação. Os experimentos foram conduzidos na cidade de Cachoeirinha – RS, no período de março a julho de 2015, com variação de temperatura entre 8 a 26°C.

4.2.3 Avaliações da progressão da lesão

A avaliação progressão longitudinal do tamanho da lesão na haste das plantas de tabaco ao longo do tempo foi realizada com paquímetro digital. As medições das lesões foram feitas, diariamente, por cinco dias no experimento 1 e por oito dias no experimento 2, a partir período em que iniciaram as lesões, oito dias após a inoculação no experimento 1 e três dias após a inoculação no experimento dois. A unidade de medida utilizada foi o milímetro (mm).

4.2.4 Delineamentos experimentais e análise estatística

No experimento 1 pretendeu-se conhecer comparar as cultivares e com isso usou-se a análise de medidas repetidas. Foram utilizados cinco genótipos de plantas de tabaco e dez isolados do fungo de diferentes municípios foram selecionados, conforme descrito na Tabela 1. Os isolados 10, 11, 17, 19 e 21

foram excluídos da análise estatística por falta de repetições devido à morte das plantas, ficando um delineamento 5x5. Com esses isolados obteve-se a porcentagem de morte de plantas, por cultivar e por isolado.

O delineamento experimental adotado foi o Delineamento Completamente Casualizado com 10 repetições, sendo os tratamentos organizados em um esquema fatorial 5x10 (Cultivares x Isolados respectivamente) avaliados em 5 dias consecutivos, após o aparecimento dos sintomas, os quais iniciaram 8 dias após a inoculação. A caracterização do modelo foi expressa por:

$$y_{ijkl} = \mu + C_j + I_k + (CI)_{jk} + P_{i(jk)} + T_l + (CT)_{jl} + (IT)_{kl} + (CIT)_{jkl} + \epsilon_{ijkl}$$

Onde C_j , I_k e T_l são efeitos principais de Cultivar, Isolados e Tempo, respectivamente, $(CI)_{jk}$, $(CT)_{jl}$ e $(IT)_{kl}$ são os efeitos das interações simples, $(CIT)_{jkl}$ é o efeito da interação tríplice, $P_{i(jk)}$ é o erro das parcelas principais (erro entre unidades) e ϵ_{ijkl} é o erro das subparcelas (erro dentro de unidades).

Procedeu-se as análises via metodologia de modelos mistos, utilizando-se o PROC MIXED do SAS.

A partir dos dados do experimento 1, buscou-se no experimento 2 avaliar a progressão da lesão na haste das plantas ao longo do tempo, através da análise de modelos de coeficientes aleatório. Cinco genótipos de plantas de tabaco e nove isolados do fungo de diferentes municípios foram selecionados, conforme descrito na Tabela 1.

O delineamento experimental adotado foi Delineamento Completamente Casualizado com 10 repetições, sendo os tratamentos organizados em um esquema fatorial 5x9 (cultivares x isolados respectivamente). As plantas foram avaliadas em oito dias consecutivos após o aparecimento dos sintomas, três dias após a inoculação. Análise de modelos de coeficientes aleatório para avaliar a progressão da doença.

$$y_{ijkl} = \mu + C_j + I_k + (CI)_{jk} + P_{i(jk)} + T_l + (CT)_{jl} + (IT)_{kl} + (CIT)_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

Onde C_j , I_k e T_l são efeitos principais de Cultivar, Isolados e Tempo, respectivamente, $(CI)_{jk}$, $(CT)_{jl}$ e $(IT)_{kl}$ são os efeitos das interações simples, $(CIT)_{jkl}$ é o efeito da interação tríplice, e ε_{ijkl}^* é o erro das unidades acrescido da parte aleatória.

4.3 RESULTADOS

No experimento 1, os isolados de *S. sclerotiorum* foram agrupados de duas formas de acordo com as características dos sintomas:

Os isolados do grupo 1 (10, 11, 17, 19 e 21) causaram morte das plantas acima de 30%, com exceção da cultivar 3 inoculada com os isolados 10 e 21, e, da cultivar 5 inoculada com o isolado 19 (Tabela 2). Os isolados do grupo 2 (1, 4, 5, 54 e 56) que causaram a mortalidade abaixo de 30%, com exceção da cultivar 4 inoculada com o isolado 4 (Tabela 2).

TABELA 2. Porcentagem de plantas mortas do experimento 1:

Cultivar	ISOLADOS GRUPO 1						ISOLADOS GRUPO 2					
	10	11	17	19	21	Média	1	4	5	54	56	Média
1	80	80	100	70	70	80	10	10	0	0	0	4
2	90	40	60	70	50	62	0	0	20	0	0	4
3	10	60	80	30	0	36	0	20	30	10	10	14
4	30	60	70	40	50	50	0	70	10	0	0	16
5	80	90	70	20	60	64	0	0	0	20	0	4
Média	58	66	76	46	46		2	20	12	6	2	

Em função do alto índice de mortalidade das plantas (acima de 30%), não foi possível avaliar estatisticamente a progressão das lesões para os isolados do grupo 1. Isto demonstra maior agressividade desses isolados frente às cultivares testadas. Já para os isolados do grupo 2, a Tabela 3 mostra o resultado médio de comprimento longitudinal da lesão (mm) na haste das plantas de tabaco. É possível observar que as cultivares 3, 4 e 5 foram significativamente mais suscetíveis que as cultivares 1 e 2. A interação tríplice, tempo x cultivar x isolados, não foi significativa.

TABELA 3. Resultado médio de comprimento longitudinal da lesão (mm) no caule das plantas de tabaco inoculadas com os isolados do grupo 2 (1, 4, 5, 54, 56). Cultivares x isolados – independente do isolado e do tempo.

Cultivares	Médias*
1	2,42 b
2	2,84 b
3	6,65 a
4	6,87 a
5	5,74 a

* Médias acompanhadas de mesma letra não são significativamente diferentes, ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

No experimento 1 foi possível observar diferença significativa de suscetibilidade entre as cultivares para as plantas inoculadas com os isolados do

grupo 2. Já no experimento 2 o progresso da lesão ao longo do tempo foi significativo para todas as cultivares, independente do isolado inoculado. No experimento 2 observou-se que a interação tríplice foi significativa ($p=0,0160$) indicando que o progresso da doença para os isolados se diferenciou para cada cultivar (Apêndice, 1). Todas as cultivares, independentemente de isolados, apresentaram coeficiente de regressão linear significativo ($p<0,05$) indicando um progresso significativo da doença ao longo do tempo.

Somente os isolados 1 e 54, que independentemente das cultivares, apresentaram coeficiente de regressão linear não significativo ($p>0,05$). Os Isolados que apresentaram progresso significativo da doença, por cultivar foram: Isolados 4,10 e 11 na cultivar 2; Isolado 17 nas cultivares 1, 2 e 5; Isolado 19 nas cultivares 1, 2, 3 e 5; Isolados 21 e 56 nas cultivares 3 e 4 (Apêndice 2).

4.4 DISCUSSÃO

Os isolados de *S. sclerotiorum* apresentaram comportamento variável quanto o progresso da doença ao longo do tempo e quanto à taxa de mortalidade em ambos os experimentos. Por ser um fungo sem especificidade de hospedeiro (Purdy, 1979) e por apresentar diversidade genética (Li *et al.*, 2016) é possível justificar as diferenças encontradas neste estudo. Na década de 70 já havia sido reportado (Price & Calhoun 1975) que diferentes isolados de *Sclerotinia* causavam diferentes níveis de agressividade em distintos hospedeiros, semelhante ao encontrado neste trabalho.

A presença de dois diferentes grupos, no experimento 1, ficou claramente evidente de que o desenvolvimento do progresso da doença foi dependente do

isolado e não da cultivar. Não foi possível afirmar que as variações de humidade, temperatura e quantidade de inóculo em que o experimento foi realizado possa ter interferido nas variações das reações das cultivares. Isto porque todas as plantas receberam as mesmas condições de casa de vegetação e todas as plantas apresentavam, aparentemente, o mesmo vigor e tamanho, supondo-se assim que as condições fisiológicas das plantas eram as mesmas. Através de estudos genéticos realizados anteriormente com os mesmos isolados, observou-se que os isolados diferiram geneticamente entre si (Peripolli, M. 2016). É possível que algum fator genético dos isolados possa ser o ponto determinante das variáveis reações das cultivares conforme descrito por Price & Calhoun em 1975.

Estudos com Brássicas inoculadas com isolados de *S. sclerotiorum* de diferentes países também apresentaram variáveis tamanhos de lesão (Barbetti *et al.*, 2013). Os pesquisadores sugerem que diferentes isolados podem causar diferentes níveis de doença. Os isolados do grupo 1 pertenciam ao Estado Santa Catarina, porém de diferentes municípios. Apesar da taxa de mortalidade ter sido elevada, sugere-se neste estudo que a fonte do inóculo não fosse a mesma, devido a distância entre uma lavoura e outra de onde os isolados foram coletados. Assim, o estudo de Bem-Yephet e Britton (1985) explica que os ascósporos são ejetados no máximo 100 m da fonte de origem. Distância muito pequena para dispersão do inóculo para considerar que os isolados seriam os mesmos. Os municípios de origem dos isolados do grupo 1 distam um do outro, em média, 30 km em linha reta. Com isso, supõe-se que pela distância, os isolados do grupo 1 não sejam os mesmos.

