



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DEPERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Mancha de stemphylium: Etiologia, gama de hospedeiras e
identificação de novas fontes de resistência em *Capsicum* e
tomateiro.**

Tiago Bezerra Torres

**Recife-PE
2023**

TIAGO BEZERRA TORRES

**MANCHA DE STEMPHYLIUM: ETIOLOGIA, GAMA DE
HOSPEDEIRAS E IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS FONTES DE
RESISTÊNCIA EM *CAPSICUM* E TOMATEIRO.**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Ailton Reis (UFRPE)

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux (UFRPE)

**Recife-PE
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- T693m Bezerra Torres, Tiago
Mancha de Stemphylium: Etiologia, gama de hospedeiras e identificação de novas fontes de resistência em Capsicum e tomateiro / Tiago Bezerra Torres. - 2023.
133 f.
- Orientador: Ailton Reis.
Coorientador: Leonardo Silva Boiteux.
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2023.
1. Stemphylium lycopersici. 2. S. solani. 3. imunidade, prevalência. 4. gene dominantes. I. Reis, Ailton, orient. II. Boiteux, Leonardo Silva, coorient. III. Título

Mancha de stemphylium: Etiologia, gama de hospedeiras e identificação de novas fontes de resistência em *Capsicum* e tomateiro.

TIAGO BEZERRA TORRES

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Ailton Reis (UFRPE/Embrapa)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios (UFRPE)

Prof. Dra. Kamila Câmara Correia (UFCA)

Prof. Dr. Maruzanete Pereira Melo (UFPI)

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

**Recife-PE
2023**

Aos meus pais, Salete Maria Bezerra Torres e Manoel Alves Torres. Aos meus irmãos José Rodolfo e Tiarla. A meus amigos e familiares.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar saúde e força para lutar e correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus pais, Salete e Manoel, e aos meus irmãos José Rodolfo e Tiarla, pelo incentivo e apoio até aqui.

A meu orientador, Prof. Dr. Ailton Reis, pela paciência, orientações e incentivo.

A meu coorientador, Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux, pelas colaborações durante o processo de orientação, na execução dos experimentos e na elaboração dos artigos.

A Embrapa Hortaliças, por todo o suporte necessário para execução da pesquisa até a conclusão do trabalho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças: Fabiana, Luana, Wagner, David, Ruthe, Isabela, Ellen, Cleberly, Tiago Silva, Atháise, Bruno, Brenndo, Roberta, Ruan, Breno e Wallington, pela ajuda na execução do experimento e os momentos divertidos e descontraídos.

Agradeço a Dra. Maria Esther Fonseca e ao Técnico Antonio Francisco Costa (Chico), do Laboratório de Melhoramento Genético da Embrapa Hortaliças, pelo auxílio nas análises moleculares. Agradeço também aos funcionários da Embrapa Hortaliças: Ronan, Maria e Claudemir pela disponibilidade e ajuda na condução dos trabalhos de cruzamentos e bioensaios.

A Dr.^a Josiene S. Veloso, por todo o suporte da análise filogenética.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	7
GENERAL ABSTRACT.....	8
CAPÍTULO I.....	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
Mancha de stemphylium: etiologia, gama de hospedeiras e identificação de novas fontes de resistência para pimenta e tomateiro.....	10
1. Família Solanaceae.....	10
2. Tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	10
3. Pimenta e pimentões (<i>Capsicum</i> spp.).....	12
4. Principais doenças do tomateiro e espécies de <i>Capsicum</i>	13
5. A mancha de stemphylium.....	14
5.1 A mancha de stemphylium em Tomateiro.....	14
5.2 Mancha de stemphylium em espécies de <i>Capsicum</i>	16
6. Classificação taxonômica dos agentes etiológicos da mancha de <i>Stemphylium</i>	17
7. Resistência genética à mancha de stemphylium.....	19
7.1 Fontes de resistência genética no tomateiro.....	19
7.2 Fontes de resistência em espécies de <i>Capsicum</i>	20
8. Novas potenciais fontes de resistência à mancha de stemphylium em germoplasma de <i>Solanum (Lycopersicon)</i>	20
9. REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO II.....	30
Mancha foliar de <i>Stemphylium</i> do tomateiro e outras Solanaceae no Brasil: Agentes causais, distribuição geográfica e potenciais hospedeiras	30
CAPÍTULO III.....	70

Prospecção assistida por marcadores moleculares de novas fontes de resistência ao <i>Stemphylium lycopersici</i> em acessos de <i>Solanum</i> (<i>Lycopersicon</i>).....	70
CAPÍTULO IV.....	96
An epistatic inheritance model for resistance to <i>Stemphylium lycopersici</i> in <i>Solanum habrochaites</i> ‘PI 127827’ involving two complementary dominant genes.....	96
CAPÍTULO V.....	114
Identificação de fontes de resistência do tipo imunidade para <i>Stemphylium lycopersici</i> em acessos de <i>Capsicum annuum</i> e <i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	114
CAPÍTULO VI.....	131
CONCLUSÕES GERAIS.....	131
Conclusões Gerais.....	135

RESUMO GERAL

As solanáceas incluem muitas espécies de importância agrícola tais como o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e as pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) que são amplamente utilizadas como hortaliças em todo o mundo. No entanto, essas plantas são afetadas por uma série de patógenos que provocam severas perdas diretas e indiretas. A mancha de stemphylium merece um destaque especial, principalmente na cultura do tomateiro, uma vez que a doença pode reduzir o rendimento e qualidade da cultura. Os sintomas ocorrem em ambas as faces da folha e consistem em pequenas manchas escuras, que aumentam e tornam-se marrom acinzentadas, comprometendo a superfície fotossintética. No tomateiro, a doença é causada por um complexo de pelo menos três espécies de *Stemphylium*: *S. solani* G.F. Weber, *S. lycopersici* (Enjoji) W. Yamam. (= *S. floridanum* Hannon & G. F. Weber) e *S. botryosum* Wallr. No gênero *Capsicum*, a doença é provocada por três espécies de *Stemphylium*: *S. solani*, *S. lycopersici* e *S. vesicarium*. Neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram: (1) gerar informações relacionadas a etiologia e o círculo de plantas hospedeiras do agente casual da mancha de stemphylium no Brasil; (2) Identificar novas fontes de resistências em germoplasma de *Solanum* (*Lycopersicon*) e em *Capsicum* e (3) conduzir um estudo de herança com uma nova fonte de resistência genética a *S. lycopersici* em um acesso da espécie silvestre *S. habrochaites*. Foram realizadas as análises filogenéticas das regiões genômicas ITS-5.8S rDNA e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*) de 89 isolados de *Stemphylium* spp. obtidos infectando espécies da família Solanaceae. Os isolados foram posicionados em dois grupos distintos com *S. lycopersici* ou *S. solani*. Os isolados de *S. lycopersici* (n=81) foram detectados no tomateiro, batata, berinjela, *S. paniculatum* e *Physalis angulata*. Os isolados de *S. solani* (n=8) foram detectados em *S. aethiopicum* var. *gilo* e tomateiro. A reação de acessos 18 espécies vegetais foi avaliada para dois isolados de *S. lycopersici*, sendo que 12 se mostraram suscetíveis. Em busca de fontes alternativas de resistência, 40 acessos de espécies silvestres de *Solanum* (*Lycopersicon*) foram inoculados com um isolado de *S. lycopersici*. Vinte e sete acessos foram detectados com níveis elevados de resistência nas espécies *S. habrochaites* (13), *S. peruvianum* (13) e *S. pimpinellifolium* (1). *Solanum habrochaites* ‘PI-127827’ foi detectado como uma nova fonte de resistência a *S. lycopersici*. Um subgrupo de acessos resistentes apresentou marcadores moleculares distintos do locus *Sm*, indicando potenciais novos genes/alelos de resistência. A cultivar suscetível ‘Ponderosa’ foi utilizada como genitor feminino em cruzamentos interespecíficos com ‘PI-127827’. O teste qui-quadrado na geração F₂ apresentou um bom ajuste com um padrão de segregação 9 (resistentes): 7 (suscetíveis), indicando um modelo genético da resistência sob controle de dois genes dominantes, independentes e complementares. As reações dos 37 acessos de *Capsicum* foram caracterizadas com base em parâmetros epidemiológicos. Os acessos *C. annuum* ‘Jalapeño TS’ e *C. annuum* var. *glabriusculum* ‘CNPH-3839’ apresentaram uma reação do tipo imunidade contra dois isolados de *S. lycopersici*. Em conclusão, novas e relevantes informações foram geradas que poderão contribuir para o manejo cultural e genético da mancha de stemphylium em solanáceas no Brasil.

Palavras-chaves: *Stemphylium lycopersici*; *S. solani*; imunidade, prevalência; genes dominantes.

GENERAL ABSTRACT

The family Solanaceae includes many species of agricultural importance such as tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and peppers and sweet peppers (*Capsicum* spp.), which are widely used as vegetables around the world. However, these plants might be affected by a series of pathogens inducing severe direct and indirect losses. Stemphylium leaf spot deserves special attention, especially in tomatoes, since the disease can reduce crop yield and quality. Symptoms occur on both leaf sides and consist of small dark spots, which enlarge and become grayish brown, compromising the photosynthetic surface. In tomato, the disease is caused by a complex of at least three species of *Stemphylium*: *S. solani*, *S. lycopersici* (= *S. floridanum*) and *S. botryosum*. In the genus *Capsicum*, the disease is caused by three *Stemphylium* species: *S. solani*, *S. lycopersici*, and *S. vesicarium*. In this context, the objectives of the present work were: **(1)** To generate information related to the etiology and the host range of the causal agent of Stemphylium leaf spot in Brazil; **(2)** To identify new sources of resistance in *Solanum* (*Lycopersicon*) and *Capsicum* germplasm and **(3)** to carry out an inheritance study with a new source of genetic resistance to *S. lycopersici* in an accession of the wild species *S. habrochaites*. Phylogenetic analyzes of the ITS-5.8S rDNA and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) genomic regions of 89 *Stemphylium* isolates obtained in species of the Solanaceae family. The isolates were placed in two distinct groups with either *S. lycopersici* or *S. solani*. Isolates of *S. lycopersici* ($n=81$) were detected in tomato, potato, eggplant, *S. paniculatum*, and *Physalis angulata*. Isolates of *S. solani* ($n=8$) were detected in *S. aethiopicum* var. *gilo* and tomato. The reaction of accessions from 18 plant species was evaluated for two *S. lycopersici* isolates with 12 of them displaying a susceptible reaction. In search of alternative sources of resistance, 40 accessions of *Solanum* (*Lycopersicon*) were inoculated with one *S. lycopersici* isolate. Twenty-seven accessions were detected with high levels of resistance in the species *S. habrochaites* (13), *S. peruvianum* (13) and *S. pimpinellifolium* (1). *Solanum habrochaites* ‘PI-127827’ was detected as a new source of resistance to *S. lycopersici*. A subgroup of resistant accessions showed molecular markers distinct from the *Sm* locus, indicating potential new resistance genes/alleles. The susceptible cultivar *S. lycopersicum* ‘Ponderosa’ was used as a female parent in interspecific crosses with ‘PI-127827’. The chi-square test in the F₂ generation showed a good fit with a segregation pattern 9 (resistant): 7 (susceptible), indicating a genetic model of resistance under the control of two dominant, independent, and complementary genes. The reactions of the 37 *Capsicum* accessions were characterized based on epidemiological parameters. The accessions *C. annuum* ‘Jalapeño TS’ and *C. annuum* var. *glabriusculum* ‘CNPH-3839’ showed an immunity-like reaction against two *S. lycopersici* isolates. In conclusion, new and relevant information was generated that could contribute to the cultural and genetic management of Stemphylium spot in Brazil.

Key words: *Stemphylium lycopersici*; *S. solani*; immunity, prevalence; dominant genes.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Mancha de stemphylium: Etiologia, gama de hospedeiras e identificação de novas fontes de resistência em *Capsicum* e tomateiro.

1. Família Solanaceae

A família Solanaceae abriga aproximadamente 90 gêneros e 3.000-4.000 espécies (KNAPP et al., 2004). As solanáceas incluem muitas espécies de importância agrícola tais como o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), a batata (*Solanum tuberosum* L.), o pimentão (*Capsicum annuum* L.), as pimentas (*Capsicum chinense* Jacq e *Capsicum frutescens* L.), a berinjela (*Solanum melongena* L.) e o jiló (*Solanum aethiopicum* var. *gilo* L.). Além das espécies de importância alimentar, há algumas espécies ornamentais como a petúnia (*Petunia* spp.) e a datura (*Datura stramonium* L.) e de importância industrial como o fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (GEBHARDT, 2016). Muitas espécies da família Solanaceae são amplamente exploradas como hortaliças, com maior destaque para o tomate, a batata, a berinjela, o jiló, as pimentas e os pimentões, sendo o tomate a segunda mais cultivada no mundo depois da batata (PADMANABHAN; CHEEMA; PALIYATH, 2016). As pimentas e pimentões, assim como o tomate estão entre as hortaliças mais consumidas no Brasil e no mundo (MENDONÇA et al., 2019; RÊGO; FINGER; RÊGO, 2012). A produção dessas culturas é bem diversificada e pode ser explorada no cultivo protegido ou em campo aberto (HALFELD-VIEIRA et al., 2005; KENWAR, 2011).

2. Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

O tomateiro cultivado foi originado de ancestrais silvestres encontrados na região localizada ao oeste da América do Sul ao longo da cordilheira dos Andes, englobando desde o sul do Equador (incluindo as Ilhas Galápagos), Colômbia, Peru, Bolívia até regiões desérticas no norte do Chile (BERGOUGNOUX, 2014). O centro de domesticação e diversificação do tomateiro é o México, considerado como sendo o centro de origem secundário. Os tomates foram posteriormente introduzidos na Europa no século XVI pelos espanhóis. O tomateiro foi cultivado pela primeira vez para alimentação durante os séculos XVII e XVIII no sul da Europa, especialmente na Itália na preparação de molhos. Os italianos logo chamaram os primeiros frutos de *pomo d'oro* (maçã de ouro), uma vez que as primeiras cultivares introduzidas no país apresentavam coloração amarela (ALVARENGA, 2004; DENHAM, 2014).

O tomate se disseminou a partir da Espanha e da Itália para outros países do Mediterrâneo e, mais tarde, para o norte da Europa. O cultivo do tomateiro retornou à América no século XIX, sendo introduzido no norte do continente pelos colonos que foram povoar os Estados Unidos (BRANDÃO FILHO et al., 2018). Durante o século XX, o aumento do seu cultivo foi tão expressivo que os Estados Unidos se converteram no segundo maior produtor mundial, superado apenas pela China (HOENIG, 2014). Apesar de ser originário de regiões vizinhas, o tomate no Brasil foi introduzido apenas posteriormente pelos colonizadores portugueses. No entanto, após a chegada dos imigrantes, principalmente italianos e alemães, o tomate teve sua produção ampliada e valorizada (BRANDÃO FILHO et al., 2018).

A China é o maior produtor mundial, com uma área cultivada de mais de um milhão de hectares (1.140.716,00 ha) e uma produção anual de 67.538.339,77 de toneladas, chegando a uma produtividade média de 59,20 t/ha (FAOSTAT, 2021). O Brasil encontra-se entre os principais produtores de tomate no mundo, responsável por uma produção de 3.679.160,00 de toneladas cultivadas em uma área de 54.537 ha, correspondendo a uma produtividade média de 70,88 t/ha (FAOSTAT, 2021). Grande parte da produção se concentra nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Santa Catarina que respondem por mais de 75% da produção nacional (CONAB, 2019).

O tomateiro é uma planta herbácea, de porte arbustivo, semiperene, mas que é cultivada como planta anual. A atual nomenclatura botânica da espécie é *S. lycopersicum* L. (= *Lycopersicum esculentum* Miller). É uma espécie dicotiledônia, diploide ($2n = 2x = 24$) e tipicamente autógama (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2005). A seção *Lycopersicon* do gênero *Solanum* inclui o tomateiro cultivado (*S. lycopersicum*) e mais 12 parentes selvagens ou semidomesticados. *Solanum lycopersicum* é a única espécie domesticada (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2006). Pode se desenvolver de forma rasteira, semi-ereta ou ereta (ALVARENGA, 2004).

Os frutos do tomateiro e seus derivados são ricas fontes de ácido fólico, vitamina C e potássio. Em relação aos fitonutrientes, os mais abundantes no tomate são os carotenoides (BEECHER, 1998; SHI; MAGUER, 2000). O licopeno (pigmento de coloração vermelha) é o carotenoide mais proeminente, seguido pelo beta-caroteno, gama-caroteno e fitoeno, bem como vários carotenoides em menores concentrações. A atividade antioxidante do licopeno, bem como de vários outros carotenoides e sua abundância no tomate, torna esse alimento muito atrativo como complemento nutracêuticos na dieta humana. Os tomates também contêm várias outras substâncias que são benéficas à saúde, incluindo vitamina E,

oligoelementos, flavonoides, fitoesteróis e várias vitaminas solúveis em água (PADMANABHAN; CHEEMA; PALIYATH, 2016).

3. Pimenta e pimentões (*Capsicum* spp.)

A pimenta e o pimentão do gênero *Capsicum* estão entre as hortaliças, condimentos e especiarias mais antigas e populares do mundo. Acredita-se que seja a primeira cultura de especiarias domesticada e cultivada há cerca de 6.000 anos atrás na América Central e do Sul (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2020; PERRY et al., 2007; TRIPODI; KUMAR, 2019). Existem cerca de 38 espécies, das quais seis são cultivadas: *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum baccatum* L. e *Capsicum assamicum* Purkayastha & Singh. O centro de origem e domesticação englobam principalmente a América Central e do Sul, e o México. No entanto, Naga chilli (*Capsicum assamicum* Purkayastha & L. Singh) foi identificado como uma nova espécie domesticada na região nordeste da Índia. Está intimamente relacionada com *C. frutescens* e *C. chinense*, mas pode ser diferenciada devido às suas características morfológicas, filogenia molecular da região do espaçador transcrito interno (ITS) e análise proteômica diferencial (PURKAYASTHA et al., 2012).

As espécies de *Capsicum* se destacam pela grande variabilidade no formato dos frutos, na pungência e na coloração que vai de amarelo a vermelho, com diversas intensidades, podendo apresentar frutos pretos (RUFINO; PENTEADO, 2006; MOREIRA et al., 2006). No mundo, pelo menos seis espécies de pimentas são cultivadas e exploradas economicamente. A espécie *C. annuum* é uma das mais amplamente cultivadas, incluindo os tipos de pimentão, pimenta poblano e jalapeño. A espécie *C. baccatum* (representada pelo grupo varietal “aji amarillo”) é uma pimenta que faz parte da culinária peruana. *Capsicum chinense* inclui as variedades de pimentas habañero e pimenta vermelha caribenha (‘Scotch Bonnet’), ambas conhecidas por seu intenso sabor picante. *C. frutescens* é considerada por alguns autores como uma espécie selvagem e não domesticada, incluindo a famosa pimenta ‘Tabasco’ e o grupo varietal das “malaguetas”. *C. pubescens* compreende as variedades de pimentas como o rocoto e manzano, adaptadas para cultivo em altitudes mais elevadas (PERRY, 2014). Por fim, a espécie *C. assamicum* Purkayastha & L. Singh (identificada mais recentemente) tem sido reconhecida como sendo a pimenta mais pungente (picante) do mundo (Guinness Book of World Records, 2006), e está representada pela pimenta ‘Naga’ ou ‘Bhut Jolokia’ (PURKAYASTHA et al., 2012).

No Brasil, a produção de espécies de *Capsicum* é diversificada, apresentando um mercado segmentado englobando variados usos e formas de consumo. Essa diversidade demanda diferentes genótipos adaptados a cada região brasileira e adequados para sua finalidade culinária ou de processamento (FERRAZ et al., 2016). *Capsicum chinense*, *C. baccatum* e *C. frutescens* são as espécies de pimentas mais comuns cultivadas no Brasil (RÊGO; FINGER; RÊGO, 2012). As pimentas de cheiro (*C. chinense*) são consideradas as mais brasileiras e seu consumo e cultivo predominam na região Norte.

4. Principais doenças do tomateiro e de espécies de *Capsicum*.

A produtividade das hortaliças solanáceas é afetada negativamente por diversos fatores, um deles são as doenças de plantas que ocupam um lugar de destaque. As doenças e seus agentes causais merecem uma atenção especial, uma vez que podem levar a perdas elevadas ou até mesmo totais das culturas, caso as medidas de controle não forem implementadas corretamente (LOPES; ÁVILA, 2005; PANNO et al., 2021). Atualmente, mais de 200 pragas e doenças foram identificadas, causando perdas diretas e indiretas na produção de tomate (BLANCARD, 2012; NOWICKI; KOZIK; FOOLAD, 2013). As doenças do tomateiro podem ser causadas por fungos, oomicetos, bactérias, vírus e nematoides. Os fungos e os oomicetos são os microrganismos mais importantes devido ao número elevado de patógenos causando doenças em todos os estágios de desenvolvimento da planta (LOPES, 2021). As doenças fúngicas mais relatadas são o tombamento de mudas (*Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn e *Phytophthora* spp.), pinta-preta (*Alternaria linariae* (Neerg.) E.G. Simmons), requeima (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary), septoriose (*Septoria lycopersici* Speg.), mancha de Cladosporium (*Fulvia fulva* (Cooke) Cif.), oídio (*Erysiphe neolycopersici* (L. Kiss) L. Kiss e *Oidiopsis haplophylli* (Magnus) Rulamort), mancha-alvo (*Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei), murcha de Sclerotium (*Sclerotium rolfsii* Sacc.), podridão de Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), rizoctoniose (*R. solani* J.G. Kühn), podridão olho de veado (*Phytophthora* spp.), murcha de Fusarium (causada por três raças de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* W.C. Snyder & H.N. Hansen), murcha de Verticillium (*Verticillium dahliae* Kleb 1913 e *V. albo-atrum* Reinke & Berthold) e mancha de stemphylium (*Stemphylium solani* G.F. Weber, *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) W. Yamam., *Stemphylium botryosum* Wallr. e *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons) (REIS; LOURENÇO JR.; LOPES, 2021).

Assim como na cultura do tomateiro, as doenças fúngicas são bastante importantes e podem causar sérios prejuízos econômicos nas diferentes espécies de *Capsicum*. Dentre as

doenças mais relatadas o tombamento das mudas (*R. solani* ou *Pythium* spp.), oídio abaxial (*Oidiopsis taurica* (Lev.) Salmon), murcha ou canela-preta de *Phytophthora* (*Phytophthora capsici* Leonian), antracnose, murcha de *Fusarium* (*Fusarium* spp.), murcha de *Sclerotium*, murcha de *Verticillium* (*Verticillium dahliae*) e mancha de *stemphylium* (*Stemphylium solani* G.F. Weber, *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) W. Yamam. e *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons) (CHO; KIM; HWANG, 2001; HUANG; VALLAD, 2012; PARISI; ALIOTO; TRIPODI, 2020).

5. A mancha de stemphylium

5.1 A mancha de stemphylium do tomateiro

A mancha de *stemphylium* do tomateiro, conhecida por muitos autores como mancha-de-estenfilio ou mancha cinzenta do tomateiro (em inglês: *gray leaf spot*), é uma doença que ocorre em condições quentes e úmidas. A mancha de *stemphylium* foi relatada primeiramente nos Estados Unidos em 1924, na cultura do algodoeiro, e em seguida no tomateiro (WEBER, 1930), sendo considerada uma das mais destrutivas doenças do tomateiro no Brasil e no mundo (JONES et al., 2016; LOPES; ÁVILA, 2005; REIS; LOURENÇO JR.; LOPES, 2021). No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu no estado do Rio de Janeiro, em 1945, apresentando em baixa frequência e em áreas de cultivos isoladas. A doença ganhou maior importância em 1967, com a ampla utilização da variedade suscetível ‘Santa Cruz’ no Estado de São Paulo (NAMEKATA; TOKESHI, 1967).

A mancha de *stemphylium* do tomateiro é favorecida por altas temperaturas do ar e alta umidade (KIM et al., 2004). Em condições favoráveis, os conídios do fungo, na superfície da folha, desenvolvem um tubo de germinação que penetra o tecido foliar. A penetração ocorre, principalmente, através dos estômatos, mas também através das paredes celulares periclinais da epiderme. Em seguida, uma vesícula se desenvolve dentro da cavidade subestomática, de onde as hifas secundárias aparecem e colonizam todo o mesofilo. As primeiras lesões macroscópicas podem ser vistas após 36 horas após a infecção (BENTES; MATSUOKA, 2005). O fungo sobrevive de um ciclo de cultivo para outro em restos culturais ou infectando hospedeiras alternativas do grupo das solanáceas, incluindo algumas plantas daninhas (REIS; BOITEUX, 2006a). Não existem relatos confirmando a transmissão destes patógenos via sementes (REIS; BOITEUX, 2006a).

No campo, os sintomas se intensificam no início da colheita. A doença afeta principalmente as folhas mais novas. Os sintomas ocorrem em ambas as faces da folha e

consistem em pequenas manchas escuras, que aumentam e tornam-se marrom acinzentadas (**Figura 1**). Os centros das lesões mais velhas, racham e se tornam quebradiços. Em cultivares suscetíveis, muitas manchas são produzidas e tendem a coalescerem. Essa situação resulta em um progressivo amarelecimento e seca com eventual queda prematura das folhas. A doença não afeta diretamente os frutos, mas os danos à área foliar reduzem a sua qualidade e rendimento (BLANCARD, 2012; JONES et al., 2016).

Apesar de ser uma doença altamente destrutiva nas condições brasileiras, a mancha de stemphylium em tomateiro teve sua importância diminuída por um tempo, devida ao uso de variedades resistentes e aplicações periódicas de fungicidas no controle do complexo de doenças foliares em sistemas convencionais (DEVI et al., 2021; LOPES; ÁVILA, 2005; REIS; LOURENÇO JR.; LOPES, 2021). Atualmente, tem-se observado a ocorrência de epidemias severas dessa doença em lavoura comerciais nas principais regiões produtoras de tomate de mesa do Brasil. Isso se deve principalmente à diminuição da oferta de cultivares resistentes no mercado brasileiro, uma vez que a maioria das cultivares plantadas são importadas de países onde a doença não ocorre ou é pouco importante (REIS; BOITEUX, 2006b, 2006c).