A distância entre os municípios de origem dos isolados do grupo 2, são

ainda maiores, visto que os isolados pertenciam a três estados distintos, RS, PR e SP. As cultivares inoculadas com esses isolados apresentaram diferenças significativas quanto ao tamanho da lesão no caule. Resultado semelhante foi encontrado por Garg *et al.*, (2010) ao testarem isolados de diferentes regiões da Austrália em dois genótipos de Brassicas.

Com experimento 1 foi possível observar duas cultivares mais resistentes à doença somente quando inoculadas com alguns isolados do Grupo 2. Da mesma forma, outros estudos (Viteri *et al.*, 2015; Ge *et al.* 2011), também observaram diferenças significativas de resistência de genótipos de feijão expostos a diferentes isolados de *S. sclerotiorum*. Porém ao analisarmos o experimento como um todo, não foi possível identificar resistência entre cultivares frente aos isolados testados, sugerindo que a suscetibilidade ao patógeno está diretamente relacionada ao isolado.

Assim como o experimento 1 mostrou diferentes perfis de agressividade, no experimento 2 nem todos os isolados dentro das cultivares manifestaram progresso significativo da doença ao longo do tempo. Com base nesses resultados sugere-se que os genótipos dos isolados eram diferentes, o que pode ser embasado devido à reprodução sexuada do fungo.

O progresso da lesão observado no experimento 2 pode estar relacionado com especialização fisiológica do patógeno, visto que nem todos os isolados dentro das cultivares manifestaram progresso significativo da doença. Desta maneira o trabalho de Ge *et al.*, (2012) relatou diferenças significativas de virulência em *Brassicas napus* e *B. juncea* através da inoculação de diferentes isolados sugerindo a possibilidade especialização fisiológica dentro de populações de *S. sclerotiorum*.

Ao comparar ambos os experimentos observou-se que os isolados 19 e 17 estavam no grupo dos isolados que causaram morte de mais de 30% das plantas no experimento 1 e no experimento 2 esses isolados foram os mais agressivos. Já os isolados 1 e 54 no experimento 1 ficaram no grupo que apresentou morte inferior a 30% e no experimento 2 esses isolados foram estatisticamente menos agressivos. Assim como Otto-Hanson (2011), resultado que também foi encontrado por em feijão, ao analisarem isolados de diversos estados dos USA e outros países.

O isolado 54 é originário da cultura da alface e tanto no experimento 1 quanto no experimento 2 esse isolado foi pouco agressivo. Mesmo sendo de outra cultura, o isolado causou infecção nas plantas de tabaco indicando que o fungo não tem especificidade por hospedeiro, conforme descrito na revisão de Purdy em 1979.

Ambos os experimentos foram realizados com as mesmas cultivares e com os mesmos isolados, porém, em condições experimentais diferentes. Os resultados indicaram que a suscetibilidade da cultivar foi depende do isolado e que as diferentes condições experimentais também foram importantes o desenvolvimento dos sintomas frente aos isolados. Nenhuma das cultivares testadas foi resistente à doença, indicando a importância de novos estudos.

O estudo em questão foi pioneiro para a cultura do tabaco no Brasil. As diferenças encontradas, tanto para a taxa de mortalidade quanto para o progresso da lesão servirão de base para próximos estudos. Independente dos experimentos, ficou claro que a suscetibilidade da cultivar ficou na dependência do isolado. Esses resultados são de extrema importância para estudos de melhoramento de plantas, visto que os mecanismos de resistência das plantas

podem ser suprimidos por um único isolado. Até hoje não há variedades de tabaco resistentes à doença. Medidas como manejo integrado e boas práticas agrícolas tem sido a principal ferramenta para minimizar o problema no campo.

4.5 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho são de grande importância para o manejo do tabaco na região aonde ocorre a doença. Nenhuma cultivar foi resistente frente resistente aos isolados utilizados. Ficou claramente observado que a suscetibilidade da cultivar estava na dependência do isolado, ou seja, os isolados apresentaram diferentes graus de agressividade nas cultivares avaliadas.

Por se tratar de uma cultura que não possui cultivares resistentes ao patógeno, acredita-se que o manejo integrado possa ser a ferramenta mais apropriada para minimizar os danos causados pela doença nas lavouras de tabaco. Por fim, identifica-se a necessidade de novos estudos e sugere-se o uso de isolados mais agressivos para seleção de genótipos de tabaco resistente a doença.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAJANI, M. A.; SAFAIE, N. ALIZADEH, A. Yield loss assessment of Sclerotinia stem rot of canola in Iran. Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran. **Journal of Crop Protection**, Tehran, v. 2, n.2, p. 229-240, 2013.

AHMADI, B. V. et al. Reducing the impact of Sclerotinia disease by determining optimum crop rotations using dynamic programming. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE AGRICULTURAL ECONOMICS SOCIETY, 87., 2013, University of Warwick, United Kingdom. **[Proceedings]**. United Kingdom, 2013.

BARBETTI M. J. et al. Comparative genotype reactions to *Sclerotinia sclerotiorum* within breeding populations of *Brassica napus* and *B. juncea* from India and China. **Euphytica**, Wageningen, v. 197 p. 47-59, 2014.

BEN-YEPHET Y., BITTON S. Use of a selective medium to study the dispersal of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 13, p. 33-40, 1985.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Epidemiology of *Sclerotinia* Stem Rot of Stem of Soybean in Ontario. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 1241-1245, 1988.

GARG H. et al. Pathogenicity of morphologically different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus* and *B. juncea* genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126 p. 305–315, 2010.

GE X. T. et al. Delineation of *Sclerotinia sclerotiorum* pathotypes using differential resistance responses on *Brassica napus* and *B. juncea* genotypes enables identification of resistance to prevailing pathotypes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 127, p. 248-258, 2012.

GOMES, E. V. et al. Microsatellite Markers Reveal Genetic Variation within *Sclerotinia sclerotiorum* Populations in Irrigated Dry Bean Crops in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, 2010. (Version of Record online: 3 AUG 2010)

GONÇALVES, P. R. C. **Reação de Progênes de Feijão, Derivadas de Seleção Recorrente para Mofo Branco, ao Ácido Oxálico**. 2012. 56 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, MG, 2012.

GRABICOSKI, E. M. G. **Caracterização Morfológica e Patogênica de Isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e Detecção em sementes de Soja**. 2012. 136f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Área Concentração Fitopatologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR, 2012.

JHALA, R. et al. Characterized isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* can facilitate identification and verification of resistance to white mold in dry and snap beans. **Annual Report of the Bean Improvement Crops**, East Lansing, v. 57 p. 57–58, 2014.

LEHNER, M d' S. **Estrutura Genética da População de *Sclerotinia sclerotiorum* em Feijoads de Minas Gerais**. 2011. 33f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

LEHNER M. S. et al. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. **Plant Pathology**, Oxford, v. 64 p. 921-931, 2015.

Li Z. Q. et al. Genetic diversity and differentiation of *Sclerotinia sclerotiorum* populations in sunflower. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 37 p. 77–85, 2009.

MEINHARDT, L.W. et al. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27 p. 211–215, 2002.

MUELLER D. S.; HARTMAN G.L.; PEDERSEN W. L.; Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83 p. 1113-1115, 1999.

OTTO-HANSON, L. et al. Variation in *Sclerotinia sclerotiorum* bean isolates from multisite resistance screening locations. **Plant Disease** Saint Paul, v. 95 p.1370–1377, 2011.

SCHWARTZ H. F.; STEADMAN J. R. Factors affecting sclerotium populations of, and apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 383-388, 1977.

SOUZA D. A. de. **Efeito da seleção recorrente para resistência à macha angular na reação ao mofo branco em alelos SSR de progênies de feijão.** 2012. 98p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SOUZA CRUZ. **[Informações obtidas no site]**. Disponível em: <<http://www.souzacruz.com.br/>>_Acesso em: 29 out. 2014.

SUN, J.M. et al. Analysis of the genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations from different regions and host plants by random amplified polymorphic DNA markers. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 47, p. 385–395, 2005.

VIANA, F. C.; BERGER, I. J.; DUARTE, V. Characterization of *Ralstonia solanacearum* Smith populations in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.37, n. 2, mar./apr. 2012.

VIEIRA R. F.; PAULA JUNIOR T. J.; TEIXEIRA H. White Mold Management in Common Bean by Increasing Within-Row Distance Between Plants. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 361-367, 2010.

VITERI D. M. et al. Use of four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different aggressiveness, three inoculations per plant, and delayed multiple evaluations to select common beans with high levels of white mold resistance. **Euphytica**, Wageningen, v 204 p. 457-472, 2015.

WILLIAMS B. et al. Tippingthe Balance: Sclerotinia sclerotiorum Secreted Oxalic Acid Suppresses Host Defenses by Manipulating the Host Redox Environment.

PLoS Pathogens, San Francisco, v. 7, 2011.

XIMENES, I. R. **Importancia e Manejo de Sclerotinia sclerotiorum (Mofa Branco) nos cultivos de Feijão e Soja**. 2013. Monografia - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

YANAR, Y; ONARAN, A. Mycelial compatibility groups and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary causal agent of white mold disease of greenhouse grown cucumber in Antalya-Turkey. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10 p. 3739–3746, 2011.

5 ARTIGO 2²

Caracterização populacional de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* obtida de diferentes municípios do Brasil

Marcia Peripolli¹, José Antônio Martinelli², Carla Andrea Delatorre³

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (ênfase em Fitopatologia) ;
Departamento de Fitossanidade e, de Plantas de Lavouras, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre,
RS, Brasil;

Autor para correspondência: marcia.peripolli@gmail.com

ABSTRACT

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) which is originated from South America and the culture is of great importance for the southern region being the main source of income for many small farmers. However, there are many factors that limit productivity gains such as inadequate management, lack of good agricultural

² Artigo formatado conforme as normas da Revista Summa Phytopathologica.

practices and the occurrence of diseases. Among the diseases, the white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, can devastate crops. White mold affects mainly the crops located in the coastal region of Santa Catarina, a place that favors the development of the fungus due to climatic characteristics. There are many trials for the control of white mold in tobacco production and know the genetic diversity of *S. sclerotiorum* can contribute to studies aimed at reducing the disease in the field. In this context, the aim of this work was to study the genetic structure of *S. sclerotiorum* in areas producing tobacco. Thirty three *S. sclerotiorum* isolates from Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná were used. Through microsatellite technique (SSR) evaluated the polymorphism of isolates by using ten markers. This is the first report of the existence of genetic variability of *S. sclerotiorum* isolated from tobacco plants. It 114 alleles were detected with an average of 11 alleles per *Locus*. Some markers showed null allele in some genotypes, particularly marker 99, which was zero in 14 isolates. Most of the isolates (61%) showed unique alleles and clones were observed. The analysis of polymorphism information content (PIC) was highly informative (PIC> 0:50) for all markers.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*, genetical diversity, microsatellite technique, SSR

RESUMO

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) originário da América do Sul é cultivado na região sul do Brasil e toda a produtividade classifica o país como o principal exportador mundial. As doenças podem restringir os ganhos de produtividade

Dentre elas, o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, atinge, principalmente, as lavouras localizadas na região litorânea de Santa Catarina, local que favorece o desenvolvimento do fungo devido às características climáticas. A doença é de difícil controle devido a persistência dos escleródios no solo e pela elevada diversidade genética do patógeno. Neste contexto, objetivou-se com este trabalho avaliar a diversidade genética de *Sclerotinia sclerotiorum* nas áreas produtoras de tabaco. Foram utilizados 33 isolados de *S. sclerotiorum* dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná sendo, 27 isolados do tabaco, dois da cenoura, um do nabo, um da soja, um da alface e um da canola. Através da técnica de microssatélites (SSR) foi avaliado o polimorfismo dos isolados pela utilização de dez marcadores. Este foi o primeiro relato da existência de diversidade genética de *S. sclerotiorum* isolados de plantas de tabaco. Foram detectados 114 alelos com média de 11 alelos por *Locus*. Alguns marcadores apresentaram alelo nulo em alguns genótipos, em especial o marcador 99, o qual foi nulo em 14 isolados. A maioria dos isolados (61%) apresentaram alelos exclusivos e clones não foram observados. A análise da informação do conteúdo de polimorfismo (PIC) foi altamente informativa (PIC > 0.50) para todos os marcadores.

Palavras chave: Sclerotinia, diversidade genética, microssistema réis, SSR

5.1 INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um fitopatógeno de alta relevância para a economia mundial visto que pode causar grandes prejuízos em soja, feijão, tabaco, girassol (Boland e Hall, 1994). A doença causada pelo patógeno é

mundialmente conhecida com mofo branco que está amplamente distribuído e possui mais de 400 espécies hospedeiras (Boland e Hall, 1994), sendo o primeiro relato no Brasil, em 1921, na cultura da batata (Biosci, 2012; Venturoso 2013).

Por ser um fungo altamente agressivo e por estar associado à doença, em culturas de grande interesse comercial, muitos estudos sobre a diversidade genética do patógeno tem sido reportado (Kohli *et al.*, 1992; Winton *et al.*, 1999; Hambleton *et al.*, 2002; Ekins *et al.*, 2006; Sexton *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Malvarez *et al.*, 2007; Li ZQ *et al.*, 2009; Carpenter *et al.*, 2011; Attanayake *et al.*, 2012, Lehner, 2015,). Conhecer a estrutura e a dinâmica da população de *S. sclerotiorum* é a chave para entender a história e a distribuição geográfica do patógeno nos mais diferentes hospedeiros (Gomes *et al.*, 2010). Muitas técnicas moleculares são empregadas para análise de diversidade genética de *Sclerotinia*, sendo a técnica de microssatélites – Sequencias Simples Repetida – SSR, é amplamente utilizada (Lehner 2015; Silva 2015; Abreu e Souza 2015; Clarkson 2013; Attanayake *et al.*, 2013; Barari *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2010; Hemmati *et al.*, 2009; Mert-Turk *et al.*, 2007; Sexton *et al.*, 2006).

A caracterização de isolados de *S. sclerotiorum* utilizando dez marcadores SSR em quatro lavouras de feijão no cerrado brasileiro encontrou alta variabilidade genética dentro e entre as populações de *S. sclerotiorum* (Gomes *et al.*, 2010). Porém clones foram facilmente encontrados em lavouras devido a sobrevivência de escleródios no solo (Malvarez *et al.*, 2007; Clarkson *et al.*, 2013). Já pelas análises de RFLP, não foi observada diversidade genética entre 21 isolados de feijão, um de batata e um de pimentão apesar da presença de dois grupos de compatibilidade micelial (GCM) (Meinhardt *et al.*, 2002). Porém, polimorfismo genético foi observado entre isolados do mesmo GCM utilizando-se

as técnicas de amplificação da região cromossomal do telômero e de microssatélite.

Através dessa abordagem buscou-se com este trabalho avaliar diversidade das populações de *S. sclerotiorum* no sul do Brasil focando em lavouras de tabaco. Os resultados deste estudo poderão subsidiar pesquisas em epidemiologia do patógeno bem como buscar melhoria nos sistemas de manejo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Coleta e preservação das amostras

Os isolados de *S. sclerotiorum* foram obtidos a partir de plantas infectadas pela doença, sendo 27 isolados da cultura do tabaco, dois da cenoura, um do nabo, um da soja, um da alface e um da canola. Os escleródios foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) acidificado com ácido láctico a 25%. Inicialmente os escleródios foram desinfestados por 1 minuto em álcool 70%, seguido da desinfestação de hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto e enxaguados com água destilada estéril. Os escleródios foram cultivados em BDA e as placas foram incubadas em BOD à 20°C por sete dias. As colônias que não apresentaram contaminação foram selecionadas e delas retirados os escleródios, os quais foram colocados em placas de Petri e mantidos por 24 horas em incubadora a 27°C para secagem. Posterior às 24 horas os escleródios, já secos, foram armazenados em microtubos e acondicionados em freezer a -20°C para a preservação e posterior utilização.

5.2.2 Extração de DNA

O DNA de cada isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* foi extraído a partir de 100 mg do *pellet* celular do micélio do fungo após um cultivo de sete a dez em meio BDA. O DNA genômico foi extraído através do uso de kit comercial Wirad (Promega®) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA obtido foi mensurado em Qubit™ Invitrogen™ e alíquotas de 30ng foram utilizadas para as análises. O DNA genômico foi amplificado usando dez marcadores SSR previamente descritos em *S. sclerotiorum* (Sirjusingh e Kohn, 2001). Para verificação do DNA genômico, as amostras foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (2%), corado com intercalante de DNA Sybr SAFE (Invitrogen®) e fotodocumentado sob luz ultravioleta em transluminador por Sistema Alpha (Innotech®). Todas as amostras amplificadas em gel de agarose foram submetidas à corrida em gel de poliacrilamida (9 a 13%) para verificação do polimorfismo. As bandas polimórficas obtidas foram avaliadas em comparação com marcador molecular de tamanho conhecido (pares de bases – pb) e estimado o tamanho de cada amplicon dos isolados do patógeno.

5.2.3 Análise dos microssatélites

As reações de amplificação continham 30 ng de DNA genômico, 100 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP e dCTP), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase, 0,5µM de cada primer do par, 2 µM de tampão de reação (50mM TRIS pH 8,3; 2 mM MgCl₂; 20mM KCl; 10µg de BSA, 0,25% de ficol 400; 10 mM de tartrazine) e água ultra pura livre de DNase e RNase, totalizando um volume de reação de 50 µL. As amplificações foram

realizadas em termociclador, por meio do seguinte programa descrito por Sirjusingh e Kohn (2001): 95°C, por 8 minutos, para uma desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C, pareamento dos primers a 55 °C a 60 °C (Tabela 12) e extensão a 72°C, por 30-45 segundos, com 5 minutos de extensão no ciclo final.