A doença pode ser controlada via pulverização de fungicidas. Sob condição de casa de vegetação, três pulverizações de tebuconazol 0,5 mL/L e propiconazol 1mL/L em um intervalo de 10 dias se mostram suficientes para reduzir a doença e aumentar em mais de 200 % o rendimento do tomateiro (DEVI et al., 2021). No entanto, produtos fitossanitários e os princípios ativos recomendados para esse patossistema são limitados no Brasil (AGROFIT, 2023). Além disso, o uso indiscriminado de uma única molécula poderá selecionar variantes do patógeno resistentes, como também poderá causar sérios problemas aos seres humanos e ao meio ambiente (BI et al., 2022; RIOS; DEBONA, 2018). Neste caso, a alternativa mais ecológica e economicamente viável a ser adotada é a utilização de variedades comerciais resistentes. As variedades resistentes disponíveis no mercado apresentam em seu genoma o gene *Sm* que confere resistência de amplo espectro às diferentes espécies de *Stemphylium* (AL-RUFAYE et al., 2022; ANDRUS; REYNARD; WADE, 1942; PARK et al., 2020)

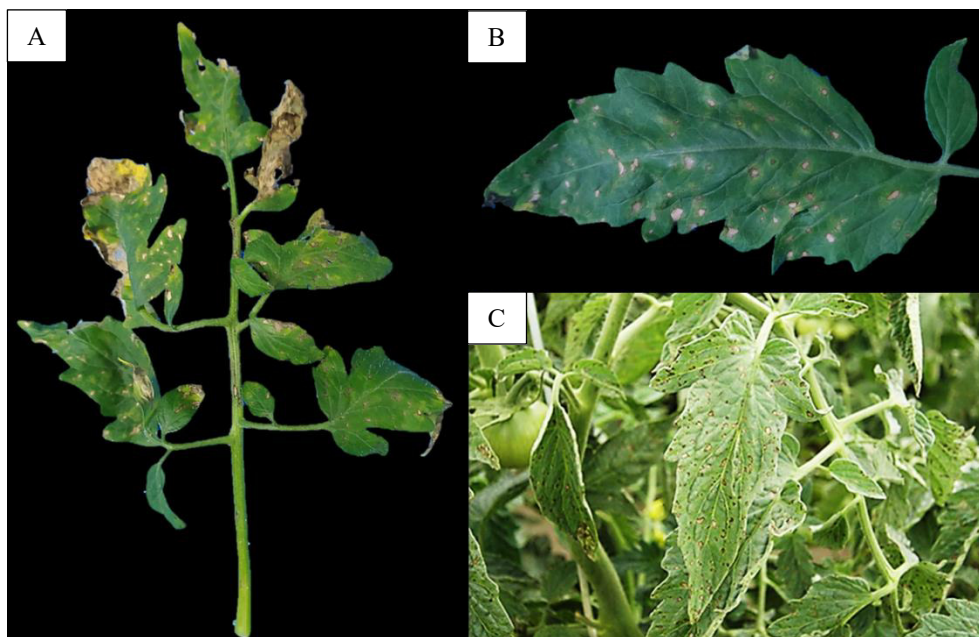


Figura 1 – Sintomas da mancha de stemphylium em tomateiro: **(A)** folha e ramos apresentando manchas (Fonte: Tiago Bezerra Torres); **(B)** Manchas foliares irregulares com o centro acinzentado (Fonte: Tiago Bezerra Torres); **(C)** folhas de plantas (conduzidas em condições de campo) apresentando manchas com halos amarronzados e o centro acinzentado (Fonte: Ailton Reis).

5.2 Mancha de stemphylium em espécies de *Capsicum*

A mancha de stemphylium em espécies de *Capsicum* foi inicialmente relatada em cultivares de *C. annuum* em um campo comercial no estado de Louisiana, Estados Unidos (SINCLAIR et al., 1958). O agente causal da doença foi identificado, morfológicamente, como *Stemphylium solani*. Atualmente, registros indicam que a doença é provocada por três espécies de *Stemphylium*: *S. solani*, *S. lycopersici* e *S. vesicarium* (KIM et al., 2004; VITALE et al., 2017).

Os sintomas em *Capsicum* são semelhantes aos que ocorrem em tomateiro. A doença é mais severa em plantas mais jovens, e ocorre geralmente em folhas mais novas da planta. A infecção é limitada principalmente às folhas, mas o fungo pode infectar o caule e o pecíolo em condições ambientais favoráveis, ocorrendo desfolha severa na planta. Os sintomas (**Figura 2**) começam a aparecer como pequenas manchas de 1 a 2 mm de diâmetro, com centro afundado branco a cinza e bordas marrons espalhadas aleatoriamente pelas folhas. À medida que a mancha progride, esta alcança de 3 a 6 mm de diâmetro com centros afundados de cinza a branco cercados por margens marrons escuras (KIM et al., 2004; SUN; HUANG, 2022). Um isolado de *Stemphylium lycopersici* foi relatado causando podridão em frutos de pimentão (*C. annuum*) no Japão (TOMIOKA; SATO, 2011).

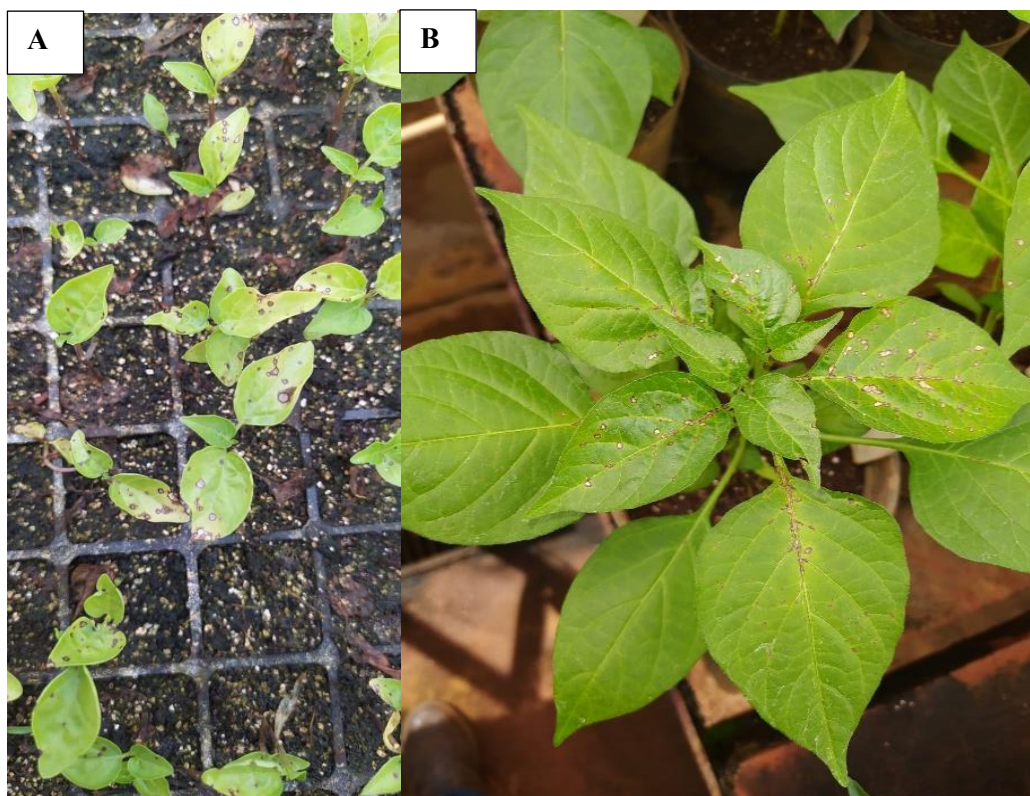


Figura 2 – Mancha de stemphylium em plantas de *Capsicum*: (A) mudas de pimenta apresentando manchas em folhas com formato inicialmente circular e posteriormente irregular com bordas amarronzadas e centros acinzentados (B) planta adulta apresentando manchas em folhas jovens (Fonte: Tiago Bezerra Torres).

6. Classificação taxonômica dos agentes etiológicos da macha de Stemphylium

O gênero *Stemphylium* compreende um grupo de 150 espécies, algumas patogênicas em mais de 43 espécies de plantas (DAS et al., 2019). Registros de diferentes partes do mundo indicam que mancha de stemphylium no tomateiro é causada por um complexo de pelo menos quatro espécies de *Stemphylium*: *S. solani* G.F. Weber, *S. lycopersici* (Enjoji) W. Yamam. (= *S. floridanum* Hannon & G. F. Weber), *S. botryosum* Wallr. e *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons (BLANCARD et al., 1986; MIRANDA; BOITEUX; REIS, 2010; REIS; LOURENÇO JR.; LOPES, 2021). No entanto, as espécies de *S. solani* e *S. lycopersici* são as predominantes no Brasil e no mundo.

O gênero *Stemphylium* pertence à família *Pleosporaceae*, ordem *Pleosporales* (*Dothideomycetes*), o qual pertencem fungos “hifomicetos dematiáceos” (com estruturas de reprodução melanizadas), que pode ser distinguido de outros *Hyphomycetes* pela formação percorrente de conídios do tipo dictiósporos (com septos longitudinais e transversais) em seus conidióforos e células conidiogênicas dilatadas apicalmente (WOUDENBERG et al., 2017).

Stemphylium lycopersici possui conidióforos solitários, retos ou ligeiramente curvos, lisos, marrom claro, com uma célula apical nitidamente inchada. Os conídios solitários,

oblongos, arredondados ou às vezes pontiagudos no ápice, arredondados na base e contraídos no septo transversal principal (XIE et al., 2018). Em *S. solani*, os conidióforos são sub-hialinos a fulvo claro, aglomerados únicos ou diversos, com uma célula apical ligeiramente a distintamente inchada, com um único esporo no ápice. Os conídios são muriformes, principalmente ovóides, sub-hialinos a castanhos, principalmente contraídos no septo mediano (XIE et al., 2016).

As espécies do gênero *Stemphylium* são morfologicamente distinguidas de outros gêneros relacionados como *alternaria*, por apresentar proliferação de conidióforos e células conidiógenas dilatadas apicalmente (CÂMARA; O'NEILL; VAN BERKUM, 2002). As características de forma e o tamanho dos conídios, conidióforos e ascósporos são úteis para a identificação das espécies (WANG et al., 2010). No entanto, os caracteres morfológicos podem se sobrepor dificultando a identificação e descrição das espécies (NASEHI et al., 2019). Para resolver esse problema, as sequências do espaçador interno transcrito (ITS) rDNA 5.8S e os genes codificadores de proteínas calmodulina (CAL) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) têm sido utilizados em análises filogenéticas multigênicas de isolados da espécie *Stemphylium* (CÂMARA; O'NEILL; VAN BERKUM, 2002; WOUTENBERG et al., 2017). De fato, análises morfológicas e filogenéticas do ITS e GAPDH têm sido rotineiramente utilizadas na identificação de espécies de *Stemphylium* (NASEHI et al., 2019; SHARIFI; SHEYKHI; MAGAMI, 2021; SPADONI; IPPOLITO; SANZANI, 2020).

As espécies *S. lycopersici* e *S. solani* foram relatadas em todo o mundo em diferentes hortaliças, como tomateiro, pimenta, berinjela, pimentão, batata, aspargo, alface e melancia (BEN et al., 2021; KIM et al., 2004; LIU et al., 2019; NASEHI et al., 2014; REIS; BOITEUX, 2006a; TOMIOKA et al., 2021; YANG et al., 2017b). No Brasil, outras solanáceas foram relatadas como hospedeiras de *S. solani*, incluindo: *C. chinense* 'Biquinho', *Nicandra physalodes*, *S. betacea* (= *Cyphomandra betacea*) e um acesso de *S. paniculatum*. A fruta-do-lobo ou lobeira (*S. lycocarpum*), uma espécie de Solanaceae nativa do bioma Cerrado, também foi identificada como hospedeira alternativa natural de *S. solani* (BOITEUX et al., 1993). O manjerição (*Ocimum basilicum*: Lamiaceae) foi identificada como uma nova hospedeira fora da família Solanaceae, se mostrando altamente suscetível (REIS; BOITEUX, 2006a).

7. Resistência genética à mancha de stemphylium

7.1 Fontes de resistência genética no tomateiro

A resistência à mancha de stemphylium foi primeiramente identificada no acesso ‘PI 79532’ da espécie silvestre *S. pimpinellifolium* (ANDRUS; REYNARD; WADE, 1942), sendo conferida por um único gene incompletamente dominante, denominado como *Sm* (HENDRIX; FRAZIER, 1949). O gene de resistência (*R*), *Sm*, é até hoje o único que confere resistência contra as diversas espécies de *Stemphylium* (AL-RUFAYE et al., 2022; ANDRUS; REYNARD; WADE, 1942; PARK et al., 2020). O mais notável é que o gene *Sm* confere, aparentemente, resistência a todas as espécies de *Stemphylium*, não havendo relatos de novas raças virulentas superando essa resistência (BEHARE et al., 1991; BLANCARD, 2012; MIRANDA et al., 2010; REIS; BOITEUX, 2006c; ROTEM; BASHI, 1977). No entanto, o número de variedades comerciais que apresentam esse gene de resistência ainda é extremamente reduzido, especialmente para o mercado de mesa (REIS; BOITEUX, 2006c). O uso frequente dessas variedades com resistência vertical pode selecionar variantes patogênicas virulentas que conseguem suplantar o gene de resistência. Isso pode ser um problema eminente, uma vez que já foi observado a existência de variabilidade intraespecífica em isolados de *S. lycopersici* de diferentes hospedeiras, variando na virulência e agressividade (RIOS; DEBONA, 2018).

O gene *Sm* se localiza no cromossomo 11 em ligação com os genes *I* e *I-2* (que conferem resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raças 1 e 2, respectivamente). A taxa de recombinação com o gene *I* é de aproximadamente 36%. Estudos iniciais de mapeamento detectaram um intervalo de uma região genômica contendo um gene candidato (SU et al., 2019). Recentemente, o gene *Sm* foi finamente mapeado, clonado e caracterizado como sendo um típico membro da família NBS-LRR (*nucleotide-binding site-leucine-rich repeat*) (YANG et al., 2022).

A interação entre *S. lycopersici* e tomates que apresentam o gene *Sm* foi elucidada via análises microscópicas e de RNA-seq. Quatro dias após a inoculação são observados sintomas de hipersensibilidade (HR) no local da interação. As hifas de *S. lycopersici* invadem os estômatos e as células do mesofilo, algumas proteínas efetoras secretadas pelo patógeno são rapidamente reconhecidas pelo produto do *Sm* (YANG et al., 2017a). A partir desse reconhecimento do patógeno, tem início uma subsequente cascata de sinalização de defesa a jusante associada aos canais de Ca^{2+} e várias outras vias metabólicas, incluindo as que envolvem ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno (ERF1). Posteriormente, são acionados

fatores de transcrição específicos relacionados à defesa, como as proteínas WRKY, que ativam os genes R e regulam uma série de vias de resistência a jusante (MONTEIRO et al., 2018; MOORE; LOAKE; SPOEL, 2011). Por fim, a HR é induzida, causando a morte das células ao redor dos locais de infecção e limitando o crescimento do patógeno (BALINT; KURTI, 2019).

7.2 Fontes de resistência em espécies de *Capsicum*

Ao longo dos anos, pesquisas foram realizadas na busca de acessos de espécies de *Capsicum* como fontes de resistência à mancha de stemphylium. Muitos desses relatos se baseiam apenas na identificação e caracterização fenotípica da resistência (KIM et al. 2006). No entanto, informações referentes à compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares associados a essas respostas de resistência são ainda escassos.

Sete acessos de *C. annuum* (KC321, KC220, KC208, PI 244670, PI 244670, KC380 e KC319) foram identificados sendo altamente resistentes a *S. solani* e *S. lycopersici* em uma coleção de germoplasma composto por 463 acessos mundiais de diferentes espécies de *Capsicum*, incluindo 93 Linhagens de Introgressão dos EUA e 107 cultivares coreanas (CHO et al., 2001). Um banco de germoplasma com diferentes espécies de *Capsicum* foi avaliado para a reação contra duas espécies de *Stemphylium* (KIM et al., 2006). Os acessos KC1247, KC1248, KC1250, KC1251 e KC1258 mostraram o mesmo nível de resistência que fontes previamente identificadas, tais como KC43, KC47, KC220, KC319, KC320 e KC380 (KIM et al., 2006).

8. Novas potenciais fontes de resistência à mancha de stemphylium em germoplasma de *Solanum* (*Lycopersicon*).

A diversidade fenotípica é evidente em tomates cultivados, particularmente para características hortícolas, mas a diversidade genética é bastante estreita. Os principais genes de resistência a doenças para diferentes patógenos, como vírus, fungos, bactérias e nematoides, são derivados principalmente de espécies selvagens de tomate e introgridos em tomates cultivados (KHAZAEI; MADDURI, 2022). O gene de resistência *Sm*, conferindo resistência a várias espécies de *Stemphylium*, foi introgridido em tomateiros cultivados a partir da espécie semi-domesticada *S. pimpinellifolium* e é até hoje a principal ferramenta no manejo deste patógeno (ANDRUS; REYNARD; WADE, 1942; LATERROT; BLANCARD, 1983; PARK et al., 2020).

Alguns acessos de espécies selvagens foram identificados apresentando resistência à mancha de stemphylium. Acessos dentro das espécies *S. habrochaites*, *S. chilense*, *S. pimpinellifolium* e *S. peruvianum* de tomate selvagem que foram identificadas como resistentes a *S. solani* e *S. lycopersici*, possivelmente possuem o gene de resistência *Sm* (LATERROT; BLANCARD, 1983; BEHARE et al., 1991). No Brasil, foram identificadas fontes de resistência às duas espécies de *Stemphylium* em acessos cultivados (todos devido a presença do gene *Sm*) e selvagens das espécies *S. habrochaites*, *S. peruvianum* e *S. pimpinellifolium* (que é espécie onde o gene *Sm* foi introgridido). Desta forma, os acessos de *S. peruvianum* e *S. habrochaites* podem representar novas fontes de genes/alelos que conferem resistência às duas espécies fúngicas (MIRANDA; BOITEUX; REIS, 2010).

A espécie *Solanum habrochaites* S. Knapp e D.M. Spooner (anteriormente, *Lycopersicum hirsutum* Dunal) é uma fonte importante de alelos para o melhoramento do tomate visando principalmente às características de qualidade, tolerância a condições adversas do clima, resistência a doenças e insetos-praga, graças à presença de tricomas e de metabólitos secundários produzidos por suas glândulas (GONZÁLEZ-ARCOS et al., 2018; NUEZ; DÍEZ, 2013; SINGH; SHIKHA; SHAHI, 2021; WALGENBACH, 2018). De fato, *S. habrochaites* representa uma importante fonte de genes de resistência contra múltiplas doenças que afetam a cultura do tomateiro. Há relatos de resistência à requeima causada por *Phytophthora infestans*, à podridão da coroa e da raiz por *Phytophthora capsici*, ao oídio por *Oidium neolyopersici*, ao bolor-cinza induzido por *Botrytis*, o mosaico induzido por *Tomato yellow leaf curl virus* (begomovirus monopartido), pinta bacteriana por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* raça 1 e mancha de stemphylium causada por *S. lycopersici* e *S. solani* (FINKERS et al., 2007; LI et al., 2011; LIAN et al., 2022; MIRANDA; BOITEUX; REIS, 2010; QUESADA-OCAMPO et al., 2016; THAPA et al., 2015; TOMÁS et al., 2011).

A resistência genética, e uma alternativa que reduz ou dispensa a aplicação de produtos químicos isso representa baixo impacto aos recursos naturais, bem como sua eficiência para controle dos fungos fitopatogênicos, através de diversos mecanismos moleculares e estruturais (DONG; RONALD, 2019). Nesse contexto, a avaliação variedades de espécies de plantas em testes de resistência a doenças são realizados até hoje como uma prática rotineira na identificação de promissores e potencialmente fontes de resistência a diversos patógenos. Essas fontes poderão introgrididas por meio de um melhoramento convencional ou por engenharia genética. O melhoramento convencional desempenha um papel essencial no melhoramento das culturas, mas geralmente envolve o cultivo e o exame de grandes populações de culturas ao longo de várias gerações, um processo demorado e

trabalhoso. A engenharia genética, que se refere à alteração direta do material genético de um organismo por meio da biotecnologia, que permite a introdução, remoção, modificação ou ajuste fino de genes específicos de interesse com alterações indesejadas mínimas no restante do genoma da cultura. (CHRISTOU, 2013; DONG; RONALD, 2019; LORENCE; VERPOORTE, 2004)

A presente tese, trata de uma perspectiva investigativa de aspectos etiológicos, epidemiológicos da reação da mancha de stemphylium a diferentes espécies e acessos de *Solanum* e *Capsicum*, na identificação de potenciais fontes de resistência a essa doença. Os resultados adquiridos mostram uma grande importância no manejo genético dessa doença. A longo prazo, as fontes de resistência identificadas serão mapeadas e introduzidas a diversas variedades de pimenteira e tomateiro, conseqüentemente grandes repercussões socioeconômicas e ambientais bem como os benefícios aos produtores e à economia regional, promovendo incremento na produção e na produtividade dessas culturas agrícolas no Brasil.

9. REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em:

<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 24 abril. 2022.

ALRUFAYE, Z. T. A., GHALEB, I. K., ABIDUKADHIM, A. R.; SAFAA, Z. Detection of resistance gene to gray leaf spot caused by *Stemphylium* spp. in tomato cultivars of Iraq. **Iranian Journal of Ichthyology**, v. 9, n. 0, p. 54–56, 2022.

ALVARENGA, M. A. A. R. **Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. 1. ed. Lavras, MG: UFLA, 2004. 400 p.

ANDRUS, C. F.; REYNARD, G. B.; WADE, B. L. Relative resistance of tomato varieties, selections, and crosses to defoliation by *Alternaria* and *Stemphylium*. **U.S. Dept. of Agriculture, Circ 652**, 1942, 23p.

BALINT-KURTI, P. The plant hypersensitive response: Concepts, control and consequences. **Molecular Plant Pathology**, p. mpp.12821, 2019.

BEECHER, G. R. Nutrient content of tomatoes and tomato products. **Experimental Biology and Medicine**, v. 218, n. 2, p. 98–100, 1998.

BEHARE, J.; LATERROT, H.; SARFATTI, M.; ZAMIR, D. Restriction fragment length polymorphism mapping of the *Stemphylium* resistance gene in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, n. 5, p. 489, 1991.

BEN, H.; HUO, J.; YAO, Y.; GAO, W.; WANG, W.; HAO, Y.; ZHANG, X. *Stemphylium lycopersici* causing leaf spot of watermelon (*Citrullus lanatus*) in China. **Plant Disease**, v. 105, n. 12, p. 4157, 2021.

BENTES, J. L. S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 224–231, 2005.

BERGOUGNOUX, V. The history of tomato: From domestication to biopharming. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 170–189, 2014.

BLANCARD, D. **Tomato Diseases: Identification, Biology and Control: A Colour Handbook**, Second Edition (2nd ed.). CRC Press, 2012, 688p.

BLANCARD, D., LATERROT, H., MORETTI, A., PICHOT, M. J. Les *Stemphylium* rencontrés sur tomate. **Phytopathologia Mediterranea**, 140-144, 1986.

BOITEUX, L. S., HENZ, G. P., GIORDANO, L. B. *Solanum lycocarpum*: A natural host of *Stemphylium solani*. **Plant Disease**, 77, 846, 1993.

BRANDÃO FILHO, J.U.T., GOTO, R., BRAGA, R.S., and HACHMANN, T.L. Solanáceas. In: BRANDÃO FILHO, J.U.T., FREITAS, P.S.L., BERIAN, L.O.S., and GOTO, R., comps. **Hortaliças-fruto** [on-line]. Maringá: EDUEM, 2018, pp. 37-70.

CÂMARA, M. P. S.; O'NEILL, N. R.; VAN BERKUM, P. Phylogeny of *Stemphylium* spp. based on ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, v. 94, n. 4, p. 660–672, 31 jul. 2002.

CHO, H. J.; KIM, B. S.; HWANG, H. S. Resistance to gray leaf spot in *Capsicum* peppers. **Hortscience**, v. 36, n. 4, p. 752–754, 2001.

CHRISTOU, P. Plant genetic engineering and agricultural biotechnology 1983–2013. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 125–127, 2013.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Tomate: Análise dos Indicadores da Produção e Comercialização no Mercado Mundial, Brasileiro e Catarinense. Brasília, DF: Conab, 2019. 22 p. (**Compêndio de Estudos Conab**, v. 21).

DAS, A.; DUTTA, S.; JASH, S.; BARMAN, A. R.; DAS, R.; KUMAR, S.; GUPTA, S. Current Knowledge on Pathogenicity and Management of *Stemphylium botryosum* in Lentils (*Lens culinaris* ssp. *culinaris* Medik). **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 225, 2019.

DENHAM, T. Tomatoes: Origins and development. **Encyclopedia of Global Archaeology**, p. 7316–7319, 2014.

DEVI, M.; BANYAL, D.K.; ANUDEEP, B. M.; SINHA, D. Management of gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium lycopersici* under protected cultivation. **Plant Disease Research**, v. 36, n. 2, p. 154–160, 2021.

DONG, O. X.; RONALD, P. C. Genetic engineering for disease resistance in plants: Recent progress and future perspectives. **Plant Physiology**, v. 180, n. 1, p. 26–38, 2019.

FERRAZ, R.M.; RAGASSI, C.F.; HEINRICH, A.G.; LIMA, M.F.; PEIXOTO, J.R.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Caracterização morfoagronômica preliminar de acessos de pimentas cumari. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 498–506, 2016.

FINKERS, R.; VAN HEUSDEN, A. W.; MEIJER-DEKENS, F.; VAN KAN, J. A.; MARIS, P.; LINDHOUT, P. The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to Botrytis cinerea. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, n. 6, p. 1071–1080, 2007.

GEBHARDT, C. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 12, p. 2281–2294, 2016.

GONZÁLEZ-ARCOS, M.; FONSECA, M. E.; ARRUABARRENA, A.; LIMA, M.; MICHEREFF-FILHO, M.; MORIONES, E.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; BOITEUX, L. Identification of genetic sources with attenuated Tomato chlorosis virus-induced symptoms in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm. **Euphytica**, v. 214, n. 10, p. 178, 2018.

HENDRIX, J. W.; FRAZIER, W. A. Studies on the inheritance of *Stemphylium* resistance in tomatoes. Honolulu (HI): **Hawaii Agricultural Experiment Station, University of Hawaii**, 1949, 24 p. (Technical Bulletin; 8)

HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; GÓMEZ-GARCÍA, M. R.; VALVERDE, M.E.; PAREDES-LÓPEZ, O. *Capsicum annuum* (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 2972–2993, 2020.

HOENIG, J. A tomato for all seasons: Innovation in American agricultural production, 1900–1945. **Business History Review**, v. 88, n. 3, p. 523–544, 2014.

HUANG, C.-H.; VALLAD, G. E. Crown and Root Diseases of Pepper. In: RUSSO, V. M. (Ed.). **Peppers: Botany, Production and Uses**. Botany, Production and Uses Series. Cambridge, MA: CABI, 2012. p. 203–215.

JONES J.B.; ZITTER T.A.; MOMOL T.M.; MILLER S.A. **Compendium of Tomato Diseases and Pests, Second Edition**. 2nd ed. The American Phytopathological Society; Saint Paul, 2016. 168p.

KHAZAEI, H.; MADDURI, A. The role of tomato wild relatives in breeding disease-free varieties. **Genetic Resources**, v. 3, n. 6, p. 64–73, 2022.

KIM, B. S.; KWON, T. R.; LEE, M. J.; CHO, E. H.; SHIN, K. S.; KIM, J. H.; JUNG, S. A. New sources of resistance to gray leaf spot (*Stemphylium* spp.) in *Capsicum* peppers. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 47, n. 4, p. 174–177, 2006.

Kim, B.-S.; Yu, S.-H.; Cho, H.-J.; Hwang, H.-S. Gray leaf spot in peppers caused by *Stemphylium solani* and *S. lycopersici*. **The Plant Pathology Journal**, v. 20, 2004.

KNAPP, S.; BOHS, L.; NEE, M.; SPOONER, D. Solanaceae—A Model for Linking Genomics with Biodiversity. **Comparative and Functional Genomics**, v. 5, n. 3, p. 285–291, 2004.

LATERROT, H.; BLANCARD, D. Criblage d'une série de lignées et d'hybrides F1 de tomate pour la résistance à la stemphyliose. **Phytopathologia Mediterranea**, 22 (3): p. 188–193, 1983.

LI, J.; LIU, L.; BAI, Y.; FINKERS, R.; WANG, F.; DU, Y.; YANG, Y.; XIE, B.; VISSER, R. G. F.; VAN HEUSDEN, A. W. Identification and mapping of quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in *Solanum habrochaites* LA1777. **Euphytica**, v. 179, n. 3, p. 427–438, 2011.

LIAN, Q.; HE, X.; ZHANG, B.; WANG, Y.; MA, Q. Identification and characterization of WRKY41, a gene conferring resistance to powdery mildew in wild tomato (*Solanum habrochaites*) LA1777. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1267, 2022.

LIU, H.; WANG, H.; ZHONG, J.; LU, X.; PAN, X. T.; ZHU, H. J.; ZHOU, Q. First Report of *Stemphylium lycopersici* and *Stemphylium vesicarium* causing Leaf Spot on Lettuce (*Lactuca sativa*) in China. **Plant Disease**, v. 103, n. 11, p. 2957, 2019.

LOPES, C. A. **Doenças do Tomateiro**. 3ª edição ed. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças, 2021. v. 3ª edição

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do Tomateiro**. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças, 2005. v. 2ª Edição

LORENCE, A.; VERPOORTE, R. Gene transfer and expression in plants. **Recombinant Gene Expression**, v. 267, p. 329–350, 2004.

MIRANDA, B. E. C. DE; BOITEUX, L. S.; REIS, A. Identificação de genótipos do gênero *Solanum* (seção *Lycopersicon*) com resistência a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 178–184, 2010.

MONTEIRO, A. L.; DANELLI, A.; PEREIRA, A.; CASTRO, C.; DEBONA, D.; DIANESE, É.; RODRIGUES, F.; FERRAZ, H.; FILHO, J.; MACIEL, J.; RIOS, J.; BADEL, J. L.; THUROW, L. B.; GUIMARÃES, L. M.; EIRAS, M.; CERESINI, P. C.; MÖLLER, P.; CARVALHO, R. C. P. **Resistência Genética de Plantas a Patógenos**. Pelotas, RS: UFPel, 2018.

MOORE, J. W.; LOAKE, G. J.; SPOEL, S. H. Transcription Dynamics in Plant Immunity. **The Plant Cell**, v. 23, n. 8, p. 2809–2820, 2011.

MOREIRA, G.R.; CALIMAN, F.R.B.; SILVA, D.J.H.; RIBEIRO, C.S.C. Espécies e variedades de pimenta. **Informe Agropecuário**, v.27, n.235, p.16-29, 2006.

NAMEKATA, T.; TOKESHI, H. Variabilidade de *Stemphylium solani*, Weber, agente causal de mancha foliar do tomateiro, no estado de São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 24, p. 273–288, 1967.

NASEHI, A. et al. Cultural and physiological characteristics of *Stemphylium lycopersici* causing leaf blight disease on vegetable crops. **Archives of Phytopathology And Plant Protection**, v. 47, n. 14, p. 1658–1665, 2014.

NASEHI, A.; AL-SADI, A.; NASR ESFAHANI, M.; OSTOVAR, T.; REZAIE, M.; ATGHIA, O.; ALSULTAN, W.; JAVAN-NIKKHAH, M. Molecular re-identification of *Stemphylium lycopersici* and *Stemphylium solani* isolates deposited in NCBI GenBank and morphological characteristics of Malaysian isolates. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, n. 3, p. 965–974, 2019.

NOWICKI, M.; KOZIK, E. U.; FOOLAD, M. R. Late Blight of Tomato. Em: **Translational Genomics for Crop Breeding**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2013. p. 241–265.

NUEZ, F.; DÍEZ, M. J. *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* (Tomato). In: MALOY, S.; HUGHES, K. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. Academic Press, 2013. p. 476–480.

PADMANABHAN, P.; CHEEMA, A.; PALIYATH, G. Solanaceous Fruits Including Tomato, Eggplant, and Peppers. In: **Encyclopedia of Food and Health**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 24–32.

PANNO, S.; DAVINO, S.; CARUSO, A.G.; BERTACCA, S.; CRNOGORAC, A.; MANDIĆ, A.; NORIS, E.; MATIĆ, S. Review of the Most Common and Economically Important Diseases That Undermine the Cultivation of Tomato Crop in the Mediterranean Basin. **Agronomy**, v. 11, n. 11, p. 2188, 2021.

PARISI, M.; ALIOTO, D.; TRIPODI, P. Overview of Biotic Stresses in Pepper (*Capsicum* spp.): Sources of Genetic Resistance, Molecular Breeding and Genomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2587, 2020.

Park, J; Kwon, S.; Girim, P.; Lee, S.; Je, B.; Park, Y. Host reaction of tomato varieties and applicability of Sm-linked DNA markers to *Stemphylium lycopersici*. **Molecular Breeding**, v. 40, n. 12, p. 106, 2020.

PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. New species of wild tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**, v. 30, n. 2, p. 424–434, 2005.

- PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, v. 56, p.6-12, 2006.
- PERRY, L. Capsicums/Chiles: Origins and Development. Em: **Encyclopedia of Global Archaeology**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 1150–1152.
- PERRY, L.; DICKAU, R.; ZARRILLO, S.; HOLST, I.; PEARSALL, D. M.; PIPERNO, D. R.; BERMAN, M. J.; COOKE, R. G.; RADEMAKER, K.; RANERE, A. J.; RAYMOND, J. S.; SANDWEISS, D. H.; SCARAMELLI, F.; TARBLE, K.; ZEIDLER, J. A. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. **Science**, v. 315, n. 5814, p. 986–988, 2007.
- PURKAYASTHA, J.; ALAM, S. I.; GOGOI, H.; SINGH, L. *Capsicum assamicum* sp. nov. (*Solanaceae*), from Assam, northeastern India. **Ozean J. Appl. Sci.**, v. 5, p. 55–66, 2012.
- QUESADA-OCAMPO, L. M.; VARGAS, A. M.; NAEGELE, R. P.; FRANCIS, D. M.; HAUSBECK, M. K. Resistance to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici* in a tomato advanced backcross of *Solanum habrochaites* and *Solanum lycopersicum*. **Plant Disease**, v. 100, n. 4, p. 829–835, 2016.
- RÊGO, E.; FINGER, F.; RÊGO, M. Consumption of pepper in Brazil and its implications on nutrition and health of humans and animals. In: **Peppers: Nutrition, Consumption and Health**. New York: Science Publishers, 2012. p. 159–170.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S. Círculo de hospedeiras de isolados de *Stemphylium solani*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 18, 2006a.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S. Mancha-de-estenfilio: Ressurgimento de um antigo problema do tomateiro. **Embrapa Hortaliças. Circular Técnica**, 41, p. 1–8, 2006c.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S. Resistência de acessos de *Lycopersicon* a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 22, **Embrapa Hortaliças**, 2006b.
- REIS, A.; LOURENÇO JR., V.; LOPES, C. A. Doenças causadas por fungos e oomicetos. Em: **Doenças do tomateiro**. 3ª edição ed. Brasília, DF: Embrapa, 2021., p. 23–69.
- RIOS, J. A.; DEBONA, D. Efeito Epidemiológico da Resistência de Hospedeiro. Em: MONTEIRO, A. L. et al. (Eds.). **Resistência Genética de Plantas a Patógenos**. Pelotas, RS: UFPel, 2018. p. 126–145.
- ROTEM, J.; BASHI, E. A review of the present status of the *Stemphylium* complex in tomato foliage. **Phytoparasitica**, v. 5, n. 1, p. 45–58, 1977.
- RUFINO, J.L.S.; PENTEADO, D.C.S. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe Agropecuário**, v.27, n.235, p.7–15, 2006.
- SHARIFI, K.; SHEYKHI, S.; MAGAMI, E. First report of garlic leaf blight caused by *Stemphylium vesicarium* in Iran. **Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 3, p. 1007, 2021.
- SHI, J.; MAGUER, M. LE. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 1–42, 2000.

- SINGH, A. K.; SHIKHA, K.; SHAHI, J. P. Hybrids and abiotic stress tolerance in horticultural crops. *In: Stress Tolerance in Horticultural Crops*. Elsevier, 2021. p. 33–50.
- SPADONI, A.; IPPOLITO, A.; SANZANI, S. M. First report of *Stemphylium eturmiunum* causing postharvest rot of sweet cherry in Italy. **Crop Protection**, v. 132, p. 105112, 2020.
- SU, X.; ZHU, G.; HUANG, Z.; WANG, X.; GUO, Y.; LI, B.; DU, Y.; YANG, W.; GAO, J. Fine mapping and molecular marker development of the *Sm* gene conferring resistance to gray leaf spot (*Stemphylium* spp.) in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, n. 4, p. 871–882, 2019.
- SUN, Y.-C.; HUANG, C.-J. First report of *Stemphylium lycopersici* causing gray leaf spot of pepper in Taiwan. **Journal of Plant Pathology**, v. 104, n. 3, p. 1169, 2022.
- THAPA, S. P.; MIYAO, E. M.; MICHAEL DAVIS, R.; COAKER, G. Identification of QTLs controlling resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato race 1 strains from the wild tomato, *Solanum habrochaites* LA1777. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 4, p. 681–692, 2015.
- TOMÁS, D. M.; CAÑIZARES, M. C.; ABAD, J.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; MORIONES, E. Resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* accumulation in the tomato wild relative *Solanum habrochaites* associated with the C4 viral protein. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 24, n. 7, p. 849–861, 2011.
- TOMIOKA, K.; ABE, D.; KAWAGUCHI, A.; KAWAKAMI, A.; MASUNAKA, A.; MORI, S.; NOMIYAMA, K.; SEKIGUCHI, H. Stemphylium leaf spot of asparagus caused by *Stemphylium lycopersici*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 87, n. 1, p. 51–54, 2021.
- TOMIOKA, K.; SATO, T. Fruit rot of sweet pepper caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 77, n. 6, p. 342–344, 2011.
- TRIPODI, P., KUMAR, S. (2019). The *Capsicum* Crop: An Introduction. *In: RAMCHIARY, N., KOLE, C. (eds) The Capsicum Genome*. Compendium of Plant Genomes. Springer, Cham, 2019, 1-8p.
- VITALE, S.; LUONGO, L.; GALLI, M.; BELISARIO, A. First report of *Stemphylium vesicarium* on chilli pepper in Italy. **New Disease Reports**, v. 35, n. 1, p. 36–36, 2017.
- WALGENBACH, J. F. Integrated Pest Management Strategies for Field-Grown Tomatoes. *In: Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato*. Elsevier, 2018. p. 323–339.
- WANG, Y.; GENG, Y.; PEI, Y. F.; ZHANG, X. G. Molecular and morphological description of two new species of *Stemphylium* from China and France. **Mycologia**, v. 102, n. 3, p. 708–717, 2010.
- WEBER, G. F. Gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani*, sp. nov. **Phytopathology**, v. 20, p. 513–518, 1930.
- WOUDENBERG, J.H.C.; HANSE, B.; VAN LEEUWEN, G.C.M.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Stemphylium* revisited. **Studies in Mycology**, v. 87, p. 77–103, 2017.

WU, D. X.; ZHANG, R.S.; HAN, X.; WANG, J. X.; ZHOU, M.; CHEN, C. Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Stemphylium solani* to fluxapyroxad. **Crop Protection**, v. 156, p. 105944, 2022.

XIE, X. W.; JUN WU, Y. C.; JIANJUN SHI, X. Z.; YANXIA SHI, A. L. CHAI; BAOJU LI. First report of *Stemphylium lycopersici* causing leaf spot on hot pepper in China. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.41, p. 124–128, 2019.

XIE, X.W.; ZHANG, Z. X.; WANG, Y. Y.; SHI, Y. X.; CHAI, A. L.; DU, G. F.; LI, B. J. First report of *Stemphylium solani* causing leaf spot on wild eggplant in China. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 38, n. 4, p. 517–521, 2016.

YANG, H. H.; XU, X. Y.; ZHAO, T. T.; JIANG, J. B.; LIU, G.; LI, J. F. First report of *Stemphylium lycopersici* causing gray leaf spot on eggplant in China. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 834, 2017b.

YANG, H.; WANG, H.; JIANG, J.; LIU, M.; LIU, Z.; TAN, Y.; ZHAO, T.; ZHANG, H.; CHEN, X.; LI, J.; WANG, A.; DU, M.; XU, X. The *Sm* gene conferring resistance to gray leaf spot disease encodes an NBS-LRR (nucleotide-binding site-leucine-rich repeat) plant resistance protein in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v.135, n. 5, p.1467–1476, 2022.

YANG, H.; ZHAO, T.; JIANG, J.; CHEN, X.; ZHANG, H.; LIU, G.; ZHANG, D.; DU, C.; WANG, S.; XU, X.; LI, J. Transcriptome analysis of the *Sm*-mediated hypersensitive response to *Stemphylium lycopersici* in tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 19 2017a.

CAPÍTULO II

**Mancha foliar de *Stemphylium* do tomateiro e outras Solanáceas no Brasil:
Agentes causais, distribuição geográfica e potencias hospedeiras.**



Mancha foliar de *Stemphylium* do tomateiro e outras Solanáceas no Brasil: Agentes causais, distribuição geográfica e potenciais hospedeiras.

Tiago Bezerra Torres¹; David Nataren Perdomo¹; Josiene Silva Veloso¹; Maria Esther de Noronha Fonseca³; Leonardo Silva Boiteux^{1,3}; Mariana Rodrigues Fontenelle²; Ailton Reis^{1,2}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife–PE, Brazil.

²Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Departamento de Fitopatologia, 70910-900, Brasília–DF, Brazil;

³National Center for Vegetable Crops Research (CNPH), Embrapa Vegetable Crops (Embrapa Hortaliças), 70275-970, Brasília–DF, Brazil.

Correspondence: leonardo.boiteux@embrapa.br.

ORCID: 0000-0002-5791-8002

Resumo

A mancha de *stemphylium* é uma das doenças foliares mais importantes do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e de outras solanáceas em regiões tropicais quentes e úmidas. A nível mundial, essa doença tem sido atribuída a três espécies do gênero *Stemphylium*: *S. solani*, *S. lycopersici* e *S. botryosum*. Apesar da importância da doença, levantamentos nacionais elucidando os agentes causais predominantes no tomateiro e em outras espécies de Solanaceae bem como a distribuição geográfica da doença, potenciais hospedeiras reportadas dos patógenos ainda não estão disponíveis nas condições brasileiras. No presente trabalho, 89 isolados de *Stemphylium* foram obtidos infectando naturalmente o tomateiro bem como *Physalis angulata*, *Capsicum* spp., *S. paniculatum*, *S. tuberosum*, *S. melongena* e *S. aethiopicum* var. *gilo*. Análises filogenéticas das regiões genômicas ITS-5.8S rDNA e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*) posicionaram os isolados em dois agrupamentos distintos com *S. lycopersici* ou *S. solani*. Os isolados de *S. lycopersici* ($n=81$) foram detectados no tomateiro, batata, berinjela, *S. paniculatum* e *P. angulata*. Os isolados de *S. solani* ($n=8$) foram detectados em *S. aethiopicum* var. *gilo* e tomateiro. A reação de acessos 18 espécies vegetais foi avaliada para dois isolados de *S. lycopersici*, sendo que 12 se mostraram suscetíveis. Desta forma, *S. lycopersici* é o agente causal prevalente da doença, sendo detectado em todas as macrorregiões do Brasil. Isolados de *S. lycopersici* apresentaram um amplo círculo de plantas hospedeiras, infectando diversas espécies de Solanaceae. *Stemphylium lycopersici* deve ser, portanto, o foco dos programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes.

Palavra-chave: *Solanum*, *Capsicum*, ecologia, epidemiologia, *Stemphylium lycopersici*, *Stemphylium solani*

Abstract

Stemphylium leaf spot is one of the most important foliar diseases of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and other solanaceous plants in warm, humid tropical regions. Worldwide, this disease has been attributed to three species of the genus *Stemphylium*: *S. solani*, *S. lycopersici* and *S. botryosum*. Despite the enormous importance of the disease, nationwide surveys elucidating the predominant causal agents in tomato and other Solanaceae species, as well as the geographical distribution of the disease, natural and experimental hosts of the pathogens, are not yet available in Brazilian conditions. Herein, 89 *Stemphylium* isolates were obtained naturally infecting tomato as well as *Physalis angulata*, *Capsicum* spp., *S. paniculatum*, *S. tuberosum*, *S. melongena*, and *S. aethiopicum* var. *gilo*. Phylogenetic analyzes of the ITS-5.8S rDNA and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) genomic regions placed the isolates in two distinct groupings with either *S. lycopersici* or *S. solani*. Isolates of *S. lycopersici* ($n=81$) were detected in tomato, potato, eggplant, *S. paniculatum*, and *P. angulata*. Isolates of *S. solani* ($n=8$) were detected in *S. aethiopicum* var. *gilo* and tomato. The reaction of accessions of 18 plant species was evaluated for two isolates of *S. lycopersici*, of which 12 were susceptible. Hence, *S. lycopersici* is the prevalent causal agent of the disease, being detected in all macro-regions of Brazil. Isolates of *S. lycopersici* showed a wide host range, infecting several Solanaceae species. *Stemphylium lycopersici* should therefore be the focus of breeding programs aimed at developing resistant cultivars.

Keywords: *Solanum*, *Capsicum*, ecology, epidemiology, *Stemphylium lycopersici* *Stemphylium solani*

Introdução

Atualmente, o Brasil ocupa 10^a posição no *ranking* mundial de produção de tomate com cerca de 3,75 milhões de toneladas por ano e produtividade de 72,2 toneladas por hectare (Boteon et al., 2020; FAOSTAT, 2020). A adoção de novas técnicas de manejo cultural e a disponibilidade de cultivares melhoradas têm permitido o incremento de produção e vêm garantindo a sustentabilidade do cultivo tanto para consumo *in natura* quanto para processamento industrial no Brasil (Clemente & Boiteux, 2012; Boiteux et al., 2016).

No entanto, a produção do tomateiro ainda pode ser negativamente afetada pela incidência de muitas doenças fúngicas, especialmente nos períodos e/ou regiões com clima quente e úmido (Boiteux & Fonseca, 2023). A mancha de stemphylium do tomateiro é uma das doenças com intensidade em regiões tropicais e subtropicais (Lopes, 2021; Reis et al., 2021). Os sintomas ocorrem em ambas as lâminas foliares e consistem em pequenas manchas escuras, que se expandem e se tornam marrom acinzentadas. Os centros das lesões mais velhas racham e os tecidos afetados se tornam quebradiços. As manchas podem coalescer induzindo uma destruição completa da lâmina foliar, levando a queda prematura das folhas afetadas. Esse grupo de patógenos não afeta diretamente os frutos, mas os danos à área foliar reduzem a qualidade e o rendimento (Blancard, 2012; Jones et al., 2016). O vento e respingos de chuva são os principais agentes de dispersão dos conídios dentro da lavoura e entre lavouras (Reis & Boiteux, 2006a; Reis et al., 2021).

Os primeiros relatos da mancha de Stemphylium no tomateiro foram feitos inicialmente nos Estados Unidos durante a década de 1920 (Weber, 1930). No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu no estado do Rio de Janeiro, em 1945, em cultivos isolados. A doença ganhou maior importância no Estado de São Paulo a partir da década de 1960 devido a ampla utilização da variedade suscetível ‘Santa Cruz’ (Namekata & Tokeshi, 1967). Nas condições brasileiras, a doença é comum em cultivos de tomate para consumo *in natura* e mais rara em

cultivos de tomate para processamento industrial, provavelmente devido ao mais amplo uso de fatores de resistência (Reis et al., 2021).

A espécie *S. solani* foi o primeiro agente causal a ser relatado induzindo a mancha de stemphylium em tomateiro (Weber, 1930). Na ocasião, a espécie foi identificada com base nas características dos conídios e morfologia de conidióforos (Weber, 1930). No entanto, o gênero *Stemphylium* apresenta um número elevado de espécies, sendo que um subgrupo delas apresenta sobreposição de características morfológicas. Neste contexto, a utilização de informações derivadas de análises filogenéticas, tem permitido a identificação mais precisa, através da amplificação e comparação de sequências de regiões genômicas conservadas e não conservadas. Atualmente, a região ITS-5.8S rDNA e a sequência do gene *gapdh* (codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) representam o banco de dados mais robustos sendo, portanto, as mais utilizadas para identificação das espécies (Al-Amri et al., 2016; Câmara et al., 2002; Graf et al., 2016; Huang & Tsai, 2016).

A nível mundial, a mancha de stemphylium do tomateiro tem sido atribuída a três espécies do gênero *Stemphylium* (Weber, 1930; Blancard, 2012; Jones et al., 2016): *S. solani* G.F. Weber, *S. lycopersici* (Enjoji) W. Yamam. (= *S. floridanum* Hannon & G.F. Weber) e *S. botryosum* Wallr. As espécies de *Stemphylium* sobrevivem em restos de cultura no solo, em plantas voluntárias, em mudas velhas abandonadas em viveiros e em hospedeiras alternativas. De fato, *S. lycopersici* e *S. solani* apresentam uma ampla gama de hospedeiras dentro da família Solanaceae incluindo, além de espécies cultivadas e silvestres de tomateiro do gênero *Solanum* (*Lycopersicon*), *S. melongena*, batata e espécies de *Capsicum*, (Ben et al., 2021; Kim et al., 2004; Liu et al., 2019; Miranda et al., 2010; Nasehi et al., 2014; Reis & Boiteux, 2006c; Tomioka et al., 2021; Yang et al., 2017; Yang et al., 2020). Além disso, diversas espécies cultivadas, invasoras e silvestres do gênero *Solanum* têm sido identificadas como hospedeiras alternativas destes fungos, podendo servir como fontes perenes e semiperenes de inóculo para

o tomateiro (Boiteux et al., 1993; Reis & Boiteux, 2006a).

No Brasil, diferentes solanáceas foram relatadas como novas hospedeiras da espécie *S. solani*, incluindo: *Nicandra physalodes*, *S. palinacanthum*, *S. lycocarpum* (lobeira), *Cyphomandra betacea* (= *S. betacea*) e *S. paniculatum* (Boiteux et al., 1993; Reis & Boiteux, 2006a). Espécies hospedeiras de outras famílias botânicas também têm sido detectadas, incluindo o aspargo (*Asparagus officinalis*), alface (*Lactuca sativa*) e melancia (*Citrullus lanatus*) (Ben et al., 2021; Kim et al., 2004; Liu et al., 2019; Nasehi et al., 2014; Tomioka et al., 2021; Yang et al., 2017; Yang et al., 2020). No Brasil, o manjeriço (*Ocimum basilicum*: Lamiaceae) foi identificado como uma nova hospedeira de *S. solani* fora da família Solanaceae, se mostrando extremamente suscetível (Reis & Boiteux, 2006a).

A mancha de stemphylium é considerada uma das mais destrutivas doenças do tomateiro no Brasil e no mundo (Reis et al., 2021). Além disso, essa doença vem crescendo em importância no tomateiro e em outras solanáceas em diferentes regiões geográficas do Brasil devido ausência de cultivares resistentes (Reis & Boiteux, 2006b). Apesar da grande importância da mancha de stemphylium, levantamentos nacionais extensos para elucidar a distribuição geográfica, as hospedeiras naturais/experimentais bem como os agentes causais predominantes dessa doença no tomateiro e em outras espécies de Solanaceae ainda não estão disponíveis nas condições brasileiras. Diante disso, o presente trabalho objetivou caracterizar uma ampla coleção de isolados de *Stemphylium* obtidos de tomateiro e outras solanáceas em diferentes regiões brasileiras e avaliar a patogenicidade desses isolados em diferentes espécies de plantas. 99

Material e Métodos

Obtenção e preservação de isolados de *Stemphylium*

Os isolados de *Stemphylium* foram recuperados da coleção de culturas fúngicas do Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPV) da Empresa de Brasileira de Pesquisa

Agropecuária (Embrapa). Esses foram obtidos de plantas hospedeiras solanáceas, que apresentavam sintomas similar a mancha de stemphylium, em diferentes regiões brasileiras. Após recuperados, os isolados foram preservados em água destilada esterilizada (Castellani, 1963) e mantidos em câmara de refrigeração.

Extração de DNA, amplificação por PCR e Sequenciamento

O DNA genômico de todos os 89 isolados foi extraído pelo método CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio), empregando solventes orgânicos (clorofórmio e álcool isoamílico) (Boiteux et al., 1999). Os isolados foram cultivados em placas de Petri, contendo o meio BDA, por sete dias. O micélio de cada isolado foi raspado do meio e transferido para tubos de microcentrifuga de 2 mL, contendo seis esferas de aço inoxidável e acrescidos com 750 µL da solução de CTAB. O micélio foi macerado em dois ciclos de 30 segundos a 2000 rpm em homogeneizador rotativo (Precellys®, Bertin Technologies, França). O processo foi repetido até a maceração completa do micélio. Os tubos foram incubados em banho-maria a temperatura de 65°C por 10 minutos. Em seguida, foram retirados e deixados em banca sob condições ambientais de laboratório (temperatura de 25°C±2°C) por 3 minutos. Após isto, foram adicionados 750 µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico) e agitados em agitador de tubos tipo vórtex. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 9.000 rpm, e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Em seguida foi acrescentado 300 µL da solução de álcool isopropílico (isopropanol) em cada tubo para a precipitação do DNA. Esses foram agitados lentamente e em seguida centrifugados por 13 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado no tubo foi lavado duas vezes com 600 µL de solução resfriada de etanol a 70%, para a remoção dos resíduos e sais. Após lavados, os tubos com DNA precipitado foram secos em incubadora BOD por 20 min e o DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE + RNase, sendo então deixados por 12 horas em um refrigerador com temperatura em torno de 5 °C. Os DNAs genômico dos isolados foram quantificados

visualmente pelo método da eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras de DNA foram coradas em solução de GelRed + acridin orange, e a eletroforese foi feita a uma voltagem de 90W por 1 hora. A quantificação do DNA foi realizada por comparação com o DNA lambda diluído em concentração conhecidas de 20 ng, 50 ng, 100 ng e 200 ng. Após a quantificação, as amostras tiveram a sua concentração ajustada para 20 ng/μL por diluição em tampão TE e verificada, novamente, por eletroforese em gel de agarose a 1% sob as condições especificadas acima.

As análises de sequências foram feitas a partir de amplicons correspondendo a região ITS-5.8S rDNA e a um segmento do gene *gpdh* (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de todos os isolados de *Stemphylium*. O primer forward, *gpd-f* 5'- GCA CCG ACC ACA AAA ATC-3' e o primer reverse, *gpd-r* 5'-GGG CCG TCA ACG ACC TTC-3', foram usados nos ensaios de PCR para amplificar um segmento do gene *gpdh* (Câmara et al., 2002). Para amplificação de ITS foram utilizados os primers ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et al., 1990; Graf et al., 2016). O volume da reação de PCR utilizado para ambas as regiões foi de 50 μL contendo 3,0 μL de DNA genômico (10 ng), 5,0 μL de um tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 6 μL de MgCl₂ 50 mM, 0,4 μL de dNTPs (2,5 M de cada), 0,2 μL *Taq* DNA polimerase (5 U/μL), 1 μL do primer '*gpd f*', 1 μL do primer '*gpd r*', 33,4 μL de água milliQ. A PCR para ambas as regiões foram conduzidas em um termociclador (DNA Engine[®] Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research, EUA) programado com os seguintes parâmetros: 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos de desnaturação, 57 °C por 1 minuto de anelamento e 72 °C para extensão de 1,5 minuto. A desnaturação inicial a 94 °C foi estendida para 3 minutos e a extensão final foi a 72 °C durante 10 minutos. Os produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de agarose a 1% sob tampão TBE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 120 mM e EDTA 1 mM) a 70 V por

120 minutos à temperatura ambiente, utilizando GelRed® foram revelados e fotografados no fotodocumentador L-Pix Touch Locus® (Locus do Brasil). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) conforme protocolo indicado pelo fabricante. Os sequenciamentos foram realizados pela plataforma de sequenciamento da Universidade Católica de Brasília (Brasília, Distrito Federal, Brasil).