5.2.4 Análise da diversidade genética

As estimativas entre os alelos e *Locus* foram calculadas diretamente a partir dos dados genotípicos utilizando o programa GENEPOP 4.5.1 (Raymond e Rousset, 2008) e PAST versão 2.17c. Para isso, os dados genotípicos foram inseridos em uma matriz. Para cada par de *loci* de dentro de cada amostra, a estimativa imparcial do valor P foi indicada, assim como o erro padrão através do GENEPOP 4.5.1 e em seguida, um teste global (método de Fisher) para cada par de *loci* foi realizada através de amostras. As estimativas de diversidade genética foram calculadas com a ajuda dos programas GENEPOP 4.5.1 (Raymond e Rousset, 2008), e através da análise do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). Para investigar a similaridade genética entre isolados foi realizada análise de coordenadas Principais (PCA) no programa PAST versão 2.17c. Uma matriz de distância baseada nos alelos comuns entre isolados foi usada para mostrar a estrutura genética dos isolados. Além disso, uma árvore foi construída utilizando o agrupamento pelas médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) com base na matriz de microssatélites em comum entre os isolados através do programa PAST versão 2.17c.

5.3 RESULTADOS

Foram avaliados 10 *loci* SSR em 21 isolados de *S. sclerotiorum*. Houve amplificação de produtos em gel de agarose 2% usando os conjuntos de primers em todas as amostras. Em poliacrilamida foi possível visualizar bandas polimórficas. Através dos perfis eletroforéticos obtidos com cada microssatélite, os tamanhos dos amplicons foram estimados e colocados em uma matriz. Das 33 amostras testadas neste estudo, 14 (42%) não amplificaram o SSR 99.

A análise de desequilíbrio de ligação, gerada a partir da inserção dos dados da matriz genética no programa GENEPOP, está indicada no Apêndice 5, Os conjuntos que apresentaram valores de p acima de 0,05 indicaram que os *loci* estavam em desequilíbrio de ligação, ou seja, foram independentes. Os dados com valores menores de 0,05 não foram utilizados em conjunto para uma avaliação, pois estão correlacionados.

Foram detectados 114 alelos com uma média de 11 alelos por *locus*. O número de alelos por *locus* variou de sete para o marcador 99 à 16 para o marcador 92. Alguns marcadores apresentaram alelo nulo em alguns genótipos, em especial o marcador 99, o qual foi nulo em 14 isolados (Apêndice 5). A maioria dos isolados (61%) apresentaram alelos exclusivos, sendo 55% destes com dois alelos exclusivos, 35% com um alelo e 10% com três (Apêndice 5). Através da PIC foi observado menor valor para o *Locus* 9 (0,55) e maior valor para os loci 106 e 36 (0,77) (Tabela 1). Os resultados da PIC (Tabela 1) para todos os loci utilizados ficaram acima de 0,55, sendo 60% acima de 0,72 sendo altamente informativos, conforme descrito por Botstein 1980.

A Estimativa de Diversidade Genética indica que os alelos não estão

igualmente distribuídos nas diferentes populações, (P-valor < 0,05) (P-valor= 0,0126018). Foi possível notar que ocorreram alelos exclusivos nos isolados (Apêndices 6 e 7), entretanto como os mesmos apresentaram o N amostral menor que 20, o indicado seria ampliar este n para confirmar se a exclusividade do alelo é mantida.

TABELA 1. Locus, Motivo de repetição (Sirjusingh e Kohn, 2001), número de alelos, tamanho dos pares de base (pb) e informação do conteúdo de polimorfismo (PIC) dos dez marcadores SSR utilizados.

<i>Locus</i>	Repetição	nº de alelos	Pb alelos	PIC
7	(GA)14	10	166 - 190	0,67
9	(CA)9 (CT)9	13	350 - 392	0,55
12	(CA)9	12	225 - 251	0,74
36	CA6(CGCA)2CAT2	15	400 - 457	0,77
50	CA7(TACA)2	9	509 - 525	0,62
92	(CT)12	16	415 - 519	0,75
99	(GTAA)2 (GCAA)(GTAA)3	7	402 - 422	0,72
106	(CATA)25	14	511 - 557	0,77
110	(TATG)9	8	238 - 278	0,66
119	(GTAT)6 e (TACA)5	10	391 - 427	0,73

Para acessar o grupamento dos isolados com base no polimorfismo dos marcadores SSR, foi conduzida uma Análise de Componentes Principais (Figura 1). Os isolados originados de diferentes Estados não formaram grupos distintos, indicando que o local não foi um fator determinante da variabilidade (Figura 1). Esta informação é corroborada pela análise de Cluster (de agrupamento)

indicando que as populações menores originárias do Paraná e Rio Grande do Sul não diferem geneticamente da população maior de Santa Catarina (Figura 2). Além disso, através do gráfico de dispersão, não foi possível observar agrupamentos dos indivíduos por estado e sim por similaridade.

Se analisados os indivíduos originários de Santa Catarina (n=23) mesmo assim não haveria agrupamentos o que pode ser observado no gráfico de dispersão (Figura 1).

Os isolados 9 e 6 de Santa Catarina se distanciaram dos demais por apresentarem o produto de amplificação com mesmo tamanho de pares de bases para os *loci* 7, 9 e 12 e por apresentarem alelos nulos nos *loci* 50, 99, 110 e 119. Já os isolados 54 e 58, do Rio Grande do Sul, amplificaram os *loci* 50, 99 e 110.

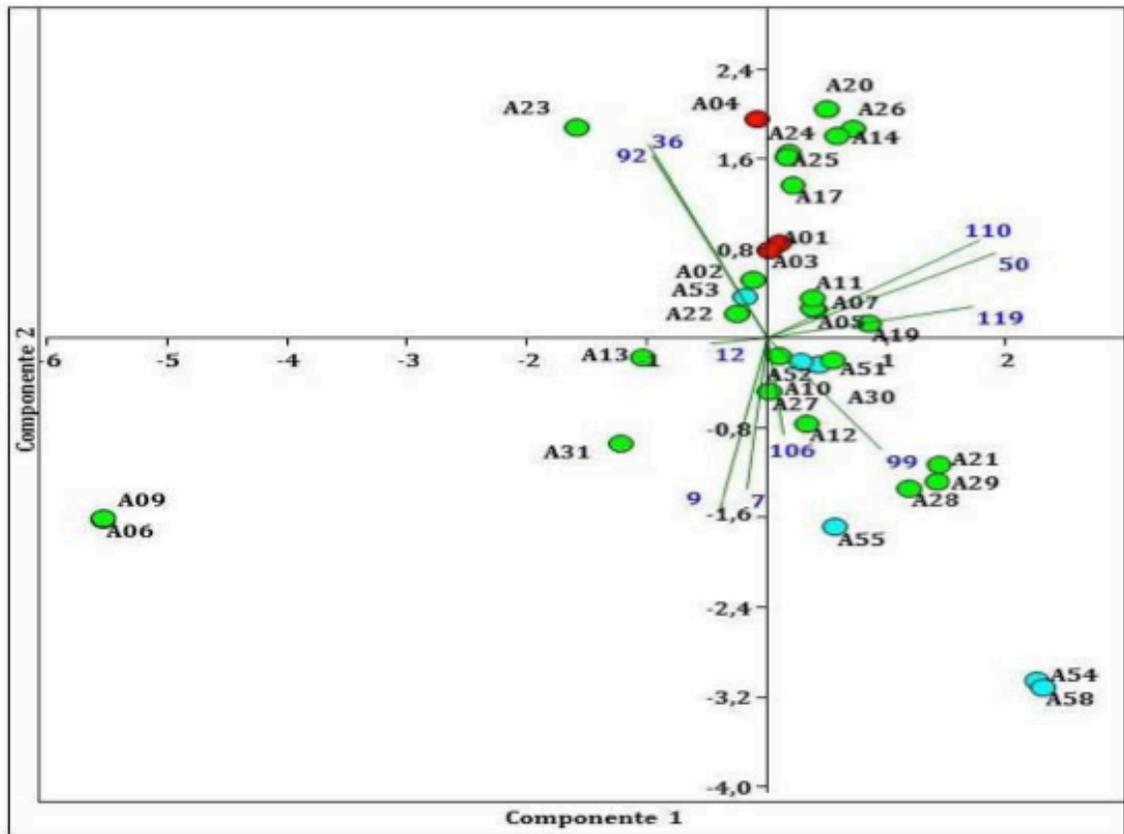


FIGURA 1. Dispersão Gráfica a partir da Análise dos Principais Componentes PC1=26,8%: e PC2=19,1%. Isolados em vermelho obtidos no Paraná; em azul no Rio Grande do Sul e em verde em Santa Catarina. Números em azuis correspondem aos marcadores. Setas verdes indicam o quanto a variável marcador é responsável pelo distanciamento da amostra.