Análise filogenética

A análise da qualidade das sequências de nucleotídeos e a montagem de “contigs” foram realizadas utilizando o pacote Staden Package (Staden et al., 1998). As sequências geradas para a região ITS e para o gene *gapdh* de cada isolado foram comparadas no banco de dados de nucleotídeos GenBank do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) utilizando a ferramenta BLASTn com outras sequências intimamente relacionadas. As sequências similares encontradas e representantes ex-type foram recuperados do GenBank (**Tabela 1**). Todas as sequências foram alinhadas, separadamente para cada região genômica, o qual foi utilizado o programa online MAFFT v.7 ([http:// mafft.cbrc.jp/alignment/ server/large.html](http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/large.html)) (Katoh & Standley, 2013; Katoh et al., 2019) usando o método de refinamento iterativo G-INS-i com parâmetros padrões para abertura e extensão de lacunas e matriz de pontuação de 200PAM / $\kappa=2$ nucleotídeos. O GUIDANCE 2 foi utilizado para filtrar as regiões de alinhamento não confiáveis mascarando resíduos com pontuações abaixo do ponto de corte (<http://guidance.tau.ac.il/>) (Sela et al., 2015), e as pontuações dos alinhamentos de confiança foram calculadas sob os seguintes parâmetros: MAFFT como algoritmo MSA; max-iterate=1000; método de alinhamento par a par=par global; 100 réplicas de bootstrap. O software MEGA 7 foi utilizado para otimizar manualmente os alinhamentos resultantes quando necessário (Kumar et al., 2016). As relações filogenéticas para alinhamentos de gene único e concatenados foram inferidas usando Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência

Bayesiana (BI). Alinhamentos de cada gene foram combinados e particionados para formar uma supermatriz concatenada usando SequenceMatrix 1.8 (Vaidya et al., 2011), onde as sequências ausentes foram codificadas como dados ausentes. Todas as análises de ML foram realizadas no IQ-TREE v. 2.1.2 (Nguyen et al., 2015). A ferramenta IQTree ModelFinder foi utilizada para fazer uma busca automaticamente dos modelos de evolução e partições de caracteres mais adequados (Kalyaanamoorthy et al., 2017; Minh et al., 2020). A confiabilidade dos suportes de ramificação foi constatada usando o teste de razão de verossimilhança aproximada de Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT) (Guindon et al., 2010) e o suporte de bootstrap ultrarrápido (UFboot) (Minh et al., 2013; Hoang et al., 2018) com 1000 réplicas. Análises adicionais de ML foram realizadas usando RAxML-HPC2 v8.2.12 (Stamatakis, 2014) para suporte de inicialização rápida (RAxML-BS), implementado no CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>) (Miller et al., 2010). As buscas em árvore de ML foram realizadas com 1000 pseudoreplicatas (-m GTRGAMMA -p 12345 -k -f a -N 1000 -x 12345) sob o modelo GTR-284 GAMMA. As análises de BI foram conduzidas no MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) também implementados no CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) que foi usado para determinar o modelo de substituição de DNA apropriado usando o Critério de Informação de Akaike (AIC). Quatro cadeias de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) foram conduzidas por 5×10^7 gerações, com amostragens a cada 1000 gerações. A estacionaridade e convergência das cadeias MCMC Bayesianas foram verificadas usando Tracer v 1.5 (Rambaut e Drummond, 2010), e as probabilidades posteriores (PP) foram calculadas após descartar os primeiros 25% de gerações como burn-in. Os clados foram considerados com bom suporte quando ML bootstrap (≥ 70 para RAxML-BS; UFboot ≥ 95 e SH-aLRT ≥ 80) e BI-PP $\geq 0,95$. As árvores filogenéticas foram visualizadas no FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2012) e editadas no software Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems, EUA).

Patogenicidade e virulência

A patogenicidade de virulência foi avaliada em 23 acessos de 18 espécies de plantas: batata (*S. tuberosum*), tomateiro (*S. lycopersicum*), lobeira (*S. lycocarpum*), jurubebão (*S. acanthodes*), jurubeba (*S. scuticum*), cajú-sara (*S. subinerme*), joá bravo (*S. viarium*), jurubebinha (*S. jamaicense*), maria-pretinha (*S. americanum*), muricato (*S. muricatum*), jiló (*S. aethiopicum* var. *gilo*), jurubeba vermelha (*S. stramonifolium*), saia-roxa (*Datura metel*), figueira-brava (*D. stramonium*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), algodão arbóreo (*Gossypium hirsutum*), melancia (*Citrullus lanatus*) e manjerição (*Ocimum basilicum*) (**Tabela 2**). Algumas dessas espécies já foram relatadas como hospedeiras da macha de *Stemphylium* em alguns países, e por isso foram utilizadas nesse experimento. As sementes dessas espécies foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial Bioplant® (Turfa de sphagnum, Fibra de coco, Casca de arroz, Casca de Pinus, Vermiculita, gesso agrícola, carbonato de cálcio, magnésio, termofosfato magnesiano (Yoorin) e aditivos (fertilizantes), pH de 6,2, condutividade elétrica (CE) de 0,7, densidade: 150 kg/m³ e capacidade de Retenção de Água – CRA de 100%) sob condições de casa de vegetação. Aos 30 dias após a germinação, as mudas foram transplantadas para vasos de 1 dm³ preenchidos com solo do cerrado esterilizado, corrigido e adubado.

Produção do inóculo e inoculação

Foram utilizados dois isolados identificados como sendo da espécie *S. lycopersici* (EH-2800 e EH-2811). Os conídios foram produzidos em placas de Petri contendo meio V8 (200 ml de suco V8, 16g de agar, 3 g de CaCO₃ e 800 ml de água. Um disco de micélio de uma cultura pura de cada isolado do patógeno foi depositado no centro de cada placa. As placas foram mantidas durante sete dias em Câmara Incubadora BOD, sob temperatura de 25±2°C em

fotoperíodo de 12 horas de luz negra e 12 horas no escuro. Após sete dias, os conídios foram extraídos a partir da raspagem das colônias fúngicas em água com auxílio de uma escova de cerdas macias. A suspensão foi filtrada em gaze dupla e ajustada a concentração do inóculo para 1×10^4 conídios/ml. As plantas foram pulverizadas com a suspensão de conídios, no estágio de dois a três pares de folhas verdadeira, com o auxílio de um borrifador manual, até o ponto de escorrimento. Os vasos, contendo as plantas inoculadas, foram distribuídos em bancadas da casa de vegetação em desenho inteiramente casualizado (em arranjo fatorial 23×2) com três repetições (cada repetição foi representada por um vaso contendo uma planta). As bancadas foram envolvidas com uma lona plástica transparente para favorecimento do aumento da umidade, formando uma câmara úmida, por 48 horas.

Avaliação da severidade e análise estatística

Após 15 dias da inoculação, a severidade da doença foi avaliada visualmente em quatro folhas por planta (duas folhas do topo e duas da base da planta), usando uma escala descritiva de 0 a 4 (Cho et al. 2001; Huang & Tsai, 2017): **Nota 0** = sem sintomas; **Nota 1** = 1–3 pontos; **Nota 2** = 4–6 pontos necróticos; **Nota 3** = 7 ou mais manchas foliares, mas sem coalescência de manchas; **Nota 4** = 7 ou mais manchas com coalescência de manchas. As notas obtidas foram utilizadas no calculado do índice da doença (ID), através da fórmula de (McKinney, 1923), onde $ID (\%) = 100.S[(f.v)/(n.x)]$; onde **f** = número de plantas com a mesma nota; **v** = nota observada; **n** = número total de plantas avaliadas e **x** = nota máxima da escala.

Resultados

Isolados recuperados

Foram recuperados da coleção da Embrapa Hortaliças (EH) os isolados do gênero *Stemphylium* das seguintes hospedeiras naturais: 1 em fisális (*Physalis angulata*), 11 em

pimentas (*Capsicum* spp.), 1 pimentão (*C. annuum*), 2 de jurubeba (*S. paniculatum*), 2 de batata (*S. tuberosum*), 5 em beringela (*S. melongena*), 1 em jiló (*S. aethiopicum* var. *gilo*) e 60 em tomate (*S. lycopersicum*). Estes isolados foram obtidos nas cinco macrorregiões geográficas do Brasil (**Figura 1**), sendo dois de Tocantins (TO), três do Amazonas (AM) [Região Norte]; três do Paraná (PR), quatro de Santa Catarina (SC), sete do Rio Grande do Sul (RS) [Região Sul]; quatro do Rio de Janeiro (RJ), cinco de Minas Gerais (MG), sete do Espírito Santo (ES), sete de São Paulo (SP) [Região Sudeste]; oito de Pernambuco (PE), 11 da Bahia (BA) [Região Nordeste]; cinco de Goiás (GO) e 23 do Distrito Federal (DF) [Região Centro-Oeste].

Alinhamento de sequências, análise filogenética e designação das espécies

A amplificação por PCR da região ITS-5.8S rDNA de todos os isolados produziu fragmentos variando em tamanho entre 558 e 659 pb. O tamanho dos fragmentos das sequências do gene *gapdh* dos isolados variaram de 874 a 929 pb. Análise filogenética inferida a partir de um conjunto de dados combinando a região ITS-5.8S rDNA e a sequência do gene *gapdh* permitiu separar (bootstrap = 100) os isolados de *Stemphylium* em agrupamento (*clusters*) distintos que incluiu *S. lycopersici* e *S. solani* (**Figura 3**). Os isolados também foram diferenciados de outras espécies de *Stemphylium* usadas neste estudo. De acordo com a análise filogenética, 81 isolados foram classificados como *S. lycopersici* e oito como *S. solani*.

Prevalência das espécies de *Stemphylium*

Em tomateiro, predominou a espécie *S. lycopersici*, sendo que cerca de 97% dos isolados foram identificados com essa espécie e dois isolados (3%) como *S. solani*. Em batata, berinjela, jurubeba e *P. angulata* foram detectados apenas isolados de *S. lycopersici*. A espécie *S. solani* foi detectada de maneira prevalente em jiló, sendo cinco dos seis isolados identificados nesta espécie. A espécie *S. lycopersici* foi encontrada em todos os estados

amostrados (**Figura 4**). Por sua vez, a espécie *S. solani*, embora com um menor número de isolados, apresentou uma ampla distribuição geográfica sendo encontrada em Santa Catarina (SC), Goiás (GO), Espírito Santo (ES), Rio Grande do Sul (RS), Bahia (BA) e Distrito Federal (DF) (**Tabela 3**).

Gama de hospedeiras experimentais

A análise de variância demonstrou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos resultados de índice da doença (ID) e nota de severidade entre os acessos de 18 espécies vegetais inoculadas e entre os dois isolados empregados nos bioensaios. O teste de médias de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), permitiu a diferenciação dos acessos (**Tabelas 4**). As manifestações das diferentes interações foram muito variadas nas diferentes espécies botânicas (**Figura 5**). O isolado EH-2811 foi mais virulento, induzindo sintomas em um número maior de acessos. Sintomas não foram observados em um subgrupo de acessos de *G. hirsutum*, *V. unguiculata*, *P. vulgaris*, *S. jamaicense* (CNPH-0033), *S. americanum* e *C. lanatus* independente do isolado do patógeno. A espécie *S. subinerme* (CNPH-128) foi altamente suscetível aos dois isolados. O isolado EH-2800 foi avirulento para *S. scuticum* CNPH-0410 e *Datura metel*. Frente ao isolado EH-2800, os acessos de *S. lycocarpum* (CNPH-0324 e CNPH-0326), *D. stramonium*, *S. scuticum* (CNPH-0409), *S. stramonifolium* (CNPH-0022), *S. muricatum*, *S. acanthodes* (CNPH-0145 e CNPH-0151), *O. basilicum*, *S. tuberosum* apresentaram valores de ID variando de 14,6% a 87,5%. Acessos de jurubeba vermelha (*S. stramonifolium* CNPH-0021), *S. subinerme* (CNPH-0121 e CNPH-0128), jiló (*S. aethiopicum* var. *gilo*) não diferiram da cultivar de tomateiro ‘Ponderosa’, reagindo como altamente suscetíveis. Frente ao isolado EH-2811, os acessos de *S. stramonifolium* (CNPH-0022 e CNPH-0021), *S. lycocarpum* (CNPH-0324 e CNPH-0326), *S. scuticum* (CNPH-0410 e CNPH-0409), *S. tuberosum*, *O. basilicum*, *D. stramonium*, *S. muricatum*, *S. subinerme* (CNPH-0121), *S. aethiopicum* var. *gilo*, *D. metel* e *S. acanthodes* (CNPH-0145) apresentaram valores de ID variando de 43,8 % a 87,5%. Dois

acessos de *S. acanthodes* (CNPH-0145 e CNPH-0151) e um acesso de *S. subinerme* (CNPH-0128) não diferiram da cultivar ‘Ponderosa’, apresentando elevada suscetibilidade.

Discussão

A nível mundial, a mancha de stemphylium do tomateiro tem sido atribuída a três espécies do gênero *Stemphylium*: *S. solani*, *S. lycopersici* (= *S. floridanum*) e *S. botryosum*. No entanto, mesmo com a enorme relevância da mancha de stemphylium, não se encontrava disponível, até o presente momento, um panorama adequado sobre a distribuição geográfica, gama de potenciais hospedeiras bem como os agentes causais predominantes dessa doença no tomateiro e em outras espécies de Solanaceae nas condições brasileiras.

De fato, no presente trabalho, a utilização combinada de ITS-5.8S rDNA e *gapdh* se mostrou eficiente na identificação dos isolados avaliados embora Wondberg et al. (2017) tenham observado que informação *gapdh* em associação com o gene codificador da calmodulina foram as mais informativas para separar 149 isolados de 28 espécies de *Stemphylium*.

Os nossos resultados indicaram que a mancha de stemphylium do tomateiro nas condições brasileiras é causada predominantemente por isolados de *S. lycopersici*, sendo a espécie *S. solani* menos frequente. De modo geral, cerca de 91% dos isolados foram classificados como *S. lycopersici*, sendo esse patógeno detectado em praticamente todos os estados e em todas as macrorregiões geográficas do Brasil. Isolados de *S. lycopersici* e *S. solani* também foram detectados infectando naturalmente diferentes espécies de plantas da família Solanaceae. Além disso, os isolados de *S. lycopersici* apresentaram um amplo círculo de plantas hospedeiras, infectando e induzindo sintomas em várias espécies de plantas avaliadas incluindo *O. basilicum* (família Lamiaceae), a batata (*S. tuberosum*) e principalmente espécies de solanáceas espinhosas do gênero *Solanum* subgênero *Leptostemonum* (*S. subinerme*, *D. starmanium*, *S. aethiopicum*, *S. scuticum*, *S. stramonifolium*, *S. acanthodes*, *S. lycocarpum*, *S.*

muricatum). A ocorrência de *S. lycopersici* tem sido reportada com maior frequência infectando espécies da família Solanaceae bem como em outras famílias botânicas em diversas regiões do mundo (Farr & Rossman, 2023). Por esta razão, a espécie *S. lycopersici* tem sido mais intensamente estudada visando o entendimento dos processos patogênicos em diferentes plantas hospedeiras (Al-Amri et al., 2017; Huang & Tsai, 2017; Nasehi et al., 2014; Reis & Boiteux, 2006b; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2022). Apesar dos isolados de *S. lycopersici* não infectarem e/ou induzirem sintomas nos acessos de melancia (*C. lanatus*) e o feijão (*P. vulgaris*) utilizados no presente trabalho, estas duas espécies já foram relatadas como hospedeiras de *S. lycopersici* em outros países (Farr & Rossman, 2023), indicando potenciais fatores de resistência nestas hospedeiras ou variabilidade no perfil de virulência dos isolados do patógeno. Entre as solanáceas avaliadas, a lobeira (*S. lycocarpum*), a *Datura* e o jiló já tinham sido previamente relatadas como hospedeiras naturais de *S. solani* (Boiteux et al., 1993; Reis & Boiteux 2006a; Pereira et al., 2012). As plantas de manjerição também desenvolveram mancha de stemphylium causada por *S. lycopersici*. Reis & Boiteux (2006a) também observaram que a espécie *S. solani* foi patogênica ao manjerição.

A maioria das solanáceas avaliadas neste trabalho apresentou suscetibilidade aos isolados de *S. lycopersici*. Estas foram consideradas potenciais hospedeiras deste fungo. Entretanto, *S. americanum* (erva-moura ou maria-pretinha) e *S. jamaicense* (jurubebinha) não apresentaram sintomas da doença e possivelmente possuem uma resistência do tipo não-hospedeira e poderiam ser utilizadas em estudos para entender as suas bases genéticas e moleculares, visando a caracterização de novos genes de resistência e seu possível uso em plantas cultivadas para se obter uma resistência mais durável (Maciel & Danelli, 2018).

Recentes relatos têm revelado, a nível mundial, um panorama similar ao observado no presente estudo, onde a espécie *S. lycopersici* aparece como sendo o agente causal predominante da doença em Solanáceas quando comparada com *S. solani* bem como em um

subgrupo de espécies hospedeiras de distintas famílias botânicas (Ben et al., 2021; Nasehi et al., 2014; Nishi et al., 2009; Sun & Huang, 2022; Tomioka et al., 2021; Xie et al., 2019; Yang et al., 2017). O perfil de virulência mais amplo de *S. lycopersici* também foi observado no presente trabalho, especialmente no conjunto de isolados obtidos de plantas de *Capsicum* e tomateiro. Nos isolados mais recentes, a espécie *S. lycopersici* tem predominado em relação ao *S. solani*. Esse fato pode estar associado com a uma melhor adaptação as condições ambientais tropicais e subtropicais de *S. lycopersici* em relação a *S. solani* pode fornecer vantagens comparativas nas etapas da infecção, esporulação, crescimento do patógeno bem como na expressão de fatores de virulência nas plantas hospedeiras. No entanto, todos esses aspectos precisam ser investigados em estudos futuros. Além disso, a sobrevivência do inóculo em condições de ausência da hospedeira primária pode representar um fator crítico para explicar a prevalência de *S. lycopersici* como agente causal da doença. Neste contexto, um patógeno com um mais amplo círculo de plantas hospedeiras (como aparenta ser o caso de *S. lycopersici*) se constituiu em uma hipótese plausível para explicar a sua prevalência em condições naturais. Novos estudos comparativos de hospedeiras experimentais e naturais de *S. lycopersici* e *S. solani* podem consolidar essa hipótese. Além disso, existe também um novo tipo de pressão de seleção oriundo dos recentes padrões de mudanças climáticas (Ghini et al., 2008; Nnadi & Carter, 2021) que pode também explicar a maior prevalência de isolados de *S. lycopersici*. As mudanças climáticas, assim como capacidade de infectar novas hospedeiras são fatores que influenciam no aumento da diversidade genética das populações de patógenos, uma vez que o surgimento de variantes é essencial para manter a adaptação por meio da seleção natural (Stukenbrock & Bataillon, 2012). Neste contexto, estudos genômicos das interações entre *S. lycopersici* e diferentes hospedeiras bem como estudos de genética de populações de *S. lycopersici* são necessários para fornecer as bases científicas do manejo desse patógeno no Brasil.

O principal método de manejo da mancha de *stemphylium* tem sido a utilização de produtos químicos. O conhecimento da diversidade dos patógenos é importante para subsidiar os estudos de identificação de novas fontes de resistência assim como da sensibilidade do patógeno às moléculas antifúngicas existentes. No entanto, não há informações relevantes da eficiência desses produtos contra isolados de *S. lycopersici*. A utilização constante e irracional de alguns princípios ativos de fungicidas, representa risco para a seleção de isolados resistentes, além dos riscos ao meio ambiente. Bi et al. (2022) e Wu et al. (2015) observaram a existência de mutantes de *S. solani* para os fungicidas fludioxonil e fluxapiroxade.

Em conclusão, o presente estudo evidenciou que *S. lycopersici* é a principal espécie causadora da mancha de *stemphylium* no tomateiro e em outras solanáceas (excetuando o jiló), sendo detectado em todas as macrorregiões do Brasil. Isolados de *S. lycopersici* apresentaram um amplo círculo plantas de hospedeiras, infectando diversas Solanaceae cultivadas, selvagens e invasoras. Neste contexto, a espécie *S. lycopersici* deve ser, portanto, o foco dos programas de melhoramento genético visando o desenvolvimento de cultivares resistentes.

Referências

- Al-Amri, K., Al-Sadi, A. M., Al-Shihi, A., Nasehi, A., Al-Mahmooli, I., & Deadman, M. L. (2016). Population structure of *Stemphylium lycopersici* associated with leaf spot of tomato in a single field. SpringerPlus, 5(1), 1642. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3324-9>
- Ben, H., Huo, J., Song, C., Yao, Y., Gao, W., Wang, W., Hao, Y., & Zhang, X. (2021). *Stemphylium lycopersici* Causing Leaf Spot of Watermelon (*Citrullus lanatus*) in China. Plant Disease, 105(12), 4157. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0990-PDN>
- Bi, L., Xu, J., Wang, Q., Li, T., Wang, J., Zhou, M., & Duan, Y. (2022). Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Stemphylium solani* to fluxapyroxad. Crop Protection, 156, 105944. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.105944>

Blancard, D. (2012). Tomato Diseases. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b15145>

Boiteux, L. S., & Fonseca, M. E. N. (2023). Tomate. In: Jorge Duarte. (Org.). Brasil em 50 Alimentos. 1^a ed., Brasília-DF: Embrapa/Teixeira Gráfica e Editora, 2023, v. 1, p. 296–301. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1153294/brasil-em-50-alimentos>

Boiteux, L. S., Fonseca, M. E. N., & Simon, P. W. (1999). Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-based Genetic Fingerprinting Analysis in Carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(1), 32–38. <https://doi.org/10.21273/JASHS.124.1.32>

Boiteux, L. S., Henz, G. P., & Giordano, L. B. (1993). *Solanum lycocarpum*: A Natural Host of *Stemphylium solani*. 77(8), 846.

Boiteux, L. S., Fonseca, M. E. N., & González-Arcos, M. (2016). Melhoramento de Tomate para Processamento Industrial. In: Nick, C.; Borem, A. (Org.). Melhoramento de Hortaliças. 1ed. Viçosa-MG: Editora UFV, 2016, v. 1, p. 432-464.

Boteon, M., Deleo, J. P. B., & Moreira, M. M. (2020). Tomaticultura em números. *Revista Hortifrúti Brasil*, 13–20. <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/especial-tomate-impactos-covid-19-nos-curto-e-medio-prazos.aspx>

Câmara, M. P. S., O'Neill, N. R., & van Berkum, P. (2002). Phylogeny of *Stemphylium* spp. based on ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 94(4), 660–672. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833194>

Castellani, A. (1963). Further research on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 20(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF02054872>

Clemente, F. M. V. T.; Boiteux, L. S. (2012). Produção de Tomate para Processamento Industrial. 1.ed. Brasília-DF: Embrapa, v. 1. 344p.

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database. Crops database. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 02 de agosto 2020.

Farr DF, & Rossman AY (2023). Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved Mar 25, 2023, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>

Ghini, R., Hamada, E., & Bettiol, W. (2008). Climate change and plant diseases. *Scientia Agricola*, 65(spe), 98–107. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000700015>

Graf, S., Bohlen-Janssen, H., Miessner, S., Wichura, A., & Stammler, G. (2016). Differentiation of *Stemphylium vesicarium* from *Stemphylium botryosum* as causal agent of the purple spot disease on asparagus in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 144, 411–418.

Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>

Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>

Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, T. M., & Miller, S. A. (2016). *Compendium of Tomato Diseases and Pests*, Second Edition (J. B. Jones, T. A. Zitter, T. M. Momol, & S. A. Miller, Eds.). The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890544341>

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kim, B.-S., Yu, S.-H., Cho, H.-J., & Hwang, H.-S. (2004). Gray leaf spot in peppers caused by *Stemphylium solani* and *S. lycopersici*. *The Plant Pathology Journal*, 20. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2004.20.2.085>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Li, W., Wu, Y., Yuan, M., & Liu, X. (2020). Fluxapyroxad induces developmental delay in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 256, 127037. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127037>
- Liu, H., Wang, H., Zhong, J., Lu, X., Pan, X. T., Zhu, H. J., & Zhou, Q. (2019). First report of *Stemphylium lycopersici* and *Stemphylium vesicarium* causing leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa*) in China. *Plant Disease*, 103(11), 2957. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1052-PDN>
- Lopes, C. A. (2021). *Doenças do Tomateiro: Vol. 3ª edição* (A. Reis, A. K. Inoue-Nagata, A. M. Quezado-Duval, C. A. Lopes, G. P. Henz, J. P. Borges, L. S. Boiteux, M. F. Lima, P. C. T. Melo, & V. Lourenço Jr, Eds.; 3ª edição). Embrapa Hortaliças. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/227119/1/Livro-Doencas-do-Tomateiro.pdf>
- Maciel, J., & Danelli, A. (2018). Resistência Genética de Plantas a Fungos. In *Resistência Genética de Plantas a Patógenos* (pp. 359–378). UFPel.
- McKinney H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26, 195–217. <https://handle.nal.usda.gov/10113/IND43966679>
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1–8.

<https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>

Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188–1195.

<https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>

Miranda, B. E. C., Boiteux, L. S., & Reis, A. (2010). Identificação de genótipos do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) com resistência a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. *Horticultura Brasileira*, 28(2), 178–184. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000200007>

Namekata, T., & Tokeshi, H. (1967). Variabilidade de *Stemphylium solani*, Weber, agente causal de mancha foliar do tomateiro, no estado de São Paulo. *Anais Da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, 24(0), 273–288. <https://doi.org/10.1590/S0071-12761967000100026>

Nasehi, A., Kadir, J. bin, Esfahani, M. N., Mahmodi, F., Golkhandan, E., Akter, S., & Ghadirian, H. (2014). Cultural and physiological characteristics of *Stemphylium lycopersici* causing leaf blight disease on vegetable crops. *Archives of Phytopathology And Plant Protection*, 47(14), 1658–1665.

<https://doi.org/10.1080/03235408.2013.853905>

Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Nishi, N., Muta, T., Ito, Y., Nakamura, M., & Tsukiboshi, T. (2009). Ray speck of chrysanthemum caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 75(1), 80–82.

<https://doi.org/10.1007/s10327-008-0133-1>

- Nnadi, N. E., & Carter, D. A. (2021). Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS Pathogens*, 17(4), e1009503. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009503>
- Nylander, J. (2004). MrModeltest V2. Program Distributed by the Author. *Bioinformatics*, 24, 581–583.
- Pereira, R.B.; Pinheiro, J. B.; Anderson, J. & Reis, A. 2012. Doenças e pragas do jiloeiro. Circular técnica 106, ed. 1. Embrapa Hortaliças: Brasília, DF. 13p.
- Rambaut A. (2012). FigTree v.1.4.2: Tree Figure Drawing Tool. Available online at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> (Accessed August 11, 2014).
- Rambaut, A., 2012. FigTree v1.4.0: Tree Figure Drawing Tool. Available: RAMBAUT, A., 2012. FigTree v1.4.0: Tree Figure Drawing Tool. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Rambaut, A., Drummond, A., 2010. Tracer v. 1.4 Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Accessed 15 march, 2022.
- Reis, A., & Boiteux, L. S. (2006a). Círculo de hospedeiras de isolados de *Stemphylium solani*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 18.
- Reis, A., & Boiteux, L. S. (2006b). Mancha-de-estenfilio: Ressurgimento de um antigo problema do tomateiro. Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 41, 1–8.
- Reis, A., Lourenço Jr., V., & Lopes, C. A. (2021). Doenças causadas por fungos e oomicetos. *In: Doenças do tomateiro: Vol. 3ª Edição* (pp. 23–69). www.embrapa.br/fale-conosco/sac
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Sela, I., Ashkenazy, H., Katoh, K., & Pupko, T. (2015). GUIDANCE2: Accurate detection of

unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W7–W14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv318>

Staden, R., Beal, K. F., & Bonfield, J. K. (1998). The Staden Package, 1998. In *Bioinformatics Methods and Protocols* (pp. 115–130). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115>

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

Stukenbrock EH, Bataillon T (2012) A population genomics perspective on the emergence and adaptation of new plant pathogens in agro-ecosystems. *PLoS Pathogens* 8(9): e1002893. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002893>

Sun, Y.-C., & Huang, C.-J. (2022). First report of *Stemphylium lycopersici* causing gray leaf spot of pepper in Taiwan. *Journal of Plant Pathology*, 104(3), 1169. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01144-9>

Tomioka, K., Abe, D., Kawaguchi, A., Kawakami, A., Masunaka, A., Mori, S., Nomiyama, K., & Sekiguchi, H. (2021). *Stemphylium* leaf spot of asparagus caused by *Stemphylium lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology*, 87(1), 51–54. <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00968-6>

Vaidya, G., Lohman, D. J., & Meier, R. (2011). SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27(2), 171–180. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>

Weber, G. F. (1930). Gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani*, sp. nov. *Phytopathology*, 20, 513–518.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols* (pp. 315–322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

- Wu, D.-X., Zhang, R.-S., Han, X., Wang, J.-X., Zhou, M.-G., & Chen, C.-J. (2015). Resistance risk assessment for fludioxonil in *Stemphylium solani*. *Annals of Applied Biology*, 167(2), 277–284. <https://doi.org/10.1111/aab.12230>
- Xie, X., Wu, J., Cheng, Y., Shi, J., Zhang, X., Shi, Y., Chai, A., & Li, B. (2019). First report of *Stemphylium lycopersici* causing leaf spot on hot pepper in China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41(1), 124–128. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1516238>
- Yang, H. H., Xu, X. Y., Zhao, T. T., Jiang, J. B., Liu, G., & Li, J. F. (2017). First report of *Stemphylium lycopersici* causing gray leaf spot on eggplant in China. *Plant Disease*, 101(5), 834. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1343-PDN>
- Yang, H., Li, Y., He, Y., Sun, Y., Jiang, J., Zhao, T., Zhang, H., Xu, X., & Li, J. (2020). First report of *Stemphylium lycopersici* causing gray leaf spot on Physali (*Physalis alkekengi*) in China. *Plant Disease*, 104(10), 2725–2725. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2231-PDN>
- Yang, H., Zhao, T., Jiang, J., Wang, S., Wang, A., Li, J., & Xu, X. (2017). Mapping and screening of the tomato *Stemphylium lycopersici* resistance gene, *Sm*, based on bulked segregant analysis in combination with genome resequencing. *BMC Plant Biology*, 17(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1215-z>
- Zhang, D., Chi, W., Wang, C., Dai, H., Li, J., Li, C., & Li, F. (2022). Pathogenic process-associated transcriptome analysis of *Stemphylium lycopersici* from tomato. *International Journal of Genomics*, 2022, 4522132, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/4522132>

Figuras e Tabelas

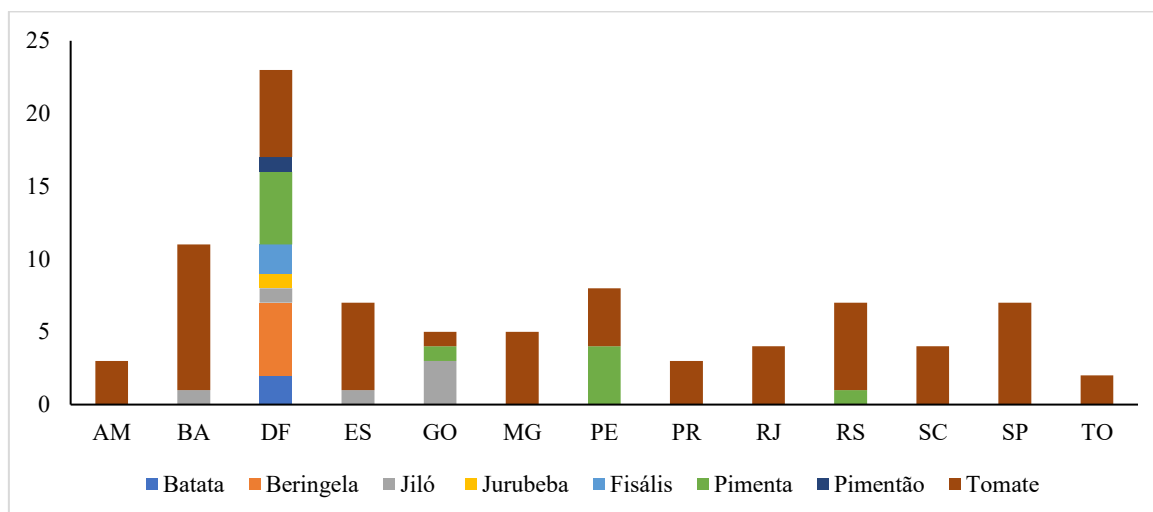


Figura 1. Distribuição dos isolados de *Stemphilium* de acordo com às plantas hospedeiras e às regiões geográficas do Brasil. fisális (*Physalis angulata*), pimentas (*Capsicum* spp.), pimentão (*C. annuum*), e jurubeba (*S. paniculatum*), batata (*S. tuberosum*), beringela (*S. melongena*), jiló (*S. aethiopicum* var. *gilo*) e tomate (*S. lycopersicum*).

Tabela 1. Acessos do GenBank utilizados como referências nas análises filogenéticas deste estudo.

Espécies	Número do isolado	Número de acesso do GenBank	
		ITS	gapdh
<i>Alternaria alternata</i>	GV14-634a1	KU850502	KU850649
<i>Stemphylium astragali</i>	CBS 116583T	KU850512	KU850659
<i>Stemphylium astragali</i>	VPRI 42505	MN401357	MK967760
<i>Stemphylium beticola</i>	CBS 141024T	KU850520	KU850667
<i>Stemphylium beticola</i>	CBS 141026	KU850522	KU850669
<i>Stemphylium botryosum</i>	CBS 714.68T	KC584238	AF443881
<i>Stemphylium botryosum</i>	CBS 116596	KU850538	KU850685
<i>Stemphylium callistephi</i>	CBS 527.50T	KU850539	KU850686
<i>Stemphylium canadense</i>	CBS 116602T	KU850641	KU850782
<i>Stemphylium chrysanthemicola</i>	CBS 117255T	KU850640	KU850781
<i>Stemphylium chrysanthemicola</i>	VPRI 10316	MK336835	MK336881
<i>Stemphylium drummondii</i>	CBS 346.83T	GQ395365	KU850687
<i>Stemphylium eturmiunum</i>	CBS 109845T	KU850541	KU850689
<i>Stemphylium eturmiunum</i>	CBS 122124	KU850542	KU850690
<i>Stemphylium gracilariae</i>	CBS 482.90T	KU850549	AF443883
<i>Stemphylium gracilariae</i>	CBS115179	KU850550	KU850697
<i>Stemphylium halophilum</i>	CBS 337.73T	KU850553	KU850700
<i>Stemphylium halophilum</i>	CBS 410.73	KU850554	KU850701
<i>Stemphylium ixeridis</i>	CBS 124748T	KU850590	KU850737
<i>Stemphylium lancipes</i>	CBS 133314T	KU850596	KU850742
<i>Stemphylium lancipes</i>	CBS 116584	KU850595	AF443886
<i>Stemphylium loti</i>	CBS 407.54T	KU850597	KU850743
<i>Stemphylium lucomagnoense</i>	CBS 116601T	KU850629	KU850770
<i>Stemphylium lycii</i>	CBS 125241T	KU850602	KU850748
<i>Stemphylium lycii</i>	CBS 125240	KU850601	KU850747
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 122639T	KU850611	KU850756
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 120326	KU850610	KU850755
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 333.73	KU850603	KU850749
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 124983	KU850616	KU850761
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 463.78	KU850605	KU850751
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 436.76	KU850604	KU850750
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 321.87	KU850606	KU850752
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 116585	KU850607	AY317010
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 116587	KU850608	KU850753
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 120325	KU850609	KU850754
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 122803	KU850612	KU850757
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 123008	KU850613	KU850758
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 124980	KU850614	KU850759
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 124981	KU850615	KU850760
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 135778	KU850617	AY317026
<i>Stemphylium majusculum</i>	CBS 717.68T	KU850618	AF443891

<i>Stemphylium majusculum</i>	CBS 133424	KU850619	AF443891
<i>Stemphylium novae-zelandiae</i>	CBS 138157	KU850630	KU850771
<i>Stemphylium novae-zelandiae</i>	CBS 138295T	KU850631	KU850772
<i>Stemphylium paludiscirpi</i>	CBS 109842T	KU850620	KU850762
<i>Stemphylium sarciniforme</i>	CBS 110049T	KU850591	KU850738
<i>Stemphylium sarciniforme</i>	CBS 116579	KU850623	AF443892
<i>Stemphylium simmonsii</i>	CBS 133518T	KU850637	KU850778
<i>Stemphylium simmonsii</i>	CBS 116598	KU850633	KU850774
<i>Stemphylium solani</i>	CBS 116586T	KU850627	KU850768
<i>Stemphylium solani</i>	CBS 118082	KU850628	KU850769
<i>Stemphylium solani</i>	CBS 408.54	KU850626	KU850767
<i>Stemphylium symphyti</i>	CBS 115268T	KU850643	KU850784
<i>Stemphylium symphyti</i>	CBS 118796	KU850644	KU850785
<i>Stemphylium trifolii</i>	CBS 116580T	KU850647	KU850788
<i>Stemphylium triglochinicola</i>	CBS 718.68T	KU850648	KU850789
<i>Stemphylium vesicarium</i>	CBS 715.68T	KU850565	KU850712
<i>Stemphylium amaranthi</i>	CBS 124746T	KU850505	KU850652
<i>Stemphylium amaranthi</i>	CBS 124651	KU850504	KU850651
<i>Stemphylium vesicarium</i>	KNU1709YG	MK073013	MK105974

Tabela 2. Acessos de 18 espécies de plantas utilizadas no ensaio de gama de plantas hospedeiras a dois isolados de *Stemphylium lycopersici*.

Espécies	Código do acesso*	Espécie
Algodão Arbóreo	-	<i>Gossypium arboreum</i>
Feijão comum	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Feijão caupi	-	<i>Vigna unguiculata</i>
Melancia	-	<i>Citrullus lanatus</i>
Manjerição	-	<i>Ocimum basilicum</i>
Jiló	-	<i>Solanum aethiopicum</i>
Ponderosa	-	<i>Solanum lycopersicum</i>
Maria pretinha	-	<i>Solanum americanum</i>
Lobeira	(CNPH-0324)	<i>Solanum lycocarpum</i>
Lobeira	(CNPH-0326)	<i>Solanum lycocarpum</i>
Saia-roxa	-	<i>Datura metel</i>
Figueira-brava	-	<i>Datura starmanium</i>
Joá bravo	(CNPH-0214)	<i>Solanum viarum</i>
Joá bravo	(CNPH-0184)	<i>Solanum viarum</i>
Jurubeba vermelha	(CNPH-0022)	<i>Solanum stramonifolium</i>
Cajusara	(CNPH-0128)	<i>Solanum subinerme</i>
Jurubebão	(CNPH-0151)	<i>Solanum acanthodes</i>
Pepino andino	-	<i>Solanum muricatum</i>
Jurubeba	(CNPH-0409)	<i>Solanum scuticum</i>
Cajusara	(CNPH-0121)	<i>Solanum subinerme</i>
Jurubeba	(CNPH-0410)	<i>Solanum scuticum</i>
Jurubebão	(CNPH-0145)	<i>Solanum acanthodes</i>
Batata	-	<i>Solanum tuberosum</i>
Jurubebinha	(CNPH-0033)	<i>Solanum jamaicense</i>
Jurubeba vermelha	(CNPH-0021)	<i>Solanum stramonifolium</i>

*Código CNPH – códigos de acessos de plantas da Embrapa Hortaliças.

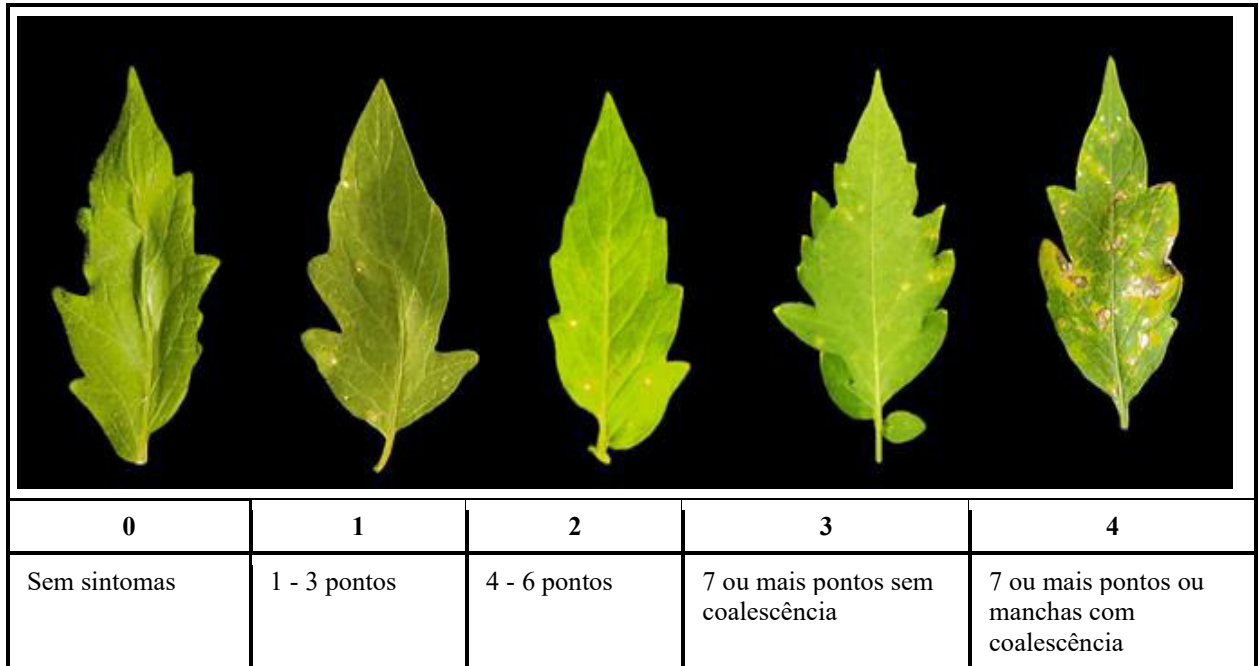
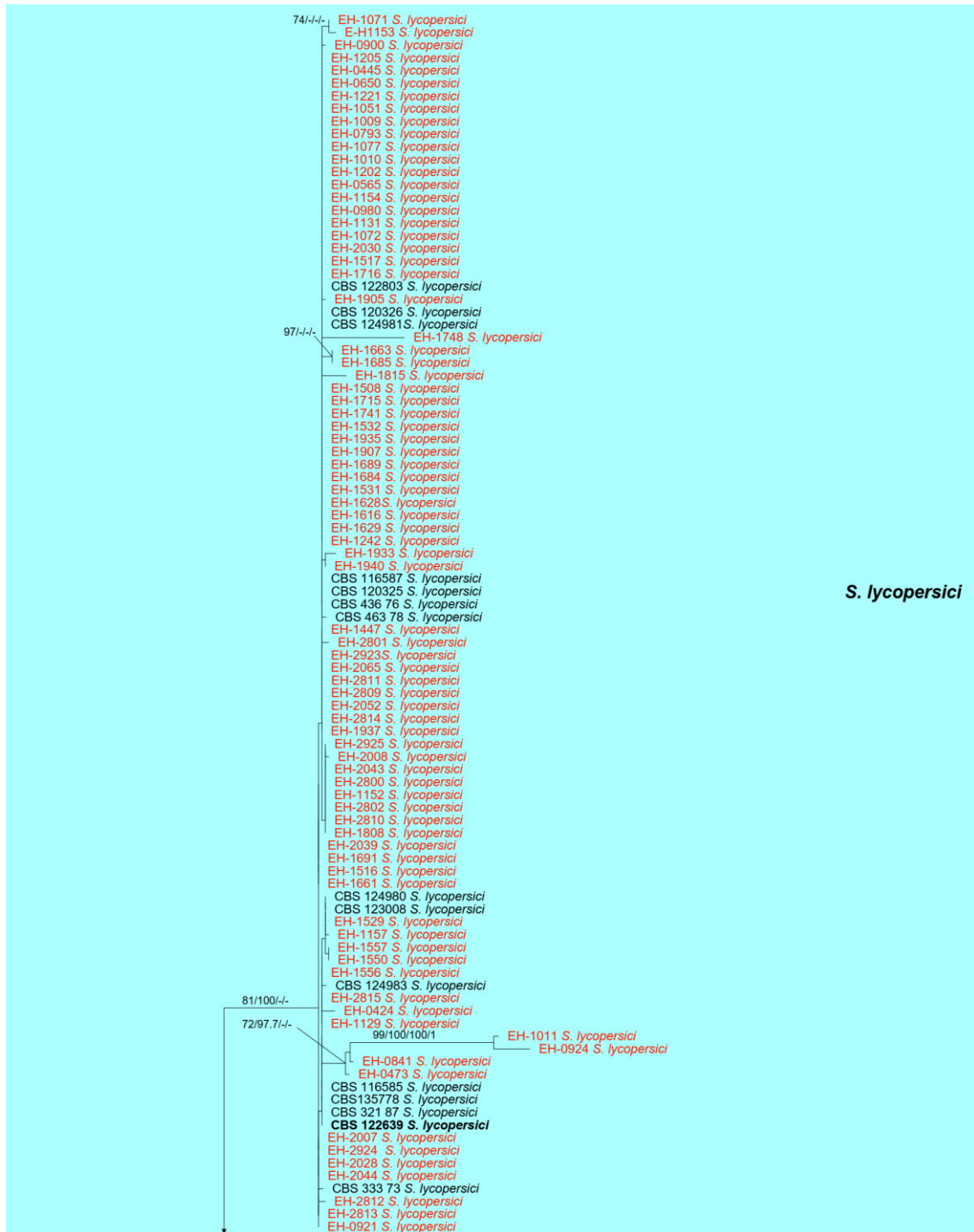


Figura 2. Notas e respectivas reações da mancha de stemphylium em folhas de tomateiro de acordo coma escala drsicritiva de Cho et al. 2001.



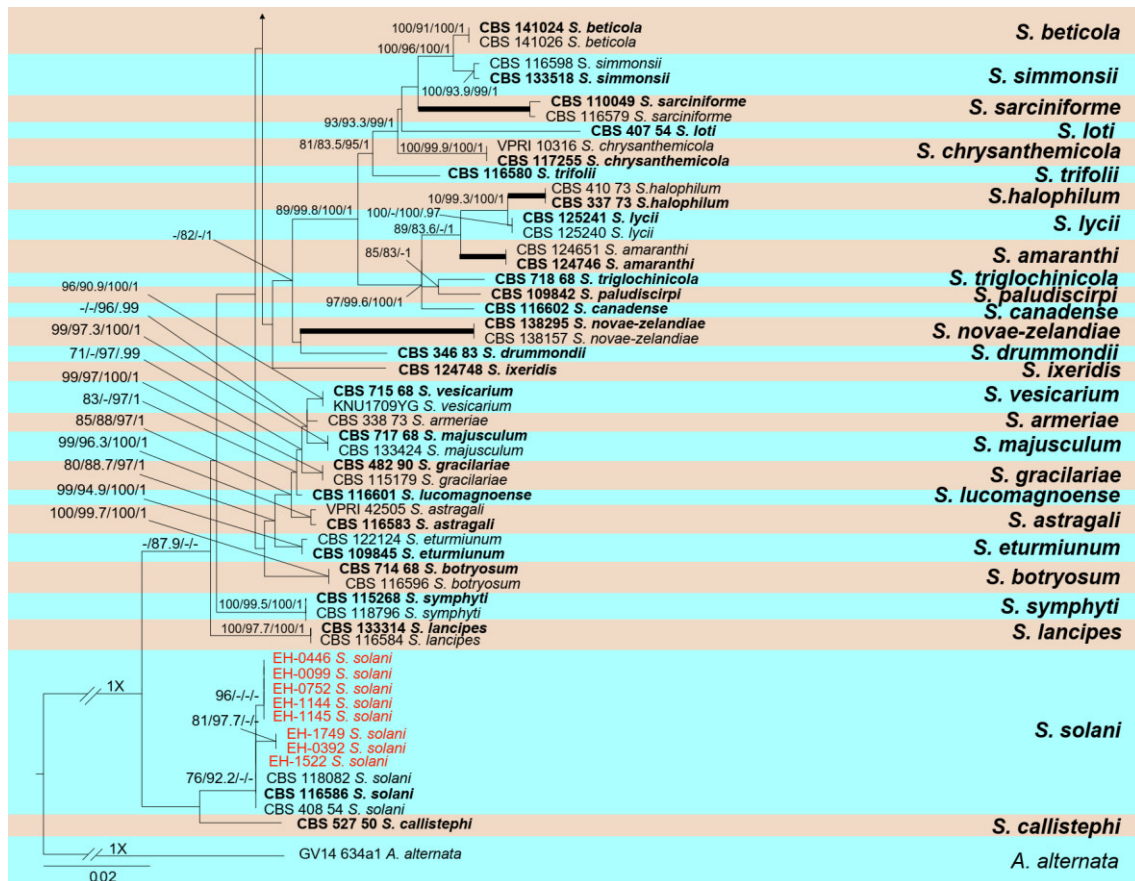


Figura 3. Análise Bayesiana concatenada do gene *gapdh* e ITS. Os isolados da coleção de fungos da Embrapa Hortaliças (EH) estão escritos em vermelho. Em negrito são os ex-type.

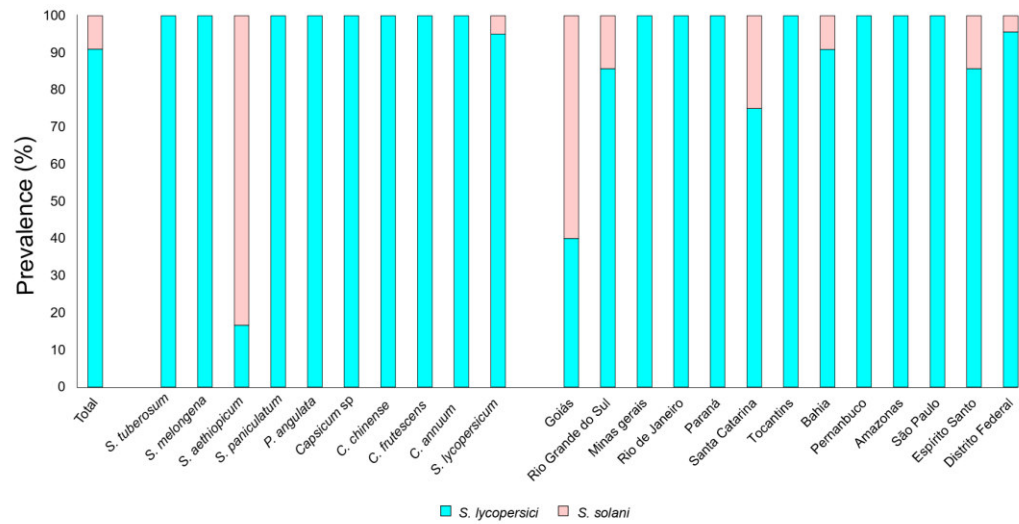


Figura 4. Prevalência dos isolados das espécies fúngicas de *Stemphylium solani* e *S. lycopersici* em espécies botânicas e nos Estados brasileiros.

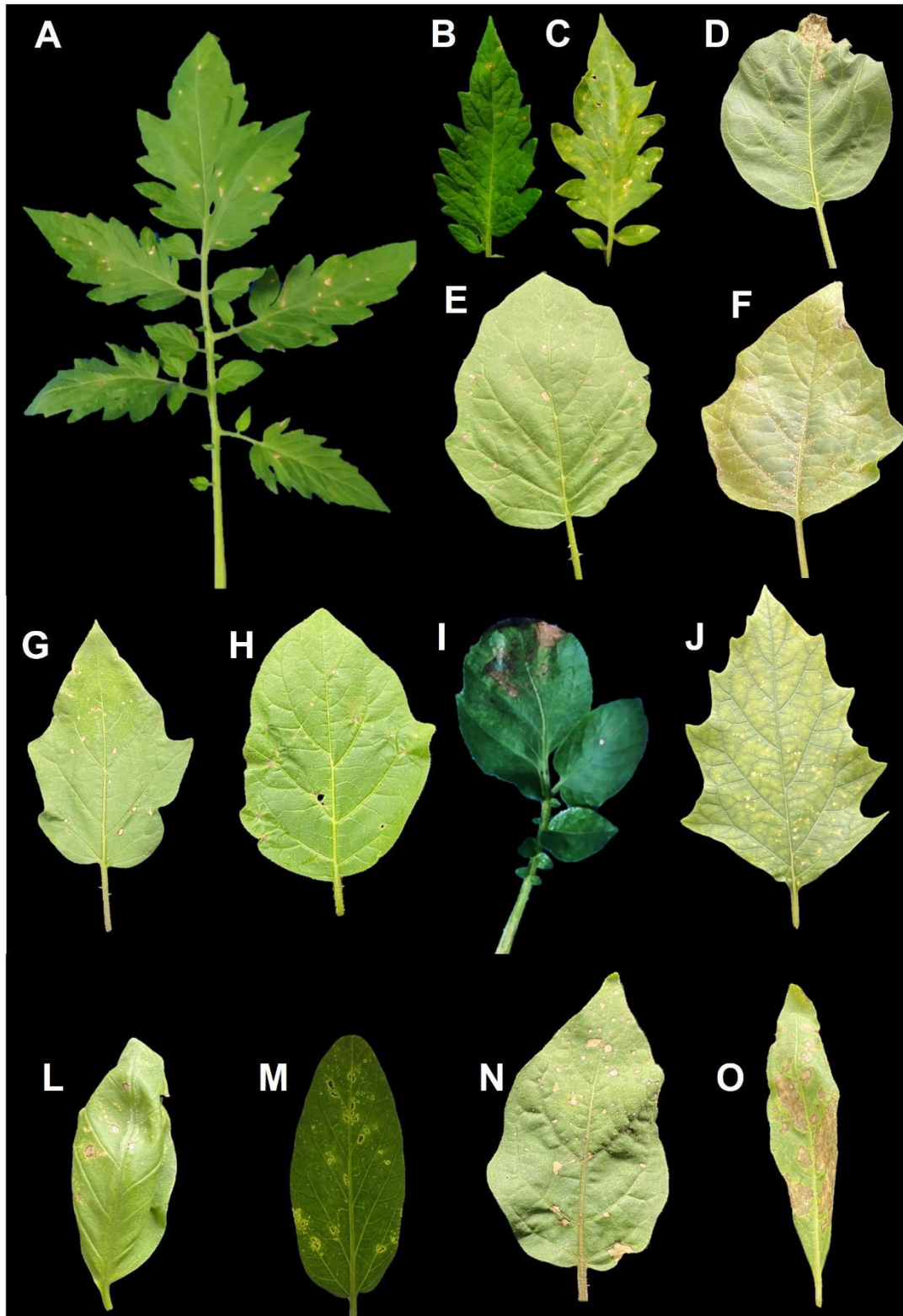


Figura 5. Folhas de diferentes espécies de plantas apresentando sintomas de mancha de stemphylium *Stemphylium lycopersici*: (A) folha composta de tomateiro; (B-C) folíolos de tomateiro; (D) *Solanum aethiopicum*; (E) *Solanum scuticum*; (F); *Datura stramonium*; (G) *Solanum stramonifolium*; (H) *Solanum acanthodes*; (I) *Solanum tuberosum*; (J) *Datura metel*; (L) *Ocimum basilicum*; (M) *Solanum muricatum*; (N) *Solanum subnigrum*; e (O) *Solanum lycocarpum*.