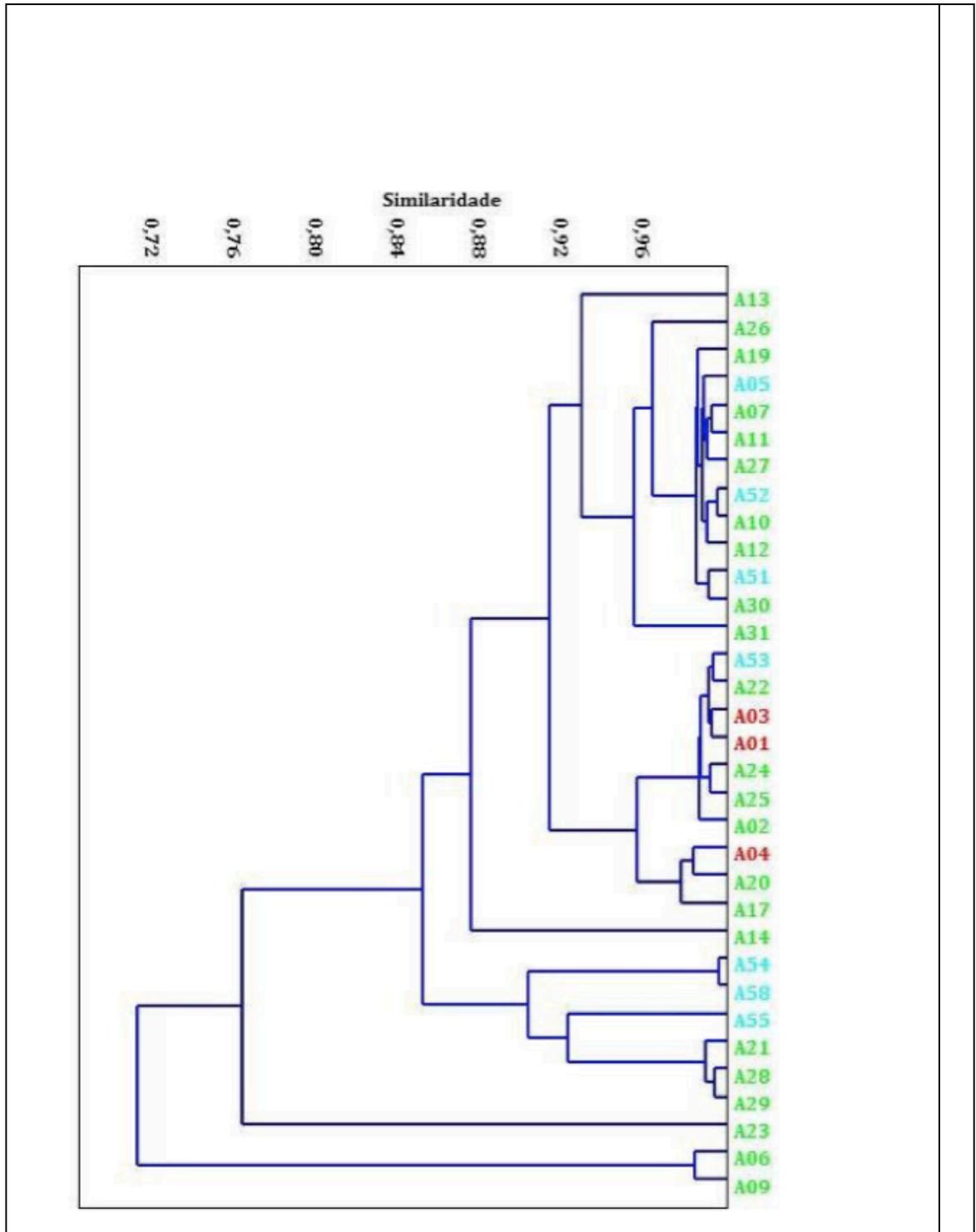


FIGURA 2. Análise de Agrupamento pelo índice de Bray Curtis. Estados: Vermelho: PR- Paraná; Azul: RS – Rio Grande do Sul; Verde: SC – Santa CATARINA.

Através da análise de agrupamento (Figura 2) não foi possível observar a presença de clones. A partir do nível de similaridade de 0,96 pode-se observar dois grandes agrupamentos, sendo: agrupamento A (isolados 26, 19, 05, 07, 11, 27, 52, 10, 12, 51, 30 e 31) e agrupamento B (isolados 53, 22, 03, 01, 24, 25, 02, 04, 20 e 17). Isso sugere que os isolados são próximos geneticamente, mas que não são iguais.

5.4 DISCUSSÃO

Muitos estudos sobre diversidade genética de *S. sclerotiorum* foram realizados no Brasil com isolados de variadas culturas, feijão, batata, pimentão, lentilha, canola, girassol. Através da técnica de PCR/RFLP, teste de compatibilidade micelial (Meinhardt *et al.*, 2002); e pela técnica de microssatélites (Gomes *et al.*, 2011). Na cultura do tabaco este é o primeiro relato da existência de diversidade genética de *S. sclerotiorum* no Brasil.

Pela primeira vez é relatado neste trabalho, a existência de variabilidade genética através da técnica dos marcadores SSR em isolados de *S. sclerotiorum* obtidos de tabaco. Dos 25 marcadores microssatélites descritos por Sirjusingh e Kohn (2001), dez foram utilizados no presente estudo, os quais foram eficientes para mostrar a diversidade genética entre os isolados estudados. Esta diversidade foi confirmada pela análise do PIC, os quais foram > 0.5 para todos os marcadores utilizados. Segundo Botstein 1980, $PIC > 0.5$ e quanto mais próximos de 1 são altamente informativos, sendo neste estudo 60% dos marcadores apresentaram $PIC > 0.72$.

Foi possível observar diversidade genética entre os isolados dentro de um

mesmo estado de origem, mas não entre eles devido à ausência de agrupamentos. Resultado semelhante foi observado por Gomes *et al.* (2011) ao utilizarem 10 marcadores microsatélites (sendo 6 marcadores iguais aos utilizados neste estudo) em 79 isolados de *S. sclerotiorum* de feijão, no Brasil. A dificuldade em observar a diversidade entre isolados por estados esteve variação da quantidade (n) de isolados obtidos por estado. Os estados do Rio Grande do Sul e Paraná apresentaram n muito baixo (n = 7 e n = 3, respectivamente) para serem comparados com o n de Santa Catarina (n = 23). Esse fato pode ser explicado pelo local de ocorrência da doença, a qual, na lavoura do tabaco é bem comum na região de Santa Catarina e nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná é pouco frequente.

Não foram observados agrupamentos pelos estados de origem, ou seja, os isolados dos três estados estavam dispersos, mostrando que a diversidade estava entre os isolados. Ao estudarem 50 isolados de *S. sclerotiorum* a partir da amplificação de nove marcadores, Abreu e Souza (2015) observaram polimorfismo dentro da população. Além disso, Gomes *et al.* (2011) observaram que a variabilidade foi maior dentro das populações do que entre elas.

A variabilidade genética dos isolados também pode ser observada no número de alelos. Neste trabalho foram encontrados 114 alelos, variando de 8 a 17 por *locus*. Já Gomes *et al.* (2011) encontraram 102 diferentes alelos, variando de 6 a 18 por *locus*, sendo a variação semelhante a observado neste estudo. Entretanto, Atallah *et al.* (2004), ao utilizarem 5 marcadores iguais aos utilizados neste trabalho, verificaram que a variação dos alelos foi mais baixa, de 2 a 5 por *locus*.

Segundo Sneath e Sokal (1973) a análise de cluster é um conjunto de

técnicas relacionadas que buscam medir a similaridade ou a distância entre conjuntos de dados e expressa-la em uma árvore ultra métrica. Apesar da maioria dos isolados analisados neste trabalho apresentarem similaridade genética superior a 0,92, nenhum isolado foi geneticamente igual ao outro, indicando ausência de clones. Porém, clones são facilmente encontrados em lavouras devido à sobrevivência de escleródios no solo (Malvárez *et al.*, 2007; Clarkson *et al.*, 2013). Esses resultados foram observados em lavouras de canola, soja, repolho e kiwi na América do Norte, Europa, Nova Zelândia e Austrália (Malvárez *et al.*, 2007). No Brasil, também foi possível encontrar populações clonais de *S. Sclerotiorum* em lavouras de feijão (Lehner *et al.*, 2014).

A ausência de clones e a diversidade entre os isolados encontrados neste estudo indicam que o patógeno é variável dentro de pequenas áreas geográficas (por municípios). Similar ao observado no cerrado brasileiro em análises de isolados originários de feijão irrigado (Gomes *et al.*, 2011).

A variabilidade dentro de pequenas áreas geográficas pode também estar associada aos valores do conteúdo de informação do polimorfismo (PIC média = 0,70), pois quando maior que 0,5 mais informativos são os resultados. Além disso, 61% dos isolados apresentaram alelos exclusivos. Com isso sugere-se que a variabilidade dos isolados deste estudo é moderada.