Tabela 3. Relação dos isolados de *Stemphylium* sp. Identificados.

Código da Embrapa	Hospedeiras	Espécie botânica	Local (Unidade da Federação)	Ano	Espécie identificada
EH-0099	Jiló	<i>Solanum aethiopicum</i>	Goiás	2002	<i>Stemphylium solani</i>
EH-0392	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Santa Catarina	2003	<i>Stemphylium solani</i>
EH-0424	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Minas Gerais	2003	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-0445	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Minas Gerais	2003	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-0446	Jiló	<i>Solanum aethiopicum</i>	Distrito Federal	2003	<i>Stemphylium solani</i>
EH-0473	Pimenta	<i>Capsicum</i> sp.	Rio Grande do Sul	2003	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-0565	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Minas Gerais	2003	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-0650	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Distrito Federal	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-0752	Jiló	<i>Solanum aethiopicum</i>	Bahia	2003	<i>Stemphylium solani</i>
EH-0793	Pimentão	<i>Capsicum annuum</i>	Distrito Federal	2003	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-0841	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Distrito Federal	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-0900	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pernambuco	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-0921	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bahia	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-0924	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bahia	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-0980	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	São Paulo	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1009	Berinjela	<i>Solanum melongena</i>	Distrito Federal	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1010	Berinjela	<i>Solanum melongena</i>	Distrito Federal	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1011	Berinjela	<i>Solanum melongena</i>	Distrito Federal	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1051	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rio de Janeiro	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1071	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Goiás	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1072	Pimenta	<i>Capsicum</i> sp.	Goiás	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1077	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Distrito Federal	2004	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1129	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Santa Catarina	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>

Continua na próxima página...

EH-1131	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Santa Catarina	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1144	Jiló	<i>Solanum aethiopicum</i>	Goiás	2005	<i>Stemphylium solani</i>
EH-1145	Jiló	<i>Solanum aethiopicum</i>	Goiás	2005	<i>Stemphylium solani</i>
EH-1152	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rio Grande do Sul	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1153	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rio Grande do Sul	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1154	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rio Grande do Sul	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1157	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Paraná	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1202	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rio Grande do Sul	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1205	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Paraná	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1221	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Distrito Federal	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1242	Pimenta	<i>Capsicum</i> sp.	Distrito Federal	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1447	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	São Paulo	2005	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1508	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	São Paulo	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1516	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Espírito Santo	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1517	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Espírito Santo	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1522	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Espírito Santo	2006	<i>Stemphylium solani</i>
EH-1529	Jiló	<i>Solanum aethiopicum</i>	Espírito Santo	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1531	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Espírito Santo	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1532	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Espírito Santo	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1550	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Santa Catarina	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1556	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bahia	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1557	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bahia	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1616	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rio Grande do Sul	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1628	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tocantins	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1629	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tocantins	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1661	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Minas Gerais	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1663	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Minas Gerais	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1684	Berinjela	<i>Solanum melongena</i>	Distrito Federal	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>

Continua na próxima página...

EH-1685	Pimenta	<i>Capsicum</i> sp.	Distrito Federal	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1689	Batata	<i>Solanum tuberosum</i>	Distrito Federal	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1691	Batata	<i>Solanum tuberosum</i>	Distrito Federal	2006	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1715	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Amazonas	2007	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1716	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Amazonas	2007	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1741	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Amazonas	2008	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1748	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Paraná	2008	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1749	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rio Grande do Sul	2008	<i>Stemphylium solani</i>
EH-1808	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pernambuco	2009	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1815	Jurubeba do Campo	<i>Solanum paniculatum</i>	Distrito Federal	2009	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1905	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	São Paulo	2009	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1907	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Espírito Santo	2009	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1933	Berinjela	<i>Solanum melongena</i>	Distrito Federal	2010	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1935	Fisális	<i>Physalis angulata</i>	Distrito Federal	2010	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1937	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Distrito Federal	2010	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-1940	Fisális	<i>Physalis angulata</i>	Distrito Federal	2010	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2007	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pernambuco	2010	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2008	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pernambuco	2010	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2028	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bahia	2011	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2030	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bahia	2011	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2039	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bahia	2011	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2043	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bahia	2011	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2044	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bahia	2011	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2052	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bahia	2011	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2065	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Distrito Federal	2011	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2800	Pimenta Malagueta	<i>Capsicum frutescens</i>	Distrito Federal	2021	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2801	Pimenta Malagueta	<i>Capsicum frutescens</i>	Distrito Federal	2021	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2802	Pimenta Malagueta	<i>Capsicum frutescens</i>	Distrito Federal	2021	<i>Stemphylium lycopersici</i>

Continua na próxima página...

EH-2809	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rio de Janeiro	2021	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2810	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rio de Janeiro	2021	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2811	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Rio de Janeiro	2021	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2812	Pimenta Bodinhho	<i>Capsicum chinense</i>	Pernambuco	2021	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2813	Pimenta Bodinhho	<i>Capsicum chinense</i>	Pernambuco	2021	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2814	Pimenta Bodinhho	<i>Capsicum chinense</i>	Pernambuco	2021	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2815	Pimenta Bodinhho	<i>Capsicum chinense</i>	Pernambuco	2021	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2923	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	São Paulo	2009	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2924	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	São Paulo	2010	<i>Stemphylium lycopersici</i>
EH-2925	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	São Paulo	2010	<i>Stemphylium lycopersici</i>

Fim.

Tabela 4. Severidade da mancha de stemphylium em acessos selvagens e plantas cultivadas.

Espécies vegetais	Codigo do acesso	Índice da doença – ID* (%)					
		EH-2800			EH-2811		
Algodão Arbóreo	-	0,0	A	a	0,0	A	a
Feijão caupi	-	0,0	A	a	0,0	A	a
Feijão comum	-	0,0	A	a	0,0	A	a
Jurubebinha	(CNPH-0033)	0,0	A	a	0,0	A	a
Maria pretinha	-	0,0	A	a	0,0	A	a
Melancia	-	0,0	A	a	0,0	A	a
Jurubeba vermelha	(CNPH-0022)	43,8	A	d	43,8	A	b
Jurubeba vermelha	(CNPH-0021)	87,5	B	g	43,8	A	b
Jurubeba	(CNPH-0410)	0,0	A	a	50,0	B	b
Jurubeba	(CNPH-0409)	37,5	A	c	56,3	B	c
Lobeira	(CNPH-0324)	14,6	A	b	64,6	B	c
Batata	-	68,8	A	f	68,8	A	d
Manjerição	-	60,4	A	e	70,8	B	d
Figueira-brava	-	37,5	A	c	75,0	B	d
Pepino andino	-	43,8	A	d	75,0	B	d
Cajusara	(CNPH-0121)	100,0	B	h	75,0	A	d
Jiló	-	100,0	B	h	75,0	A	d
Lobeira	(CNPH-0326)	31,3	A	c	77,1	B	d
Saia-roxa	-	0,0	A	a	81,3	B	d
Jurubebão	(CNPH-0145)	56,3	A	e	87,5	B	e
Jurubebão	(CNPH-0151)	68,8	A	f	100,0	B	f
Cajusara	(CNPH-0128)	100,0	A	h	100,0	A	f
Tomate ‘Ponderosa’	(CNPH-0878)	100,0	A	h	100,0	A	f

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na vertical ou por letras minúsculas na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($p>0,05$). *Índice da doença (ID), proposto por McKinney (1923).

CAPÍTULO III

Prospecção assistida por marcadores moleculares de novas fontes de resistência ao fungo *Stemphylium lycopersici* em acessos de *Solanum* (*Lycopersicon*).



Prospecção assistida por marcadores moleculares de novas fontes de resistência ao fungo *Stemphylium lycopersici* em acessos de *Solanum* (*Lycopersicon*).

Tiago Bezerra Torres¹; David Nataren Perdomo¹; Cleberly Evangelista dos Santos²; Ailton Reis³; Leonardo Silva Boiteux^{1,2,3}; Maria Esther de Noronha Fonseca³

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife–PE, Brazil.

²Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Departamento de Fitopatologia, 70910-900, Brasília–DF, Brazil;

³National Center for Vegetable Crops Research (CNPH), Embrapa Vegetable Crops (Embrapa Hortaliças), 70275-970, Brasília–DF, Brazil.

Correspondence: leonardo.boiteux@embrapa.br.

ORCID: 0000-0002-5791-8002

Resumo

A mancha de stemphylium (causada por espécies de *Stemphylium*) é uma doença severa do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) em condições quentes e úmidas. A alternativa mais viável de controle tem sido a utilização de cultivares contendo o gene de resistência *Sm*. Esse gene tem sido empregado mundialmente desde a década de 1940, representando, portanto, uma enorme pressão de seleção a favor de variantes capazes de suplantar essa resistência. Visando antecipar essa potencial ameaça, 40 acessos de espécies silvestres de *Solanum* (*Lycopersicon*) foram inoculados com um isolado de *Stemphylium lycopersici* em busca de fontes alternativas de resistência. A cultivar ‘Ponderosa’ foi utilizada como padrão de suscetibilidade e a cultivar ‘Floradade’ (portadora do gene *Sm*) como padrão de resistência. Os valores médios de severidade da doença (15 dias após a inoculação) foram utilizados como critério de classificação dos acessos nas seguintes classes: imune, resistente, moderadamente resistente, suscetível e altamente suscetível. Concomitantemente, foram conduzidas análises via PCR empregando um marcador molecular específico para o locus *Sm*. Vinte e sete acessos foram detectados com níveis elevados de resistência nas espécies *S. habrochaites* (15), *S. peruvianum* (11) e *S. neorikii* (1). As análises moleculares indicaram que um subgrupo de acessos resistentes apresenta fatores genéticos distintos do locus *Sm*, indicando a presença de diferentes alelos ou genes. Do ponto de vista do melhoramento do tomateiro, esses novos acessos representam um valioso germoplasma para ampliar a base genética e a durabilidade da resistência via ‘piramidização’ de diferentes genes/alelos efetivos contra isolados de *S. lycopersici*.

Palavras-chave: mancha cinzenta do tomateiro, germoplasma, espécies silvestres, locus *Sm*

Abstract

Molecular marker-assisted search for new sources of *Stemphylium lycopersici* resistance in *Solanum (Lycopersicon)* accessions.

The gray leaf spot (caused by *Stemphylium* species) is a severe disease of tomatoes (*Solanum lycopersicum*) in warm and humid conditions. The most viable control alternative has been the use of cultivars containing the *Sm* resistance gene. This gene has been used worldwide since the 1940s, thus representing an enormous selection pressure in favor of variants capable of overcoming this resistance. In order to anticipate and find genetic solutions for this potential threat, 40 accessions of wild species of *Solanum (Lycopersicon)* were inoculated with an isolate of *Stemphylium lycopersici* in search for alternative sources of resistance. The cultivar ‘Ponderosa’ was used as a susceptibility standard and the cultivar ‘Floradade’ (carrying the *Sm* gene) was employed as a resistance standard. The mean values of disease severity (15 days after inoculation) were used as a criterion for classifying the accessions into the following classes: immune, resistant, moderately resistant, susceptible, and highly susceptible. Concomitantly, PCR analyzes were performed using one *Sm* locus-specific molecular marker. Twenty-seven accessions with high levels of resistance were detected, belonging to the species *S. habrochaites* (15), *S. peruvianum* (11), and *S. neorickii* (1). Molecular analyzes indicated that a subgroup of resistant accessions has genetic factors distinct from the *Sm* locus, indicating the presence of different alleles or genes. From the point of view of tomato breeding, these new accessions represent a valuable germplasm to expand the genetic base and the durability of resistance via ‘pyramidization’ of different genes/alleles effective against *S. lycopersici* isolates.

Keywords: tomato gray leaf spot, germplasm, wild species, locus *Sm*

Introdução

O cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), tanto em campo aberto quanto em condições protegidas, é uma importante fonte de emprego e renda em todos os elos dessa cadeia produtiva no Brasil (Boiteux & Fonseca, 2023). Conjuntamente, os segmentos de tomate para mercado *in natura* (mesa) e para processamento industrial asseguram ao Brasil a décima posição mundial perfazendo uma produção total de 3,7 milhões de toneladas em 51.960 hectares, correspondendo a uma produtividade de 72,24 tons/ha (FAOSTAT, 2020). Isoladamente, o segmento de tomate para consumo *in natura* envolve a participação de aproximadamente 48.700 propriedades rurais (63% da produção) espalhadas em todas as regiões do Brasil (Boteon et al., 2020). No entanto, a produção de tomate no país ainda é negativamente afetada por várias pragas e doenças.

Atualmente, mais de 200 pragas e doenças foram identificadas, reduzindo a produtividade e causando grandes prejuízos no cultivo do tomateiro (Blancard, 2012; Nowicki et al., 2013; Jones et al., 2016; Reis et al., 2021). No entanto, um subgrupo dessas doenças apresenta uma maior relevância em regiões tropicais e subtropicais quentes e úmidas, com especial destaque para a ‘mancha de stemphylium’ (Miranda et al., 2010; Blancard, 2012; Jones et al., 2016; Reis et al., 2021). A ‘mancha de stemphylium’ afeta principalmente as folhas mais jovens com os sintomas ocorrendo em ambas as faces foliares (Reis et al., 2021). As lesões aparecem, inicialmente, como pequenas manchas escuras, que aumentam e tornam-se marrom acinzentadas. Os centros das lesões mais velhas podem romper e se tornam quebradiças. As manchas podem coalescer causando seca e queda prematura das folhas e afetando qualidade e o rendimento dos frutos (Blancard, 2012; Jones et al., 2016).

A nível mundial, a ‘mancha de stemphylium’ do tomateiro tem sido atribuída a três espécies fúngicas do gênero *Stemphylium*: *S. solani* G.F. Weber, *S. lycopersici* (Enjoji) W. Yamam. (=

S. floridanum Hannon and G. F. Weber) e *S. botryosum* Wallr. (Blancard, 2012; Jones et al., 2016). No entanto, levantamentos nacionais reportados na presente tese indicaram que a espécie *S. lycopersici* é o agente causal predominante no tomateiro nas condições brasileiras (Torres et al., 2023; em preparação). Outros relatos também indicam a espécie *S. lycopersici* como estando amplamente distribuída em diferentes regiões da América do Sul (Franco et al., 2017a; Franco et al. A mancha de stemphylium é uma importante doença para o tomateiro, reduzindo o seu rendimento e causando sérios prejuízos. A utilização de fontes de resistência genética tem sido a medida de controle mais eficaz e ecologicamente correta para as doenças de plantas (Domingues et al., 2017). No caso da ‘mancha de stemphylium’, a alternativa mais viável de controle tem sido a utilização de cultivares contendo o gene de resistência *Sm* (Domingues et al., 2017). Este gene dominante foi introgridido de um acesso da espécie silvestre *S. pimpinellifolium* tem sido utilizado comercialmente desde a década de 1940 (Hendrix and Frazier, 1949) em diversas partes do mundo. Esse uso amplo e frequente do gene *Sm* gera um grande problema, pois variedades com resistência vertical representa uma considerável pressão de seleção para a emergência de novas raças fisiológicas virulentas (Rios and Debona, 2018).., 2017b).

O manejo preventivo e curativo emergencial da ‘mancha de stemphylium’ tem sido realizado via pulverizações de fungicidas, que aumentam os custos de produção e tem impactos negativos no meio ambiente (Melo et al., 2019; Bi et al., 2022). Além disso, os produtos químicos disponíveis para controle de espécies *Stemphylium* são escassos e o uso indiscriminado de determinados princípios ativos pode selecionar variantes mais tolerantes desses patógenos (Bi et al., 2022; Melo et al., 2019). Neste cenário, a alternativa mais viável de controle tem sido a utilização de cultivares contendo o gene de resistência *Sm* (Domingues et al., 2017). Este gene dominante foi introgridido de um acesso da espécie silvestre *S. pimpinellifolium*, sendo mapeado no cromossomo 11 do tomateiro (Behare, 1991; Yang et al.,

2022). Embora se observe uma baixa disponibilidade de cultivares resistentes no Brasil (Reis and Boiteux, 2006b), o gene *Sm* tem sido utilizado desde a década de 1940 (Hendrix and Frazier, 1949) em diversas partes do mundo. Esse amplo e prolongado uso do gene *Sm* representa uma enorme pressão de seleção a favor de variantes capazes de suplantar essa resistência. Visando prevenir essa potencial ameaça, 40 acessos de espécies silvestres de *Solanum* (*Lycopersicon*) foram inoculados com um isolado de *S. lycopersici* em busca de fontes alternativas de resistência.

Material e Métodos

Reação de acessos de espécies de *Solanum* (*Lycopersicon*) a um isolado *Stemphylium lycopersici* – O experimento foi realizado em casa de vegetação e laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças em Brasília–DF. Nesse experimento, foram avaliados 40 acessos de *Solanum* (*Lycopersicon*) da coleção de germoplasma da Embrapa Hortaliças (**Tabela 1**) um isolado *S. lycopersici*, obtido de planta de tomate (EH–2800). As cultivares de tomateiro ‘Ponderosa’ e ‘Santa Clara’ foram utilizadas como padrão de suscetibilidade, e ‘Floradade’ (resistente devido à presença do gene *Sm*) como resistência (Miranda et al., 2010). As sementes dos acessos de *Solanum* spp. foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial Bioplant® (Turfa de sphagnum, Fibra de coco, Casca de arroz, Casca de Pinus, Vermiculita, gesso agrícola, carbonato de cálcio, magnésio, termofosfato magnésiano (Yoorin) e aditivos (fertilizantes), pH de 6,2, condutividade elétrica (CE) de 0,7, densidade: 150 kg/m³ e capacidade de Retenção de Água – CRA de 100%), sob condições de casa de vegetação. Aos 25 dias após a germinação, as mudas foram transplantadas para vasos de 1 dm³ preenchidos com solo do cerrado esterilizado, corrigido e adubado.

Produção de inóculo – Conídios do isolado EH–2800 foram produzidos em placas de Petri contendo meio V8, com um disco de micélio de uma cultura pura do patógeno semeada no

centro de cada. As placas foram mantidas durante sete dias em Câmara Incubadora BOD, sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ em fotoperíodo de 12 horas de luz negra e 12 horas no escuro. Após sete dias, os conídios foram extraídos a partir da raspagem das colônias fúngicas em água com auxílio de um bisturi. A suspensão foi filtrada em gaze dupla e ajustada em câmara de Neubauer para a concentração do inóculo para 10^4 conídios/mL.

Metodologia de inoculação – Plantas foram inoculadas no estágio de dois a três pares de folhas verdadeira, essas foram aspergidas com a suspensão de conídios com o auxílio de um borrifador manual, até o ponto de escorrimento. As plantas inoculadas foram distribuídas em bancadas, na casa de vegetação, em desenho inteiramente casualizado com quatro repetições, cada repetição foi representada por um vaso com duas plantas. Os vasos foram irrigados e as bancadas foram cobertas com uma lona plástica transparente visando fornecer um microclima com alta umidade (câmara úmida) por 48 horas.

Avaliação da reação dos acessos de *Solanum (Lycopersicon)* – A reação dos acessos ao isolado de *S. lycopersici* foi caracterizada com base na severidade da doença foi avaliada 15 dias após a inoculação, visualmente quatro folhas compostas por planta, usando a escala de notas descritiva de 0 a 4 (Huang and Tsai, 2017): **Nota 0** = sem sintomas; **Nota 1** = 1–3 pontos; **Nota 2** = 4–6 pontos necróticos; **Nota 3** = 7 ou mais manchas foliares, mas sem coalescência de manchas; **Nota 4** = 7 ou mais manchas com coalescência de manchas. Com base nas notas obtidas, foi calculado o índice da doença (ID), através da fórmula de McKinney (1923), onde $\text{ID (\%)} = 100.S[(f.v)/(n.x)]$; sendo f = número de plantas com a mesma nota; v = nota observada; n = número total de plantas avaliadas e da escala. As médias das notas de severidade dos acessos foram utilizadas para classificação da resistência, em: **0** Imune (I); **1-1,9** Resistentes (R); **2-2,9** Moderadamente Resistentes (MD); **3-3,9** Suscetível (S) e **4** Altamente Suscetível (AS). Os dados de ID e as notas médias foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de agrupamentos de médias Scott-

Knott através do programa de análises estatísticas (SISVAR versão 4.2. DEX/UFLA, 2003).

Extração de DNA dos acessos resistentes – O DNA (ácido desoxirribonucleico) genômico de acessos resistentes foi extraído a partir de folhas jovens coletadas de cada indivíduo, segundo o método CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) com solventes orgânicos (Boiteux et al., 1999). Fragmentos pequeno foram subtraídos das folhas de cada acesso e transferido para tubos de Precellys® contendo seis esferas de aço inoxidável e acrescidos com 750 µL da solução de CTAB. O tecido vegetal foi macerado em dois ciclos de 30 segundos a 2000 rpm em homogeneizador rotativo (Precellys® – Bertin Technologies, França). Os tubos foram incubados em banho-maria a temperatura de 65°C por 10 minutos, após foram retirados e deixados em temperatura 25°C±2°C por 3 minutos. Em seguida, adicionados 750 µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico) e agitados em agitador de tubos tipo vórtex. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 9.000 rpm, e o sobrenadante transferido para um novo tubo e a este foi acrescentado 300 µL da solução de álcool isopropílico (isopropanol) para a precipitação do DNA. Esses foram agitados lentamente e em seguida centrifugados por 13 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado no tubo foi lavado com 600 µL de solução resfriada de etanol a 70% para a remoção dos resíduos e sais, este processo foi repetido duas vezes. Após lavado, os tubos com DNA precipitado foram secos em incubadora BOD por 20 min e ressuspensionado em 50 µL de tampão TE + solução de enzima que degrada RNA (RNase), sendo então deixados por 12 horas em um refrigerador com temperatura em torno de 5°C. Os DNAs genômicos dos acessos foram quantificados visualmente pelo método da eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM) a 100 V por 180 minutos à temperatura ambiente. Os DNAs foram corados usando Unisafe®, sendo revelados e fotografados no fotodocumentador L-Pix Touch Locus® (Locus do Brasil). A quantificação do DNA foi realizada em gel através da comparação com o DNA lambda diluídos em concentração

conhecidas de (20, 50, 100 e 200 ng). Após quantificação, as amostras tiveram a sua concentração ajustada para 20 ng/μL por diluição em tampão TE e verificada, novamente, por eletroforese em gel de agarose a 1% sob as condições especificadas acima.

Amplificação via PCR do segmento genômico contendo o gene *Sm* utilizando o marcador molecular Sm-InDel – As amplificações via PCR de um marcador molecular ligado ao gene *Sm* (Su et al., 2019) foram conduzidas usando DNA extraído de acessos resistentes (**Figura 2**) e contrastantes (Ponderosa e Floradade) ao *S. lycopersici*. Os ensaios de PCR foram efetuados usando o par de primers ‘Sm-InDel F’ (5’–CTA CAC TTT CTC GTT CCC AAT G–3’) e ‘Sm-InDel R’ (5’–ATC GCC AAA CCA ATC AAA TC–3’). O volume da reação de PCR utilizado para ambas as regiões foi de 12,5 μL contendo 3,0 μL de DNA genômico (10 ng), 1,25 μL do tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 0,75 μL de MgCl₂ (50 mM), 1,25 μL de cada dNTP (2,5 μM), 0,2 μL *Taq* DNA polimerase (5 U/μL), 0,5 μL de cada de primer, 5,05 μL de água milliQ. Os ensaios via PCR foram conduzidos em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems, São Paulo–SP) programado com os seguintes parâmetros: 32 ciclos de 94 °C por 30 segundos de desnaturação, 55 °C por 30 segundos de anelamento e 72 °C para extensão de 30 segundos. A desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos e a extensão final foi a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de agarose a 3% com tampão TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM) a 100 V por 180 minutos à temperatura ambiente, utilizando o corante Unisafe® sendo revelados e fotografados no fotodocumentador L-Pix Touch Locus® (Locus do Brasil).

Resultados

A análise de variância identificou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) do índice da doença (ID) e Notas médias da ‘mancha de stemphylium’ nos acessos de *Solanum* (*Lycopersicon*) avaliados. A cultivar ‘Ponderosa’ e ‘Santa Clara’ foram altamente suscetíveis, enquanto a

cultivar ‘Floradade’ foi imune, confirmando a virulência do isolado EH-2800 de *S. lycopersici*. Os acessos avaliados apresentaram reações de resistência e suscetibilidade a *S. lycopersici* (**Figura 1**). As médias de ID foram significativas para análise de variância e agrupadas pelo teste de médias de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), permitindo observar claramente a diferenciação dos acessos (**Tabela 2**).

De acordo com as médias de ID, os acessos formaram cinco grupos, sendo 22 acessos com valores variando entre 0 a 6%, seis acessos com valores variando entre 19 a 39%, três acessos entre 52 a 58 %, três acessos entre 67 a 73% e seis acessos (CNPH-0404, ‘Santa Clara’, CNPH-0102, CNPH-1522, CNPH-1022, ‘Ponderosa’) altamente suscetíveis com ID variando entre 80 a 100% (**Tabela 2**). As notas médias dos acessos também foram significativas para a análise de variância ($p \leq 0,05$). De acordo com os resultados do teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), os acessos foram agrupados e foi possível observar a diferenciação dos acessos em relação a doença. Os acessos foram classificados em cinco categorias de reação a mancha de stemphylium de acordo com a média das notas obtidas, sendo 19 acessos foram considerados ‘imunes’, oito acessos como ‘resistentes’, seis acessos como ‘moderadamente resistentes’, quatro acessos como ‘susceptíveis’ e um acesso (‘Ponderosa’) foi classificado como ‘altamente suscetível’ (**Tabela 3**).

Confirmação da presença do gene *Sm* dos acessos resistentes ao *Stemphylium lycopersici* via marcador molecular – Os acessos CNPH-0101, CNPH-0417, CNPH-0419, CNPH-0420, CNPH-0421, CNPH-0424, CNPH-0605, CNPH-0784, CNPH- 0787, CNPH-0928, CNPH-0929, CNPH-0934, CNPH-0937, CNPH-0940, CNPH-1034, CNPH-1112, CNPH-1122, CNPH-1290, CNPH-1453, CNPH-1463, CNPH-1464, CNPH-1467, CNPH-1761 e CNPH-1772 foram selecionados com base na reação ao fungo *S. lycopersici* e espécie botânica para identificação via PCR do locus *Sm* utilizando um primer específico para essa região. Os primers Sm-InDel foram capazes de gerar amplicons polimórficos para essa região entre os

diferentes acessos. A cultivar ‘Floradade’ (fonte do gene *Sm*) produziu um fragmento de $\approx$ 122 pb, enquanto ‘Ponderosa’ apresentou um fragmento maior ($\approx$ 140 pb) (**Figura 2**). Os acessos altamente resistentes de *S. habrochaites*, *S. peruvianum* e *S. pimpinellifolium* apresentaram polimorfismos diferentes de ‘Ponderosa’ e ‘Floradade’. A **Figura 3** mostra uma análise eletroforetica em gel da agarose de um subgrupo de acessos da espécie *S. habrochaites* (CNPH-0417, CNPH-0420, CNPH-929, CNPH-1772), *S. peruvianum* (CNPH-0101, CNPH-1034, CNPH-1463, CNPH-1761) e *S. pimpinellifolium* (CNPH-0787) e os padrões de resistência (‘Floradade’) e de suscetibilidade (‘Ponderosa’). Os fragmentos gerados foram diferentes dos padrões, demonstrando com um tamanho de banda maior que o esperado para o padrão de suscetibilidade (Yang et al. 2022).

Discussão

O presente estudo detectou 27 novas fontes de resistência a mancha de stemphylium causada por *S. lycopersici*, sendo em 15 acessos de *S. habrochaites*, 11 de *S. peruvianum* e um *S. neorickii* (CNPH-1761). Nos acessos da espécie *S. pimpinellifolium*, apesar de ser a fonte original do gene *Sm* (Hendrix & Frazier, 1949), os acessos CNPH-419 e apresentaram resistência parcial. Um número grande de acessos resistentes foi observado dentro das espécies *S. habrochaites* e *S. peruvianum*. Nossos resultados foram similares aos encontrados por Miranda et al. (2010), que avaliaram 109 acessos de tomateiro do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças quanto à resistência às espécies de *S. lycopersici* e *S. solani*, e identificaram 35 novas fontes de resistência a mancha de stemphylium. Algumas dessas fontes foram confirmadas no presente trabalho, incluindo os acessos *S. habrochaites* CNPH-0417, CNPH-928, CNPH-1112 e CNPH-1122 e os acessos de *S. peruvianum* CNPH-0784, CNPH-0934, CNPH-1453, CNPH-1464, CNPH-1465 e CNPH-1467.

O marcador *Sm-InDel* desenvolvido por (Su et al., 2019) confirmou a presença e a ausência

do gene *Sm*, como observado no acesso ‘Ponderosa’ e ‘Floradade’, mostrando ser uma boa ferramenta na identificação deste gene. No entanto, os acessos resistentes das outras espécies, incluindo um acesso da espécie relatada com fonte original do gene *Sm*, apresentaram comprimento de bandas distintas, aparentemente maior que a do acesso suscetível (‘Ponderosa’). Esse resultado leva a crer que seja um gene *Sm* diferente ou outro possível gene candidato de resistência ao fungo *S. lycopersici*.

A diversidade fenotípica é evidente em tomates cultivados, particularmente para características hortícolas, mas a diversidade genética é bastante estreita. Os principais genes de resistência a doenças para diferentes patógenos, como vírus, fungos, bactérias e nematóides, são derivados principalmente de espécies selvagens de tomate e introgridos em tomates cultivados. *S. habrochaites* e *S. peruvianum* estão entre as principais espécies que foram encontrados genes de resistência a doenças e pragas (Khazaei and Madduri, 2022). Os acessos dessas duas espécies de *Solanum* identificados como resistentes neste trabalho serão base para estudos moleculares visando a identificação do possível gene(s) candidato de resistência a mancha de stemphylium e utilizado na engenharia genética visando a resistência de plantas, ou inseridos em programas de melhoramento clássico visando na introgressão dessa característica (Thurow et al., 2018).

Conclusão

Foram detectados 27 acessos resistentes a mancha de stemphylium, sendo 15 da espécie *S. habrochaites*

(CNPH-0417, CNPH-0420, CNPH-0424, CNPH-0928, CNPH-0929, CNPH-1034, CNPH-1290, CNPH-1772, CNPH-1112, CNPH-0605, CNPH-1122, CNPH-1773, CNPH-1287, CNPH-0421 e CNPH-1288), 11 de *S. peruvianum* (CNPH-0101, CNPH-0784, CNPH-0787, CNPH-0934, CNPH-0937, CNPH-0940, CNPH-1453, CNPH-1463, CNPH-1465, CNPH-

1467 e CNPH-1464) e apenas um da espécie *S. neorikii* (CNPH-1761). Do ponto de vista do melhoramento do tomateiro, esses novos acessos representam um valioso germoplasma para ampliar a base genética e a durabilidade da resistência via ‘piramidização’ de diferentes genes/alelos efetivos contra isolados de *S. lycopersici*.

Referências

- Behare J, Laterrot, H, Sarfatti, M, and Zamir, D. (1991). Restriction Fragment Length Polymorphism mapping of the *Stemphylium* resistance gene in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 4: 489-492. <https://doi.org/10.1094/MPMI-4-489>
- Ben H, Huo J, Song C, Yao Y, Gao W, Wang W, Hao Y and Zhang X. (2021). *Stemphylium lycopersici* causing leaf spot of watermelon (*Citrullus lanatus*) in China. **Plant Disease** 105: 4157. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0990-PDN>
- Bentes JLS and Matsuoka K. (2005). Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. **Fitopatologia Brasileira** 303: 224–231. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000300002>
- Bi L, Xu J, Wang Q, Li T, Wang J, Zhou M, and Duan Y. (2022). Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Stemphylium solani* to fluxapyroxad. **Crop Protection** 156: 105944. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.105944>
- Blancard D. (2012). **Tomato Diseases. Identification, Biology and Control**. CRC Press. 688p <https://doi.org/10.1201/b15145>
- Boiteux LS and Fonseca MEN (2023). Tomate. In: Duarte J (Org.). **Brasil em 50 Alimentos**. 1ª ed., Brasília-DF: Embrapa/Teixeira Gráfica e Editora, 2023, v. 1, p. 296–301. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1153294/brasil-em-50-alimentos>
- Boiteux LS, Henz GP and Giordano LB. (1993). *Solanum lycocarpum*: A natural host of *Stemphylium solani*. **Plant Disease** 77: 846.
- Boiteux LS, Fonseca MEN and Simon PW. (1999). Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-based Genetic

- Fingerprinting Analysis in Carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, **124**: 32–38. <https://doi.org/10.21273/JASHS.124.1.32>
- Boteon M, Deleo JPB and Moreira MM. (2020). Tomaticultura em números. **Revista Hortifrúti Brasil**, 13–20. <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/especial-tomate-impactos-covid-19-nos-curto-e-medio-prazos.aspx>
- Cho HJ, Kim BS and Hwang HS. (2001). Resistance to Gray Leaf Spot in Capsicum Peppers, **HortScience**, **36**: 752-754. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.4.752>
- Cruz CD. (2016). Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy** **38**: 547-552.
- Dennett RK. (1950). The association of resistance to *Fusarium* wilt and *Stemphylium* leaf spot in tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science** **56**: 353-357.
- Devi M, Banyal DK, Anudeep B and Sinha D. (2021). Management of gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium lycopersici* under protected cultivation. **Plant Disease Research**, **36**: 154–160. <https://doi.org/10.5958/2249-8788.2021.00025.1>
- Domingues DP, Santos CA, Kowata-Dresch LS and Carmo MGF. (2017). Quantificação e progresso da mancha-de-estenfilio em cultivares de tomate sob manejo orgânico. **Caderno de Ciências Agrárias** **9**: 9–18.
- Dumin W, Han YK, Park JH, Han JW and Back CG. (2021). First report of leaf blight disease caused by *Stemphylium solani* on Welsh onion in Korea. **New Disease Reports** **43**: e12010. <https://doi.org/10.1002/ndr2.12010>
- Franco MEE, López SMY, Lucentini G, Troncozo MI, Saparrat MCN, Ronco BL and Balatti PA. (2017a). *Corynespora cassiicola* and *Stemphylium lycopersici* infection and disease development on tomatoes in Argentina. **Australasian Plant Disease Notes** **12**: 40. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0265-2>

- Franco MEE, Troncozo MI, López SMY, Lucentini G, Medina R, Saparrat MCN, Ronco L B and Balatti PA. (2017b). A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *Stemphylium lycopersici* representatives which were genetically diverse and differed in their virulence. **European Journal of Plant Pathology** **149**: 983–1000. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1248-z>
- Gebhardt C. (2016). The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. **Theoretical and Applied Genetics**, **129**: 2281–2294. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2804-1>
- Geisenberg C and Stewart K. (1986). Field crop management. In Atherton JG and Rudich J (Eds.) **The Tomato Crop: A scientific basis for improvement**. Springer Netherlands. p. 511–557 https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_13
- Hendrix J W and Frazier WA. (1949). **Studies on the inheritance of *Stemphylium* resistance in tomatoes**. Honolulu (HI): Hawaii Agricultural Experiment Station, University of Hawaii. 24 p. (Technical Bulletin; 8)
- Huang C-J, and Tsai, W-S. (2017). Occurrence and identification of *Stemphylium lycopersici* causing *Stemphylium* leaf spot disease on tomato in Taiwan. **European Journal of Plant Pathology**, **148**: 35–44. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1066-8>
- Jones JB, Zitter TA, Momol TM and Miller SA. (2016). **Compendium of Tomato Diseases and Pests, Second Edition**. The American Phytopathological Society, Saint Paul, 168.p <https://doi.org/10.1094/9780890544341>
- Khazaei H and Madduri A. (2022). The role of tomato wild relatives in breeding disease-free varieties. **Genetic Resources** **3**: 64–73. <https://doi.org/10.46265/GENRESJ.PSES6766>
- Li YT, Zhang WH, Wang YH, Zhang M, Guo HC, Gao C and Gao XL. (2019). First report of leaf and stem spot on common bean caused by *Stemphylium lycopersici* in China. **Plant Disease** **104**: 572. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1805-PDN>

- Liu H, Wang H, Zhong J, Lu X, Pan XT, Zhu HJ and Zhou Q. (2019). First report of *Stemphylium lycopersici* and *Stemphylium vesicarium* causing leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa*) in China. **Plant Disease** **103**: 2957. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1052-PDN>
- McKinney H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research** **26**: 195–217. <https://handle.nal.usda.gov/10113/IND43966679>
- Melo JC, Santos CA, Fernandes, MCA and Carmo MGF. (2019). Caldas alternativas e fungicidas no controle da mancha-de-estenfilio do tomateiro. **Agrarian** **12**: 16–23. <https://doi.org/10.30612/agrarian.v12i43.7101>
- Miranda BEC, Boiteux LS and Reis A. (2010). Identificação de genótipos do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) com resistência a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. **Horticultura Brasileira** **28**: 178–184. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000200007>
- Nasehi A, Kadir J-B, Nasr-Esfahani M, Abed-Ashtiani F, Wong M-Y, Rambe S-K and Golkhandan E. (2014). Analysis of genetic and virulence variability of *Stemphylium lycopersici* associated with leaf spot of vegetable crops. **European Journal of Plant Pathology** **140**: 261–273. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0460-3>
- Nishi N, Muta T, Ito Y, Nakamura M and Tsukiboshi T. (2009). Ray speck of chrysanthemum caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. **Journal of General Plant Pathology** **75**: 80–82. <https://doi.org/10.1007/s10327-008-0133-1>
- Nowicki M, Kozik EU and Foolad MR. (2013). Late Blight of Tomato. In **Translational Genomics for Crop Breeding**. John Wiley and Sons Ltd. p. 241–265. <https://doi.org/10.1002/9781118728475.ch13>
- Paterson AH, Damon S, Hewitt JD, Zamir D, Rabinowitch HD, Lincoln SE, Lander ES and Tanksley SD. (1991). Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. **Genetics** **127**: 81–197.

<https://doi.org/10.1093/genetics/127.1.181>

Pereira-Carvalho RC, Boiteux LS, Fonseca MEN, Díaz-Pendón JA, Moriones E, Fernández-Muñoz R, Charchar JM and Resende RO. (2010). Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum* (*Lycopersicon*) accessions. **Plant Disease** **94**: 179–185. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0179>

Reis A and Boiteux LS. (2006a). Mancha-de-estenfilio: Ressurgimento de um antigo problema do tomateiro. **Embrapa Hortaliças. Circular Técnica** **41**. 8.p.

Reis A and Boiteux LS. (2006b). Resistência de acessos de *Lycopersicon* a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. *Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* **22**. 13.p.

Reis A, Lourenço JV and Lopes CA. (2021). Doenças causadas por fungos e oomicetos. In Lopes CA **Doenças do tomateiro: Vol. 3ª Edição** (eds). Embrapa Hortaliça, Brasília, p. 23–69. www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Rios JA and Debona D. (2018). Efeito epidemiológico da resistência de hospedeiro. In Monteiro AL, Danelli A, Pereira A, Castro C, Debona D, Dianese É, Rodrigues F, Ferraz H, Filho J, Maciel J, Rios J, Badel JL, Thurow LB, Guimarães LM, Eiras M, Ceresini PC, Möller PA and Pereira-Carvalho R. C. (Eds.), **Resistência Genética De Plantas A Patógeno**. UFPel, Pelotas, RS, p. 1–437.

Su X, Zhu G, Huang Z, Wang X, Guo Y, Li B, Du Y, Yang W and Gao J. (2019). Fine mapping and molecular marker development of the *Sm* gene conferring resistance to gray leaf spot (*Stemphylium* spp.) in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, **132**: 871–882. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3242-z>

Sun X-T, Zhang L, Zhang J-Z and Lu G. (2016). First Report of Tomato Gray Leaf Spot Caused by *Stemphylium lycopersici* in Zhejiang Province, China. **Plant Disease** **100**: 227–227. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0615-PDN>

Thurrow LB, Castro C and Pereira A. (2018). Melhoramento de plantas visando à resistência a patógenos. In Monteiro AL, Danelli A, Pereira A, Castro C, Debona D, Dianese É, Rodrigues F, Ferraz H, Filho J, Maciel J, Rios J, Badel JL, Thurrow LB, Guimarães LM, Eiras M, Ceresini PC, Möller PA and Pereira-Carvalho R. C. (Eds.), **Resistência Genética De Plantas A Patógeno**. UFPel, Pelotas, RS, p. 65–93.

Tomioka, K and Sato T. (2011). Fruit rot of sweet pepper caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. **Journal of General Plant Pathology** 77: 342–344. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0337-7>

Tomioka K, Abe D, Kawaguchi A, Kawakami A, Masunaka A, Mori S, Nomiyama K and Sekiguchi H. (2021). Stemphylium leaf spot of asparagus caused by *Stemphylium lycopersici*. **Journal of General Plant Pathology** 87: 51–54. <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00968-6>

van Loon LC, Rep M and Pieterse CMJ. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology** 44: 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>

Yang HH, Xu XY, Zhao TT, Jiang JB, Liu G and Li JF. (2017). First report of *Stemphylium lycopersici* causing gray leaf spot on eggplant in China. **Plant Disease** 101: 834. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1343-PDN>

Yang H, Zhao T, Jiang J, Chen X, Zhang H, Liu G, Zhang D, Du C, Wang S, Xu X and Li J. (2017). Transcriptome analysis of the *Sm*-mediated hypersensitive response to *Stemphylium lycopersici* in tomato. **Frontiers in Plant Science** 8: 1257. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01257>

Yang H, Li Y, He Y, Sun Y, Jiang J, Zhao T, Zhang H, Xu X and Li J. (2020). First report of *Stemphylium lycopersici* causing gray leaf spot on physali (*Physalis alkekengi*) in China. **Plant Disease** 104: 2725–2725. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2231-PDN>

Tabela 1 – Acessos de *Solanum* (*Lycopersicon*) avaliados para resistência a *Stemphylium lycopersici*.

accession	<i>Solanum</i> species	Original name
CNPH-0010	<i>Solanum lycopersicum</i>	‘Floradade’ (Sm gene)
CNPH-0101	<i>Solanum peruvianum</i>	PI 306811-67-N-4
CNPH-0102	<i>Solanum peruvianum</i>	PI 126408-6
CNPH-0404	<i>Solanum lycopersicum</i>	‘Severianin’
CNPH-0417	<i>Solanum habrochaites</i>	PI 126449
CNPH-0419	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	PI 126931
CNPH-0420	<i>Solanum habrochaites</i>	PI 127826
CNPH-0421	<i>Solanum habrochaites</i>	PI 127827
CNPH-0423	<i>Solanum habrochaites</i>	PI 134417
CNPH-0424	<i>Solanum habrochaites</i>	PI 134418
CNPH-0605	<i>Solanum habrochaites</i>	WIR 3611
CNPH-0784	<i>Solanum peruvianum</i>	CGO 6711
CNPH-0787	<i>Solanum peruvianum</i>	CGO 6714
CNPH-0878	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ponderosa
CNPH-0928	<i>Solanum habrochaites</i>	WYR 3951
CNPH-0929	<i>Solanum habrochaites</i>	WYR 7924
CNPH-0934	<i>Solanum peruvianum</i>	WYR 2020
CNPH-0937	<i>Solanum peruvianum</i>	LA 385
CNPH-0940	<i>Solanum peruvianum</i>	LA 1113-3
CNPH-1022	<i>Solanum chmielewskii</i>	CNPH-1022
CNPH-1034	<i>Solanum habrochaites</i>	CNPH-1034
CNPH-1112	<i>Solanum habrochaites</i>	CNPH-1112
CNPH-1121	<i>Solanum habrochaites</i>	L 03683
CNPH-1122	<i>Solanum habrochaites</i>	L 03684
CNPH-1123	<i>Solanum peruvianum</i>	L 03707
CNPH-1287	<i>Solanum habrochaites</i>	PI 126445
CNPH-1288	<i>Solanum habrochaites</i>	PI 247087
CNPH-1290	<i>Solanum habrochaites</i>	PI 126449
CNPH-1410	<i>Solanum habrochaites</i>	CNPH-1410
CNPH-1453	<i>Solanum peruvianum</i>	LA 1626
CNPH-1463	<i>Solanum peruvianum</i>	LA 2152
CNPH-1464	<i>Solanum peruvianum</i>	LA 2157
CNPH-1465	<i>Solanum peruvianum</i>	LA 2163
CNPH-1467	<i>Solanum peruvianum</i>	LA 2185

CNPH-1522	<i>Solanum lycopersicum</i>	LA 3047
CNPH-1739	<i>Solanum habrochaites</i>	LA 2976 (PE-41)
CNPH-1761	<i>Solanum neorickii</i>	LA 0247
CNPH-1772	<i>Solanum habrochaites</i>	PI 251304 (= LA 0407)
CNPH-1773	<i>Solanum habrochaites</i>	PI 365934 (= LA 1353)
‘Santa Clara’	<i>Solanum lycopersicum</i>	Topseed

Tabela 2 – Resultados do índice da doença (ID) dos acessos de espécies de *Solanum* testados para *S. lycopersici*.

Acessos	Espécie	ID (%)		Acessos	Espécie	ID (%)	
CNPH-0010	<i>S. lycopersicum</i>	0	a	CNPH-1112	<i>S. habrochaites</i>	6	a
CNPH-0101	<i>S. peruvianum</i>	0	a	CNPH-1464	<i>S. peruvianum</i>	6	a
CNPH-0417	<i>S. habrochaites</i>	0	a	CNPH-0605	<i>S. habrochaites</i>	19	b
CNPH-0420	<i>S. habrochaites</i>	0	a	CNPH-1122	<i>S. habrochaites</i>	25	b
CNPH-0424	<i>S. habrochaites</i>	0	a	CNPH-1773	<i>S. habrochaites</i>	28	b
CNPH-0784	<i>S. peruvianum</i>	0	a	CNPH-1287	<i>S. habrochaites</i>	33	b
CNPH-0787	<i>S. peruvianum</i>	0	a	CNPH-0421	<i>S. habrochaites</i>	34	b
CNPH-0928	<i>S. habrochaites</i>	0	a	CNPH-1288	<i>S. habrochaites</i>	39	b
CNPH-0929	<i>S. habrochaites</i>	0	a	CNPH-1410	<i>S. habrochaites</i>	52	c
CNPH-0934	<i>S. peruvianum</i>	0	a	CNPH-1121	<i>S. habrochaites</i>	53	c
CNPH-0937	<i>S. peruvianum</i>	0	a	CNPH-0423	<i>S. habrochaites</i>	58	c
CNPH-0940	<i>S. peruvianum</i>	0	a	CNPH-0419	<i>S. pimpinellifolium</i>	67	d
CNPH-1034	<i>S. habrochaites</i>	0	a	CNPH-1739	<i>S. habrochaites</i>	69	d
CNPH-1290	<i>S. habrochaites</i>	0	a	CNPH-1123	<i>S. peruvianum</i>	73	d
CNPH-1453	<i>S. peruvianum</i>	0	a	CNPH-0404	<i>S. lycopersicum</i>	80	e
CNPH-1463	<i>S. peruvianum</i>	0	a	Santa Clara	<i>S. lycopersicum</i>	81	e
CNPH-1465	<i>S. peruvianum</i>	0	a	CNPH-0102	<i>S. peruvianum</i>	86	e
CNPH-1467	<i>S. peruvianum</i>	0	a	CNPH-1522	<i>S. lycopersicum</i>	88	e
CNPH-1761	<i>S. neorickii</i>	0	a	CNPH-1022	<i>S. chmielewskii</i>	89	e
CNPH-1772	<i>S. habrochaites</i>	0	a	CNPH-0878	<i>S. lycopersicum</i>	100	e
CV (%) = 38,6							

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott (p>0,05).

Tabela 3 – Classificação da reação de acordo com as notas médias de severidade da doença induzida por um isolado de *Stemphylium lycopersicum* em acessos de espécies de *Solanum* (*Lycopersicon*).

Acessos	Notas médias	Classificação	Acessos	Notas médias	Classificação
CNPH-1034	0 a	I	CNPH-1112	0,3 a	R
CNPH-1290	0 a	I	CNPH-1464	0,3 a	R
CNPH-1761	0 a	I	CNPH-0605	0,8 b	R
CNPH-1772	0 a	I	CNPH-1122	1,0 b	R
CNPH-0417	0 a	I	CNPH-1773	1,1 b	R
CNPH-0420	0 a	I	CNPH-1287	1,3 c	R
CNPH-0424	0 a	I	CNPH-0421	1,4 c	R
CNPH-0787	0 a	I	CNPH-1288	1,6 c	R
CNPH-0928	0 a	I	CNPH-1410	2,1 d	MD
CNPH-0929	0 a	I	CNPH-1121	2,1 d	MD
CNPH-0101	0 a	I	CNPH-0423	2,3 d	MD
CNPH-0784	0 a	I	CNPH-0419	2,7 e	MD
CNPH-0934	0 a	I	CNPH-1739	2,8 e	MD
CNPH-0937	0 a	I	CNPH-1123	2,9 e	MD
CNPH-0940	0 a	I	CNPH-0404	3,2 e	S
CNPH-1453	0 a	I	Santa Clara	3,3 e	S
CNPH-1463	0 a	I	CNPH-0102	3,4 e	S
CNPH-1465	0 a	I	CNPH-1522	3,5 e	S
CNPH-1467	0 a	I	CNPH-1022	3,6 e	S
Floradade	0 a	I	Ponderosa	4,0 e	AS
CV (%) = 10,88					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($p>0,05$).

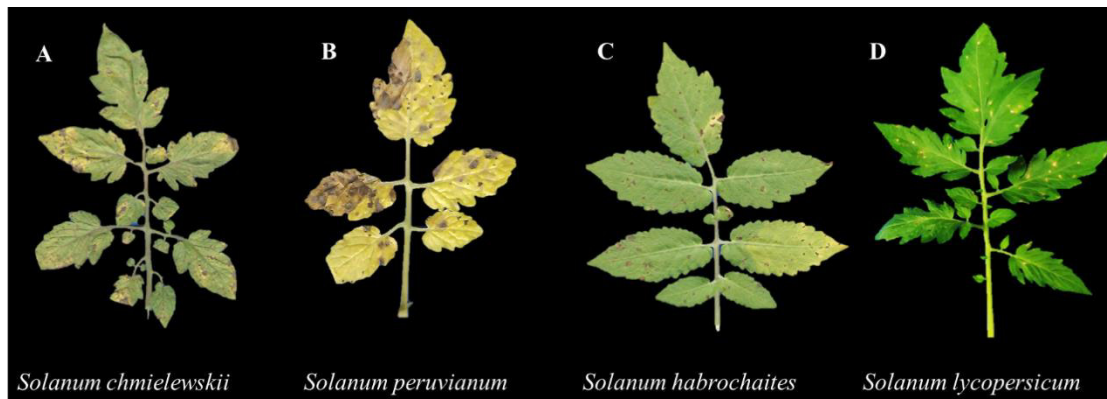


Figura 1 – Sintomas de mancha de stemphylium em diferentes espécies do gênero *Solanum* (*Lycopersicon*) inoculadas por *Stemphylium lycopersici*.

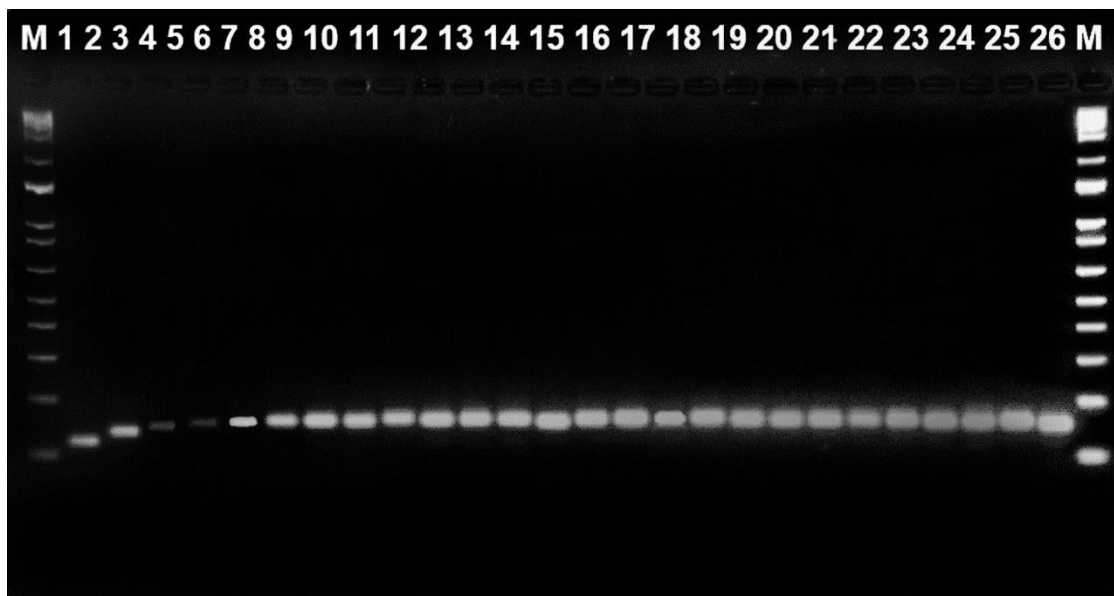


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose a 3% dos fragmentos de PCR amplificados usando o marcador Sm-InDel, ligado ao locus *Sm* no cromossomo 11 do tomateiro (Su et al., 2019) em uma coleção de acessos suscetíveis e resistentes ao fungo *Stemphylium lycopersici*. M= 1Kb-plus, 1 = ‘Floradade’ (fonte homozigota do gene *Sm*), 2 = ‘Ponderosa’ (suscetível = *sm/sm*), 3 = CNPH-0101 (imune), 4 = CNPH-0417 (imune), 5 = CNPH-0419 (moderadamente resistente), 6 = CNPH-0420 (imune), 7 = CNPH-0421(resistente), 8 = CNPH-0424 (imune), 9 = CNPH-0605 (resistente), 10 = CNPH-0784 (imune), 11 = CNPH-0787 (imune), 12 = CNPH-0928 (imune), 13 = CNPH-0929 (imune), 14 = CNPH-0934 (imune), 15 = CNPH-0937 (imune), 16 = CNPH-0940 (imune), 17 = CNPH-1034 (imune), 18 = CNPH-1112 (resistente), 19 = CNPH-1122 (resistente), 20 = CNPH-1290 (imune), 21 = CNPH-1453 (imune), 22 = CNPH-1463 (imune), 23 CNPH-1464 (resistente), 24 = CNPH-1467 (imune), 25 = CNPH-1761 (imune) e 26 = CNPH-1772 (imune). Fragmentos de 122 pb presentes em acessos contendo o gene/locus original *Sm* e um fragmento de 140 pb para alelos desprovidos do gene/locus *Sm*.