A presença de alelos exclusivos são de grande importância para otimização de análises de diversidade de isolados de *S. sclerotiorum*. O *Locus* 36, neste estudo, teve nove alelos exclusivos, o qual poderá ser um *Locus* de referência para futuras pesquisas devido ao número de alelos exclusivos.

5.5 CONCLUSÕES

A ausência de clones observada neste estudo indica que a população de *S. sclerotiorum* em lavouras de tabaco é variável. As análises de diversidade genética dos isolados analisados sugerem que o patógeno é variável dentro de pequenas áreas geográficas, o que pode ser um fator da permanência da doenças no solo. O n amostral dos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná deverá ser aumentado em estudos posteriores, devido à ausência de correlação das amostras por estado de origem. Esses resultados demonstram a necessidade de estudos mais aprofundados, os quais serão de extrema relevância em estudos de melhoramento genético na seleção de genótipos.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATALLAH, ZK; LARGET, B.; CHEN, X.; JOHNSON, D.A. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, p. 737–742, 2004.

ATTANAYAKE, R.N. et al. Genetic and phenotypic diversity and random association of DNA markers of isolates of the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* from soil on a fine geographic scale. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 55, p. 28-36, 2012.

ATTANAYAKE, R.N. et al. Inferring outcrossing in the homothallic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* using linkage disequilibrium decay. **Heredity**, Oxford, v. 113, p. 353-363, 2014.

BARARI, H.; ALAVI, V.; BADALYAN, S.M. Genetic and morphological differences among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* by microsatellite markers, mycelial compatibility groups (MCGs) and aggressiveness in North Iran. **Romanian Agricultural Research**, Calarasi, v. 29, p. 323–331, 2012.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 16, p. 93–108, 1994.

EKINS, M.G. et al. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on sunflower in Australia. *Australasian Plant Pathology*, Clayton, v. 40, p. 99–108, 2011.

GARG H. et al. Pathogenicity of morphologically different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus* and *B. juncea* genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126 p. 305–315, 2010.

GOMES, E.V. et al. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, p. 94–99, 2011.

GONÇALVES, P. R. C. **Reação de Progênes de Feijão, Derivadas de Seleção Recorrente para Mofo Branco, ao Ácido Oxálico**. 2012. 56 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, MG, 2012.

GRABICOSKI, E. M. G. **Caracterização Morfológica e Patogênica de Isolados de Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary e Detecção em sementes de Soja.**

2012. 136f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia

– Área Concentração Fitopatologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR, 2012.

HAMBLETON, S.; WALKER, C.; KOHN, L.M. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999–2000 samples from Ontario and Quebec soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 24, p. 309–315, 2002.

HEMMATI, R.; JAVAN-NIKKHAH, M.; LINDE, C.C. Population genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in Iran. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, p. 617–628, 2009.

KOHLI, Y. et al. Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 875–880, 1992.

LEHNER M. S. et al. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro- scales. **Plant Pathology**, Oxford, v. 64 p. 921-931, 2015.

LEHNER, M d' S. **Estrutura Genética da População de Sclerotinia sclerotiorum em Feijoads de Minas Gerais**. 2011. 33f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

Li Z. Q. et al. Genetic diversity and differentiation of *Sclerotinia sclerotiorum* populations in sunflower. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 37 p. 77–85, 2009.

LITHOLDO JUNIOR, C.G. et al. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, p. 868–877, 2011.

MALVAREZ, G. et al. New populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in California and peas and lentils in Washington. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 470–483, 2007.

MEINHARDT, L.W. et al. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27 p. 211–215, 2002.

MERT-TÜRK, F. et al. Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Çanakkale Province of Turkey. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 182–187, 2007.

MORDUE, J. E. M.; HOLLIDAY P. *Sclerotinia sclerotiorum*. Description of pathogenic fungi and bacteria. Kew, Surrey, England: Commonw. Mycol. Inst. 1976. n° 513

PRICE, K.; CALHOUN J. Pathogenicity of isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary to several hosts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 232-238, 1975.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 875–880, 1979.

SEXTON, A.C.; HOWLETT, B.J. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. **Current Genetics**, New York, v. 46, p. 357–365, 2004.

SEXTON, A.C.; WHITTEN, A.R.; HOWLETT, B.J. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in an Australian canola field at flowering and stem-infection stages of the disease cycle. **Genome**, Ottawa, v. 49, p. 1408 – 1415, 2006.

SIRJUSINGH, C.; KOHN, M. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Ecology**, Oxford, v.1, n.4, p. 267-269, 2001.

SOUZA D. A. de. **Efeito da seleção recorrente para resistência à macha angular na reação ao mofo branco em alelos SSR de progênies de feijão.** 2012. 98p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SUN, J.M. et al. Analysis of the genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations from different regions and host plants by random amplified polymorphic DNA markers. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 47, p. 385–395, 2005.

VENTUROSOS, L. d' R. et al. Produção de soja e germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes coberturas de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 615-626, mar./abr. 2013.

WILLIAMS B. et al. Tipping the Balance: *Sclerotinia sclerotiorum* Secreted Oxalic Acid Suppresses Host Defenses by Manipulating the Host Redox Environment. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, 2011.

WINTON, L.M.; LEINER, R.H.; KROHN, A.L. Genetic diversity of *Sclerotinia* species from Alaskan vegetable crops. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 28, p. 426–434, 2006.

WU, B.M.; SUBBARAO, K.V. Analyses of lettuce drop incidence and population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 1322–1329, 2006.

6 CONCLUSÕES GERAIS

As inferências dos resultados deste trabalho contribuem para pesquisas em melhoramento de plantas, epidemiologia, manejo e controle da doença. Neste estudo todas as cultivares avaliadas foram suscetível à doença e os diferentes níveis de agressividade foram determina são fatores importantes para a seleção de genótipos resistentes à doença.

Por se tratar de uma cultura que não possui cultivares resistentes ao patógeno, acredita-se que o manejo integrado seja a ferramenta mais pertinente para minimizar os malefícios causados pela doença nas lavouras de tabaco. Visto que é possível encontrar diferentes isolados de *S. sclerotiorum* em uma mesma área geográfica.

7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Resultado da análise de coeficientes aleatórios para as plantas considerando as possíveis interações cultivar x tempo x isolado. Indicando que a significância está na interação tríplice cultivar x tempo x isolado, no experimento 2.

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Cultivar	4	304	1.24	0.2922
Isolado	8	303	3.87	0.0002
Cultivar*Isolado	30	301	0.83	0.7297
Tempo	1	266	131.96	<.0001
Tempo*Cultivar	4	264	3.05	0.0175
Tempo*Isolado	8	263	3.91	0.0002
Tempo*Cultiv*Isolado	30	262	1.70	0.0160

APÊNDICE 2. Resultado da análise da interação tempo X cultivar X isolado

Solution for Fixed Effects							
Effect	Cultivar	Isolado	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Tempo*Cultiv*Isolado	1	1	0.04120	0.2470	244	0.17	0.8677
Tempo*Cultiv*Isolado	1	4	0.06862	0.2483	249	0.28	0.7825
Tempo*Cultiv*Isolado	1	10	0.3706	0.2654	263	1.40	0.1637
Tempo*Cultiv*Isolado	1	11	0.4950	0.2765	297	1.79	0.0744
Tempo*Cultiv*Isolado	1	17	0.9220	0.2722	298	3.39	0.0008
Tempo*Cultiv*Isolado	1	19	0.7187	0.2835	310	2.54	0.0117
Tempo*Cultiv*Isolado	1	21	0.2644	0.2504	257	1.06	0.2921
Tempo*Cultiv*Isolado	1	54	0.2730	0.2477	246	1.10	0.2715
Tempo*Cultiv*Isolado	1	56	0.1903	0.2476	246	0.77	0.4430
Tempo*Cultiv*Isolado	2	1	0.1689	0.2464	242	0.69	0.4939
Tempo*Cultiv*Isolado	2	4	0.6157	0.2511	258	2.45	0.0149
Tempo*Cultiv*Isolado	2	10	0.7854	0.2683	282	2.93	0.0037
Tempo*Cultiv*Isolado	2	11	0.6488	0.2609	289	2.49	0.0135
Tempo*Cultiv*Isolado	2	17	0.5040	0.2545	274	1.98	0.0487
Tempo*Cultiv*Isolado	2	19	0.6866	0.2548	270	2.69	0.0075
Tempo*Cultiv*Isolado	2	21	0.4368	0.2621	257	1.67	0.0968
Tempo*Cultiv*Isolado	2	54	0.03138	0.2536	258	0.12	0.9016
Tempo*Cultiv*Isolado	2	56	0.3754	0.2476	246	1.52	0.1308
Tempo*Cultiv*Isolado	3	1	0	0.2464	242	0.00	1.000
Tempo*Cultiv*Isolado	3	4	0.1323	0.2470	244	0.54	0.5928
Tempo*Cultiv*Isolado	3	10	0.4511	0.2681	267	1.68	0.0937
Tempo*Cultiv*Isolado	3	19	0.5669	0.2739	293	2.07	0.0394
Tempo*Cultiv*Isolado	3	21	21.232	0.2778	337	7.64	<.0001
Tempo*Cultiv*Isolado	3	54	0.2962	0.2604	244	1.14	0.2565
Tempo*Cultiv*Isolado	3	56	14.141	0.2608	285	5.42	<.0001
Tempo*Cultiv*Isolado	4	1	0.1888	0.2470	244	0.76	0.4454
Tempo*Cultiv*Isolado	4	4	0.2894	0.2476	246	1.17	0.2437
Tempo*Cultiv*Isolado	4	10	0.1960	0.2521	264	0.78	0.4376
Tempo*Cultiv*Isolado	4	11	0.2043	0.2772	255	0.74	0.4618
Tempo*Cultiv*Isolado	4	17	0.4091	0.2539	271	1.61	0.1082
Tempo*Cultiv*Isolado	4	19	0.4191	0.2672	269	1.57	0.1179
Tempo*Cultiv*Isolado	4	21	0.8397	0.2526	262	3.32	0.0010
Tempo*Cultiv*Isolado	4	54	0.03571	0.2483	249	0.14	0.8857
Tempo*Cultiv*Isolado	4	56	0.7812	0.2597	279	3.01	0.0029
Tempo*Cultiv*Isolado	5	1	0.2055	0.2483	248	0.83	0.4087
Tempo*Cultiv*Isolado	5	4	0.3191	0.2470	244	1.29	0.1976
Tempo*Cultiv*Isolado	5	10	0.2641	0.2470	244	1.07	0.2861
Tempo*Cultiv*Isolado	5	11	0.3175	0.2520	264	1.26	0.2089

Continuação APÊNDICE 2. Resultado da análise da interação tempo X cultivar X isolado.

Tempo*Cultiv*Isolado	5	11	0.3175	0.2520	264	1.26	0.2089
Tempo*Cultiv*Isolado	5	17	0.5527	0.2527	263	2.19	0.0296
Tempo*Cultiv*Isolado	5	19	0.5799	0.2653	269	2.19	0.0297
Tempo*Cultiv*Isolado	5	21	0.2573	0.2490	252	1.03	0.3024
Tempo*Cultiv*Isolado	5	54	0.2469	0.2498	254	0.99	0.3240
Tempo*Cultiv*Isolado	5	56	0.2234	0.2490	252	0.90	0.3706

APÊNDICE 3. Iniciadores utilizados na amplificação indicando *locus*, repetição, temperatura de pareamento (T), tamanho dos pares de base (pb), número de alelos para cada *locus* de microssatélite usado para caracterização da população de *Sclerotinia sclerotiorum* (Sirjusingh e Kohn, 2001). A coluna “outras espécies” indica se os primers amplificam outras espécies de fungos.

Locus (acesso nº)	Sequência 5' - 3'	Repetição	T (°C)	Tamanho (bp)	Nº de alelos	Outras espécies
7- 2:AF377902_F	TTTGCGTATTATGGTGGG C	(GA)14	55	160–172	4	Não
7- 2:AF377902_R	ATGGCGCAACTCTCAATA GG					
9- 2:AF377903_F	GCCGATATGGACAATGTA CACC	(CA)9 (CT)9	55	358–382	4	Não
9- 2:AF377903_R	TCTTCGCAGCTCGACAAG G					
12- 2:AF377906_F	CGATAATTTCCCCTCACT TGC	(CA)9	55	215–225	4	Não
12- 2:AF377906_R	GGAAGTCCTGATATCGTT GAGG					
36-4:AF377914_F	GAATCTCTGTCCCACCAT CG	CA6(CGC A)2CAT2	60	415–429	2	Sim
36-4:AF377914_R	AGCCCATGTTTGGTTGTA CG					
92-4:AF377919_F	TCGCCTCAGAAGAATGTG C	(CT)12	60	374–378	2	Não
92-4:AF377919_R	AGCGGGTTACAAGGAGAT GG					
106- 4:AF377921_F	TGCATCTCGATGCTTGAA TC	(CATA)25	55	491–571	10	Sim
106- 4:AF377921_R	CCTGCAGGGAGAAACATC AC					
50-4:AF377917_F	CCCTACAATATCCCATGG AGTC	CA7(TACA)2	60	419–527	3	Não
50-4:AF377917_R	CCTCGTCTATCCGTCCAT C					
119:4AF377925_F	GTAACAAGAGACCAAAT TCGG	(GTAT)6 e (TACA)5	60	369–391	3	Não
119:4AF377925_R	TGAACGAGCTGTCAATCC C					
110- 4:AF377922_F	ATCCCTAACATCCCTAAC GC	(TATG)9	55	362–378	5	Sim
110- 4:AF377922_R	GGAGAATTGAAGAATTGA ATGC					
99-4:AF377926_F	CTCATTTTCATCCCATCTCT CCAATT	(GTAA)2 (GCAA)(G TAA)3	55	402–422	2	Sim
99-4:AF377926_R	CAAGCCTTCCTCAGCC					

APÊNDICE 4. Matriz genética contendo o tamanho, em pares de bases, de cada amplificação com o respectivo SSR, em cada uma das amostras. Os números indicam o tamanho em pares de base (pb) obtidos na amplificação para cada conjunto de primers.

SSR	7	9	12	36	50	92	99	106	110	119
Amostras	Tamanho dos amplicons									
1	168	368	231	421	511	511	0	531	254	407
2	182	376	239	443	521	503	0	515	262	407
3	176	368	235	432	519	501	0	535	254	403
4	0	368	241	454	519	497	0	515	250	391
5	188	368	243	443	519	503	410	515	262	411
6	182	380	239	454	0	503	0	535	0	0
7	178	368	239	454	515	505	402	545	246	419
9	182	380	239	423	0	519	0	511	0	0
10	176	376	251	432	515	505	418	557	254	411
11	178	366	243	454	525	501	418	527	246	423
12	176	392	233	443	513	505	422	545	246	423
13	176	374	237	454	515	503	406	535	254	0
14	176	352	231	421	515	503	414	0	254	423
17	0	374	239	427	511	415	0	515	262	407
19	172	374	225	443	511	503	402	549	278	411
21	0	366	227	432	509	493	0	519	266	427
21	172	366	235	0	509	417	406	523	262	399
22	172	382	239	420	509	515	0	549	258	403
23	176	358	235	410	513	517	0	0	238	0
24	176	350	235	441	515	515	0	523	262	399
25	170	350	237	439	515	515	0	553	258	411
26	0	358	237	447	513	519	406	549	238	411
27	176	388	245	457	515	515	406	523	250	415
28	188	368	245	0	517	421	410	521	250	419
29	190	368	237	0	517	423	402	519	262	415
30	176	378	237	400	521	513	410	541	262	423
31	176	378	237	430	523	517	410	541	0	423
51	178	378	233	410	523	511	410	529	238	411
52	176	378	241	430	517	509	414	549	250	411
53	166	378	239	408	513	509	0	541	254	403
54	178	374	233	0	517	0	416	519	250	403
55	186	390	233	0	517	427	0	515	238	407
58	176	376	229	0	517	0	416	515	250	395

APÊNDICE 5. Avaliação do desequilíbrio de ligação obtida a partir do software GENEPOP

Locus pair			Chi2	df	P-valor	Locus pair			Chi2	df	P-valor
7	e	9	0,81564	4	0,94	12	e	106	3,07828	4	0,54
7	e	12	5,60867	4	0,23	36	e	106	1,53786	2	0,46
9	e	12	1,00926	4	0,91	50	e	106	1,48689	4	0,83
7	e	36	0,04486	2	0,98	92	e	106	6,47632	4	0,17
9	e	36	0	2	1	99	e	106	4,03265	4	0,4
12	e	36	0,39516	2	0,82	7	e	110	4,10633	4	0,39
7	e	50	8,78977	4	0,07	9	e	110	0,36421	4	0,99
9	e	50	9,40513	4	0,05	12	e	110	5,32218	4	0,26
12	e	50	0,94268	4	0,92	36	e	110	1,17809	2	0,55
36	e	50	0,54979	2	0,76	50	e	110	7,13732	6	0,31
7	e	92	3,01609	2	0,22	92	e	110	3,21574	4	0,52
9	e	92	4,71142	4	0,32	99	e	110	1,00851	4	0,91
12	e	92	0,0444	4	1	106	e	110	5,27125	4	0,26
36	e	92	2,61359	2	0,27	7	e	119	2,95852	4	0,56
50	e	92	5,66172	4	0,23	9	e	119	3,82125	4	0,43
7	e	99	0,16705	4	1	12	e	119	5,57081	4	0,23
9	e	99	3,20761	4	0,52	36	e	119	0	2	1
12	e	99	1,63674	4	0,8	50	e	119	0,06138	4	1
36	e	99	0	2	1	92	e	119	0	4	1
50	e	99	1,20798	4	0,88	99	e	119	1,15381	4	0,89
92	e	99	0	2	1	106	e	119	9,68584	4	0,05
7	e	106	4,92429	4	0,3	110	e	119	2,45	4	0,65
9	e	106	1,33853	4	0,85						

APÊNDICE 6. Estimativa da Diversidade Gênica das análises dos microssatélites para diferentes *Loci* – expresso em número

Locus 7. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos										Total
	166	168	170	172	176	178	182	186	188	190	
1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
2	1	0	0	0	2	2	0	1	1	0	7
3	0	0	1	3	9	2	3	0	1	1	20
Total:	1	1	1	3	12	4	3	1	2	1	29

P-valor = 0.23337 S.E.* = 0.00520337 (64419 switches)

*SE: erro padrão

Locus 9. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos												Total	
	350	352	358	366	368	374	376	378	380	382	388	390		392
1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	1	1	1	3	0	0	0	1	0	7
3	2	1	2	3	3	3	2	2	2	1	1	0	1	23
Total:	2	1	2	3	7	4	3	5	2	1	1	1	1	33

P-valor = 0.484142 S.E. = 0.0061713 (70361 switches)

Locus 12. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos											Total	
	225	227	229	231	233	235	237	239	241	243	245		251
1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	3
2	0	0	1	0	3	0	0	1	1	1	0	0	7
3	1	1	0	1	1	3	6	6	0	1	2	1	23
Total:	1	1	1	2	4	4	6	7	2	2	2	1	33

P-valor = 0.04959 S.E. = 0.00249043 (74504 switches)

Continuação APÊNDICE 6. Estimativa da Diversidade Gênica das análises dos microssatélites para diferentes *Loci* – expresso em número

Locus 36. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos															Total
	400	408	410	420	421	423	427	430	432	439	441	443	447	454	457	
1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	3
2	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	4
3	1	0	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	1	4	1	20
Total:	1	1	2	1	2	1	1	2	3	1	1	4	1	5	1	27

P-valor = 0.95578 S.E. = 0.0022653 (49909 switches)

Locus 50. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos										Total
	509	511	513	515	517	519	521	523	525		
1	0	1	0	0	0	2	0	0	0	3	
2	0	0	1	0	4	1	0	1	0	7	
3	3	2	3	7	2	0	2	1	1	21	
Total:	3	3	4	7	6	3	2	2	1	31	

P-valor = 0.010344 S.E. = 0.000705683 (105621 switches)

Locus 92. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos															Total	
	415	417	421	423	427	493	497	501	503	505	509	511	513	515	517		519
1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3
2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	5
3	1	1	1	1	0	1	0	1	5	3	0	0	1	4	2	2	23
Total	1	2	6	3	2	2	1	4	2	2	31						

P-valor = 0.028702 S.E. = 0.00181172 (51878 switches)

Locus 99. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos							Total
	402	406	410	414	416	418	422	
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	2	1	2	0	0	5
3	3	4	3	1	0	2	1	14
Total:	3	4	5	2	2	2	1	19

P-valor = 0.1063 S.E. = 0.00169365 (165119 switches)

Continuação APÊNDICE 6. Estimativa da Diversidade Gênica das análises dos microssatélites para diferentes *Loci* – expresso em número

Locus 106. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos														Total
	511	515	519	521	523	527	529	531	535	541	545	549	553	557	
1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	3
2	0	3	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	7
3	1	2	2	1	3	1	0	0	2	2	2	3	1	1	21
Total:	1	6	3	1	3	1	1	1	3	3	2	4	1	1	31

P-valor = 0.747832 S.E. = 0.00485426 (67387 switches)

Locus 110. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos									Total
	238	246	250	254	258	262	266	278		
1	0	0	1	2	0	0	0	0	3	
2	2	0	3	1	0	1	0	0	7	
3	2	3	2	3	2	6	1	1	20	
Total:	4	3	6	6	2	7	1	1	30	

P-valor = 0.529274 S.E. = 0.0046829 (105935 switches)

Locus 119. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos										Total
	391	395	399	403	407	411	415	419	423	427	
1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	3
2	0	1	0	2	1	3	0	0	0	0	7
3	0	0	2	1	2	4	2	2	5	1	19
Total:	1	1	2	4	4	7	2	2	5	1	29

P-valor = 0.157972 S.E. = 0.00387084 (88079 switches)

APÊNDICE 7. Frequências alélicas para os Loci 7, 9, 12, 36, 50, 10 ,99, 106, 110 e 119.

Frequência alélica para o *Locus* 7. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos										Indivíduos	
	166	168	170	172	176	178	182	186	188	190		
1	0,000	0,500	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2
2	0,143	0,000	0,000	0,000	0,286	0,286	0,000	0,143	0,143	0,000	0,000	7
3	0,000	0,000	0,050	0,150	0,450	0,100	0,150	0,000	0,050	0,050	0,050	20

Frequência alélica para o *Locus* 9. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos												Indivíduos	
	350	352	358	366	368	374	376	378	380	382	388	390		392
1	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	3
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143	0,143	0,143	0,429	0,000	0,000	0,000	0,143	0,000	7
3	0,087	0,043	0,087	0,130	0,130	0,130	0,087	0,087	0,087	0,043	0,043	0,000	0,043	23

Frequência alélica para o *Locus* 12. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos												Indivíduos
	225	227	229	231	233	235	237	239	241	243	245	251	
1	0,000	0,000	0,000	0,333	0,000	0,333	0,000	0,000	0,333	0,000	0,000	0,000	3
2	0,000	0,000	0,143	0,000	0,429	0,000	0,000	0,143	0,143	0,143	0,000	0,000	7
3	0,043	0,043	0,000	0,043	0,043	0,130	0,261	0,261	0,000	0,043	0,087	0,043	23

Continuação APÊNDICE 7. Frequências alélicas para os Loci 7, 9, 12, 36, 50, 10, 99, 106, 110 e 119.

Frequência alélica para o *Locus* 36. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina

Pop	Alelos															Indivíduos
	400	408	410	420	421	423	427	430	432	439	441	443	447	454	457	
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,333	0,00	0,00	0,00	0,333	0,00	0,00	0,00	0,00	0,333	0,000	3
2	0,00	0,25	0,25	0,00	0,000	0,00	0,00	0,25	0,000	0,00	0,00	0,25	0,00	0,000	0,000	4
3	0,05	0,00	0,05	0,05	0,050	0,05	0,05	0,05	0,100	0,05	0,05	0,15	0,05	0,200	0,050	20

Frequência alélica para o *Locus* 50. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos										Indivíduos
	509	511	513	515	517	519	521	523	525		
1	0,000	0,333	0,000	0,000	0,000	0,667	0,000	0,000	0,000	0,000	3
2	0,000	0,000	0,143	0,000	0,571	0,143	0,000	0,143	0,000	0,000	7
3	0,143	0,095	0,143	0,333	0,095	0,000	0,095	0,048	0,048	0,048	21

Frequência alélica para o *Locus* 92. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos																Indivíduos
	415	417	421	423	427	493	497	501	503	505	509	511	513	515	517	519	
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,333	0,333	0,00	0,00	0,00	0,333	0,00	0,00	0,00	0,00	3
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,40	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	5
3	0,043	0,043	0,043	0,043	0,00	0,043	0,00	0,043	0,217	0,13	0,00	0,00	0,043	0,174	0,087	0,087	23

Frequência alélica para o *Locus* 99. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos							Indivíduos
	402	406	410	414	416	418	422	
1	-	-	-	-	-	-	-	0
2	0,000	0,000	0,400	0,200	0,400	0,000	0,000	5
3	0,214	0,286	0,214	0,071	0,000	0,143	0,071	14

Continuação APÊNDICE 7. Frequências alélicas para os Loci 7, 9, 12, 36, 50, 10, 99, 106, 110 e 119.

Frequência alélica para o *Locus* 106. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos														Indivíduos
	511	515	519	521	523	527	529	531	535	541	545	549	553	557	
1	0,00	0,333	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,333	0,333	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3
2	0,00	0,429	0,143	0,00	0,00	0,00	0,143	0,00	0,00	0,143	0,00	0,143	0,00	0,00	7
3	0,048	0,095	0,095	0,048	0,143	0,048	0,00	0,00	0,095	0,095	0,095	0,143	0,048	0,048	21

Frequência alélica para o *Locus* 110. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos								Indivíduos
	238	246	250	254	258	262	266	278	
1	0,000	0,000	0,333	0,667	0,000	0,000	0,000	0,000	3
2	0,286	0,000	0,429	0,143	0,000	0,143	0,000	0,000	7
3	0,100	0,150	0,100	0,150	0,100	0,300	0,050	0,050	20

Frequência alélica para o *Locus* 119. Populações (Pop): 1 PR- Paraná; 2 – RS – Rio Grande do Sul; 3 – SC – Santa Catarina.

Pop	Alelos										Indivíduos
	391	395	399	403	407	411	415	419	423	427	
1	0,333	0,000	0,000	0,333	0,333	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	3
2	0,000	0,143	0,000	0,286	0,143	0,429	0,000	0,000	0,000	0,000	7
3	0,000	0,000	0,105	0,053	0,105	0,211	0,105	0,105	0,263	0,053	19