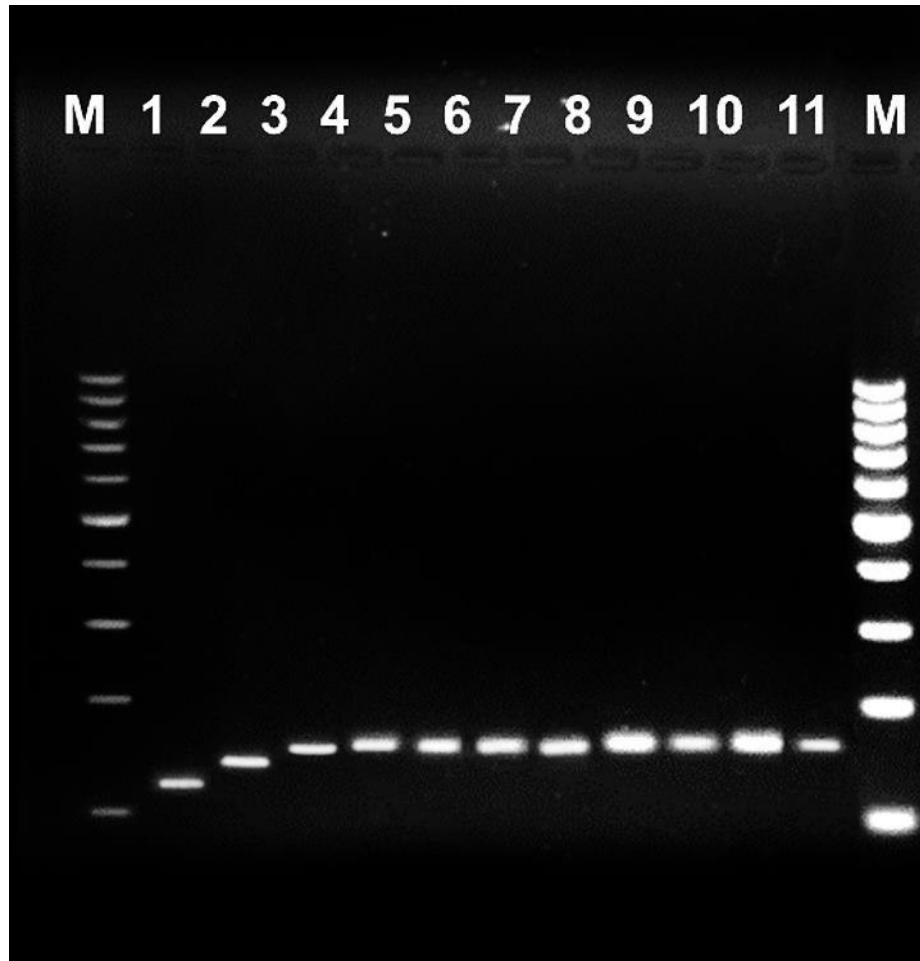
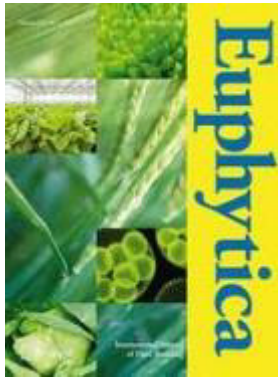


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose a 3% dos fragmentos de PCR amplificados usando o marcador Sm-InDel, ligado ao locus *Sm* no cromossomo 11 do tomateiro (Su et al., 2019) em uma coleção de acessos suscetíveis e resistentes ao fungo *Stemphylium lycopersici*. M= 1Kb, 1= ‘Floradade’ (fonte homozigota do gene *Sm*), 2= ‘Ponderosa’ (suscetível = *sm/sm*); 3= CNPH-0417, 4= CNPH-0420, 5= CNPH-929, 6= CNPH-1772, 7= CNPH-0101, 8= CNPH-1034, 9= CNPH-1463, 10= CNPH-1761, 11= CNPH-0787. Fragmentos de 122 pb presentes em acessos contendo o gene/locus original *Sm* e um fragmento de 140 pb para alelos desprovidos do gene/locus *Sm*.

CAPÍTULO IV

An epistatic inheritance model for resistance to *Stemphylium lycopersici* in *Solanum habrochaites* ‘PI-127827’ involving two complementary dominant genes.



An epistatic inheritance model for resistance to *Stemphylium lycopersici* in *Solanum habrochaites* ‘PI-127827’ involving two complementary dominant genes.

Tiago B. Torres¹; David N. Perdomo¹; Cleberly E. Santos²; Ailton Reis^{1,2}; Maria Esther N. Fonseca³ & Leonardo S. Boiteux^{1,2,3}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife–PE, Brazil.

²Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Departamento de Fitopatologia, 70910-900, Brasília–DF, Brazil.

³National Center for Vegetable Crops Research (CNPH), Embrapa Vegetable Crops (Embrapa Hortaliças), 70275-970, Brasília–DF, Brazil.

Correspondence: leonardo.boiteux@embrapa.br.

ORCID: 0000-0002-5791-8002

Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) production is severely affected by *Stemphylium* species in warm and humid tropical conditions. Fungicide application is the main control strategy, but it is not effective during rainy days and their continual use may select tolerant pathogen variants. In this scenario, the employment of *Sm* gene-carrying cultivars is the most sustainable control strategy. This large-spectrum resistance gene derived from *S. pimpinellifolium* has been effectively used since the late 1940s. However, alternative breeding sources must be available in case of potential *Sm*-gene ‘breakdown’. *Solanum habrochaites* ‘PI-127827’ was detected as a novel source of *Stemphylium* resistance. However, no genetic information is available about this genetic source. Here, we employed the susceptible cultivar ‘Ponderosa’ as female parent in interspecific crosses with ‘PI-127827’. Thirty contrasting parents, 30 F₁, and 250 F₂ plants were inoculated with a *S. lycopersici* isolate. Plants were evaluated using a symptom severity scale. ‘Ponderosa’ displayed a highly susceptible reaction, whereas ‘PI-127827’ plants were asymptomatic. All F₁ plants displayed resistant reactions similar to ‘PI-127827’, indicating a dominant control with high penetrance and lack of gene dosage-dependence. The F₂ generation displayed 204:131 (resistant:susceptible) plants. Chi-square goodness-of-fit test of the F₂ segregating frequency best conformed to a 9:7 ratio, indicating two independent and complementary dominant genes. Expression of the resistant phenotype might occur only with both dominant genes in either homozygous or heterozygous condition. We tentatively named these two loci as *Stemphylium resistance 2* (*Sm2*) and 3 (*Sm3*). This simple inheritance may facilitate the introgression of this trait into elite tomato breeding lines.

Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is the most consumed vegetable in the world and can be grown across many geographic areas under outdoor or indoor conditions (Geisenberg & Stewart, 1986; Gebhardt, 2016). The total tomato area in Brazil is around 52000 hectares with an average yield of 72.24 tons per hectare (FAOSTAT, 2020). Fresh-market tomato production comprises around 48000 farms, corresponding to 63% of the total crop production in Brazil (Boteon et al., 2020). However, tomato crop may suffer severe yield losses in subtropical and tropical conditions by more than 200 pests and pathogens, including fungi and oomycetes (Blancard, 2012; Jones et al., 2016; Nowicki et al., 2013).

Gray leaf spot is one of the main foliar diseases of tomato in the Neotropics (Reis et al., 2021). This disease is mainly caused by two species of the genus *Stemphylium*: *S. solani* G. F. Weber (1930) and *S. lycopersici* (Enjoji) W. Yamam (1960). The disease is very important mainly under open-field conditions in regions with warm and humid climates (Devi et al., 2021). Symptoms appear on apical leaves, showing depressed grayish to dark brown spots in the initial stages, which might rapidly evolve to complete defoliation in susceptible cultivars under environmental conditions favorable to the pathogen (Bentes & Matsuoka, 2005; Franco, López, et al., 2017; Huang & Tsai, 2017; Sun et al., 2016). *Stemphylium lycopersici* and *S. solani* have been reported infecting a wide array of crops, weeds, and native flora, including tomato, eggplant (*S. melongena*), hot-peppers (*Capsicum chinense* and *C. frutescens*), bell pepper (*C. annuum*), lettuce (*Lactuca sativa*), *Physalis alkekengi*, asparagus (*Asparagus officinalis*), *Chrysanthemum* cultivars as well as other spiny *Solanum* species (Boiteux et al., 1993; Cho et al., 2001; Nasehi et al., 2014; Nishi et al., 2009; Reis & Boiteux, 2006b; Tomioka et al., 2021; Tomioka & Sato, 2011; Yang et al., 2020; Yang et al., 2017). *Stemphylium lycopersici* is most studied causal agent and genetic and virulence variability of the fungus have been observed across isolates from different host plants (Franco et al., 2017; Nasehi et al., 2014).

The control of *Stemphylium* species has been done via fungicide applications, but this strategy might not be effective during rainy and warm days, which corresponds to the most critical period of disease onset and progression (Reis & Boiteux, 2006b). In addition, the continuous use of a few fungistatic molecules might give rise to tolerant pathogen strains (Bi et al., 2022; Melo et al., 2019). In this scenario, the employment of *Sm* gene-carrying cultivars is the most sustainable control strategy (Reis & Boiteux, 2006b). The large-spectrum *Sm* gene is derived from the wild tomato species *S. pimpinellifolium* and it confers resistance to all *Stemphylium* species (Behare et al., 1991). The *Sm* gene has been effectively used since the late 1940s (Hendrix & Frazier, 1949). This

long use of a vertical resistance gene such as *Sm* poses a risk since this type of genetic factor exerts strong selection pressure in favor of new virulent races (Rios & Debona, 2018). Therefore, alternative genetic sources must be available in case of potential *Sm* ‘breakdown’.

Solanum habrochaites ‘PI-127827’ was detected as a novel source of *Stemphylium* resistance (see Chapter 3). From the breeding standpoint, elucidating the inheritance pattern of a given trait facilitates its incorporation into elite cultivars. However, inheritance studies of resistance to *Stemphylium* species in *S. habrochaites* accessions are yet incipient. Here, biparental crosses and controlled inoculation assays were carried out to determine the genetic basis of resistance to *S. lycopersici* in *S. habrochaites* ‘PI-127827’. This information will facilitate the incorporation of these genetic factors into commercial tomato cultivars.

Material and Methods

Contrasting parental accessions for reaction to *Stemphylium lycopersici* and controlled interspecific crosses

– Two contrasting *Solanum* (section *Lycopersicon*) accessions were used as parental materials to investigate the genetic basis of resistance to *S. lycopersici*. *Solanum habrochaites* ‘PI-127827’ was employed as the resistant male parent (= pollen donor). The heirloom cultivar ‘Ponderosa’ was employed as the susceptible female parent. Controlled crosses to produce the corresponding F₁ and F₂ generations were carried out under greenhouse conditions. Reciprocal crosses were not done due to unilateral incompatibility when using *S. habrochaites* as female parent and *S. lycopersicum* as male parent (Broz et al., 2021). A single F₁ was arbitrarily chosen to generate the F₂ population.

Evaluation of the inheritance of resistance to *Stemphylium lycopersici* – The first experiment was conducted in a greenhouse using 30 F₁ plants (‘Ponderosa’ x ‘PI-127827’), 30 plants from each contrasting parent and 250 F₂ plants (resulting from self-fertilization of a single F₁ plant). Seeds were sown in trays of 128 cells containing sterilized substrate (Plantmax®) and kept in a greenhouse at room temperature (25°C ± 2°) and two daily irrigations (one in the morning and one in the afternoon). After 25 days of sowing, the seedlings with two to three pairs of true leaves were transplanted into 1L pots containing a mixture of clay, cattle manure, sand, and sterile burned rice straw. The pots were distributed on benches under greenhouse conditions. Soon after, the leaves of the seedlings were sprayed with a suspension adjusted to 10⁴ conidia. mL⁻¹ of the *S. lycopersici* isolate with the aid of a manual sprayer up to the point of runoff. The benches with the inoculated seedlings were wrapped in a transparent plastic cover for 48 hours, aiming to create a high humidity condition (humid chamber).

The reaction of the two composite leaves per plant was evaluated (15 days after inoculation) per each individual plant based on a descriptive symptom severity rating scale, ranging from 0 to 4 (Huang & Tsai, 2017), where **0** = no symptoms; **1** = one to three necrotic spots; **2** = four to six necrotic spots; **3** = seven or more spots, but with no coalescence of spots; **4** = seven or more spots with coalescence of spots. The averages of the severity scores were used to classify the resistance vs. susceptibility.

Evaluation of the segregating population and statistical analysis – The evaluation of was performed based upon the phenotypic classes of reaction to *S. lycopersici*. Segregation ratios of resistant (R) and susceptible (S) reactions were subjected to chi-square test to find out the goodness of fit to different classical Mendelian ratios with the assumed phenotypic ratios of F₂. Based on the phenotypic data obtained in the F₁ and F₂ generations, 22 hypotheses were tested: one gene (3:1 and 1:3), two genes (15:1, 13:3, 7:9, 9:7, 3:13, and 1:15) and three genes (63:1, 61:3, 55:9, 37:27, 27:37, 9:55, 3:61, 1:63, 57:7, 51:13, 49:15, 43:21, 25:39, and 19:45). The statistical analyses were performed using the software package GENES (Cruz, 2016).

Results

Bona-fide F₁ individuals were obtained after controlled crossings between ‘Ponderosa’ (♀) x ‘PI-127827’ (♂) as confirmed by the expression of mixed morphological traits of *S. lycopersicum* and *S. habrochaites* the in F₁ individuals (**Figure 1**). According to the results obtained after inoculation with the *S. lycopersici* isolate ‘EH-2800’, all 30 ‘Ponderosa’ plants displayed severe symptoms (grades ≥ 3), confirming the virulence of the isolate (**Figure 2**). On the other hand, all 30 inoculated *S. habrochaites* ‘PI 127827’ plants were free of symptoms (grades ≤ 2) (**Table 1**). The resistant phenotype of ‘PI 127827’ is not an immune-like as conferred by the *Sm* gene from *S. pimpinellifolium* (Hendrix & Frazier, 1949; Yang et al., 2017).

The resistance of ‘PI-127827’ was characterized by small lesions restricted to the initial infection sites similar to a hypersensitive response. The F₁ progeny displayed a resistant response similarly to the resistant parent 30 plants remaining only with tiny lesions. This resistant reaction of the F₁ generation indicated a dominant control with high levels of penetrance and no gene dosage-dependent reaction. In addition, we could also exclude the action of cytoplasmic factors in the expression of the resistance since reciprocal crosses were not done due to unilateral incompatibility when using *S. habrochaites* as female parent. Chi-square goodness-of-fit test of the F₂ segregating frequency best conformed to a 9:7 ratio, indicating two independent and complementary dominant genes (**Table 2**).

Discussion

The genetic diversity of the cultivated tomato can be increased via introgression of disease resistance genes from wild *Solanum* (*Lycopersicon*) species (Khazaei & Madduri, 2022). *Solanum habrochaites* ‘PI 127827’ is an outstanding source of resistance to a wide array of tomato pathogens, including tomato severe rugose mosaic begomovirus (Pereira-Carvalho et al., 2010), tomato chlorosis crinivirus (González-Arcos et al. 2018), pepper yellow mosaic virus (Dianese et al., 2008), and *Phytophthora capsici* (Goncalves-Pereira, 2023). Previous results also indicated accession ‘PI 127827’ as a potential donor of resistance to the fungus *S. lycopersici* (Reis & Boiteux, 2006b; Miranda et al., 2010).

Here, the high levels of resistance to *S. lycopersici* derived from ‘PI 127827’ were also confirmed in all plants of the F₁ population and in individual plants of the F₂ generation. According to the Chi-square goodness-of-fit test, the F₂ segregating frequency best conformed to a 9:7 ratio, indicating the involvement of two independent and complementary dominant genes. The slight excess of resistant plants might be due to either sampling size or some levels of segregation distortion, which is often reported in interspecific crosses between tomato species (Gadish & Zamir, 1986; Paterson et al., 1991). Due to the previously description of the gene *Sm* (Hendrix & Frazier, 1949), we tentatively named these two novel loci as *Stemphylium resistance 2* (*Sm2*) and *Stemphylium lycopersici 3* (*Sm3*). In our model, expression of the resistant phenotype might occur with both dominant genes in heterozygous condition. Susceptibility will be expressed only in the double recessive phenotype *sm2sm2/sm3sm3* as well as in the double recessive in each locus (*Sm2_/_sm3sm3* or *sm2sm2/ Sm3_*).

Gray spot is one of the main quality and yield-reducing foliar diseases in tomato (Devi et al., 2021; Domingues et al., 2017). The management of *S. lycopersici* has been done mainly by chemical control, but this strategy is often ineffective and might increase the emergence of fungicide-tolerant variants of the pathogen (Reis & Boiteux, 2006b; Bi et al., 2022; Melo et al., 2019). In this scenario, the employment of *Sm* gene-carrying cultivars has the most sustainable control strategy (Reis & Boiteux, 2006b). The *Sm* gene has been effectively used since the late 1940s (Hendrix & Frazier, 1949). In Brazil, there are a large number of cultivars with the *Sm* gene (Reis & Boiteux, 2006b). This wide use of a vertical resistance gene (*sensu* Vanderplank, 1984) such as *Sm* poses a risk since this type of genetic factor exerts strong selection pressure in favor of new virulent races (Rios & Debona, 2018). Therefore, *Sm2* and *Sm3* genes reported here might be employed as alternative resistance genes for breeding purposes in the case of the emergence of potential pathotypes able to breakdown the *Sm*-gene resistance.

The resistance characterized in accession ‘PI-127827’ is not of an immune-like reaction, thus differing from the response observed in tomato cultivars containing the introgressed *Sm* gene of the wild species *S. pimpinellifolium* (Hendrix & Frazier, 1949; Yang et al., 2017). The phenotypic expression in accession ‘PI 127827’ is characterized by a partial resistance that limits or restricts the establishment of the pathogen, reducing the expression of the disease. Some morphological characteristics such as the diversity of trichomes observed in the leaf tissue of ‘PI 127827’ may be related to the reduction of the disease or if the resistance is controlled by a distinct set of R-genes similar to the *Sm*-gene (Su et al. 2019; Yang et al. 2022).

The large-spectrum *Sm* gene is derived from the wild tomato species *Solanum pimpinellifolium* and confers resistance to all *Stemphylium* species (Behare et al., 1991). It will be necessary to carry out additional inheritance studies with *S. solani* isolates aiming to verify if the *Sm2* and *Sm3* genes are also effective against this pathogen. The F₃ families derived from this population can be used for the analyses and they can also be used in the introgression of the resistance characteristics found for *S. lycopersici* in the production of new resistant cultivars.

In summary, inheritance studies for *S. lycopersici* resistance in *S. habrochaites* ‘PI-127827’ indicated the involvement of two novel independent and complementary dominant genes. This simple inheritance may facilitate the introgression of this trait in commercial breeding programs. The resistance found here can be characterized by means of histopathological and/or via molecular techniques, allowing a more precise identification of these characteristics to be incorporated into new cultivars or varieties of tomatoes.

References

- Behare J, Laterrot H, Sarfatti M, Zamir D (1991) Restriction Fragment Length Polymorphism mapping of the *Stemphylium* resistance gene in tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 489-492. <https://doi.org/10.1094/MPMI-4-489>
- Bentes JLS, Matsuoka K (2005) Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. Fitopatol. Bras. 30: 224–231. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000300002>
- Bi L, Xu J, Wang Q, Li T, Wang J, Zhou M, Duan Y (2022) Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Stemphylium solani* to fluxapyroxad. Crop Prot. 156: 05944. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.105944>

- Blancard D. (2012). *Tomato Diseases: Identification, Biology and Control*, Second Edition. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b15145>
- Boiteux LS, Henz GP, Giordano LB (1993) *Solanum lycocarpum*: A natural host of *Stemphylium solani*. Plant Dis. 77: 846. <https://doi.org/10.1094/PD-77-0846B>
- Boteon M, Deleo JPB, Moreira MM (2020) Tomaticultura em números. HF BRASIL, 13–20. <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/especial-tomate-impactos-covid-19-nos-curto-e-medio-prazos.aspx>
- Broz AK, Simpson-Van Dam A, Tovar-Méndez A, Hahn M W, McClure B, Bedinger PA (2021) Spread of self-compatibility constrained by an intrapopulation crossing barrier. New Phytol. 231: 878-891. <https://doi.org/10.1111/nph.17400>
- Chen X, Line RF (2003) Identification of genes for resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* in 18 barley genotypes. Euphytica 129: 127-146. <https://doi.org/10.1023/A:1021585907493>
- Cho HJ, Kim BS, Hwang HS (2001) Resistance to Gray Leaf Spot in *Capsicum* Peppers. HortScience 36: 752–754. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.4.752>
- Cruz CD (2016) Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. Acta Sci. Agron. 38: 547-552. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.32629>
- Dennett RK (1950) The association of resistance to *Fusarium* wilt and *Stemphylium* leaf spot in tomato, *Lycopersicon esculentum*. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 56: 353-357.
- Devi M, Banyal DK, Anudeep B, Sinha D (2021) Management of gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium lycopersici* under protected cultivation. Plant dis. res. 36: 154–160. <https://doi.org/10.5958/2249-8788.2021.00025.1>
- Dianese ÉDC, Boiteux LS, Inoue-Nagata AK, Resende RO (2008) Identificação de novas fontes de resistência ao *Pepper yellow mosaic virus* em espécies selvagens de *Solanum* (Secção *Lycopersicon*). Hortic. Bras. 26: S4855–S4860.
- Domingues, DP, Santos CA, Kowata-Dresch LS, Carmo MGF (2017) Quantificação e progresso da mancha-de-estenfilio em cultivares de tomate sob manejo orgânico. Cad. Cienc. Agrar. 9: 9–18. <https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/2948>

- Fethi B, Hanbary C, Mohamed EG (2011) Genetic adaptability of inheritance of resistance to biotic and abiotic stress level on crop: role of epistasis. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 19913-19917.
- Franco MEE, López SMY, Lucentini G, Troncozo MI, Saparrat MCN, Ronco BL, Balatti PA (2017) *Corynespora cassiicola* and *Stemphylium lycopersici* infection and disease development on tomatoes in Argentina. *Australas. Plant Dis. Notes* 12: 40. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0265-2>
- Franco MEE, Troncozo MI, López SMY, Lucentini G, Medina R, Saparrat MCN, Ronco LB, Balatti PA (2017) A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *Stemphylium lycopersici* representatives which were genetically diverse and differed in their virulence. *Eur. J. Plant Pathol.* 149: 983–1000. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1248-z>
- Gadish, I., Zamir, D. (1986). Differential zygotic abortion in an interspecific *Lycopersicon* cross. *Genome* 29(1): 156–159).
- Gebhardt, C. (2016). The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(12), 2281–2294. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2804-1>
- Geisenberg, C., & Stewart, K. (1986). Field crop management. In J. G. Atherton & J. Rudich (Eds.), *The Tomato Crop: A scientific basis for improvement* (pp. 511–557). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_13
- González-Arcos M, Fonseca MEN, Arruabarrena A, Lima MF, Michereff-Filho M, Moriones E, Fernández-Muñoz R, Boiteux LS (2018) Identification of genetic sources with attenuated tomato chlorosis virus-induced symptoms in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm. *Euphytica*, 214, 178. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2253-9>
- Havey MJ., Maxwell DP, Irwin JAG (1987) Independent Inheritance of Genes Conditioning Resistance to Phytophthora Root Rot from Diploid and Tetraploid Alfalfa. *Crop Sci.* 27: 873-879. <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700050007x>
- Hendrix JW, Frazier WA (1949) Studies on the inheritance of *Stemphylium* resistance in tomatoes. Honolulu (HI): Hawaii Agricultural Experiment Station, University of Hawaii. 24 p. (Technical Bulletin; 8)

- Huang C-J, Tsai W-S (2017) Occurrence and identification of *Stemphylium lycopersici* causing Stemphylium leaf spot disease on tomato in Taiwan. Eur. J. Plant Pathol. 148: 35–44. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1066-8>
- Jones JB, Zitter TA, Momol TM, Miller SA (2016) Compendium of Tomato Diseases and Pests, Second Edition. The American Phytopathological Society. Saint Paul, Minnesota. <https://doi.org/10.1094/9780890544341>
- Khazaei H, Madduri A (2022) The role of tomato wild relatives in breeding disease-free varieties. Genetic Resources 3: 64–73. <https://doi.org/10.46265/genresj.PSES6766>
- Melo JC, Santos CA, Fernandes MCDA, Carmo MGF (2019) Caldas alternativas e fungicidas no controle da mancha-de-estenfílio do tomateiro. Agrarian, 12: 16–23. <https://doi.org/10.30612/agrarian.v12i43.7101>
- Miranda BEC, Boiteux LS, Reis A (2010) Identificação de genótipos do gênero *Solanum* (seção *Lycopersicon*) com resistência a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. Hortic. Bras. 28: 178–184. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000200007>
- Nasehi A, Kadir J-B, Nasr-Esfahani M, Abed-Ashtiani F, Wong M-Y, Rambe S-K, Golkhandan E (2014) Analysis of genetic and virulence variability of *Stemphylium lycopersici* associated with leaf spot of vegetable crops. Eur. J. Plant Pathol. 140: 261–273. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0460-3>
- Nishi N, Muta T, Ito Y, Nakamura M, Tsukiboshi T (2009) Ray speck of chrysanthemum caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 75: 80–82. <https://doi.org/10.1007/s10327-008-0133-1>
- Paterson AH, Damon S, Hewitt JD, Zamir D, Rabinowitch HD, Lincoln SE, Lander ES, Tanksley SD (1991) Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. Genetics, 127: 181–197. <https://doi.org/10.1093/genetics/127.1.181>
- Pereira-Carvalho RC, Boiteux LS, Fonseca MEN, Díaz-Pendón JA, Moriones E, Fernández-Muñoz R, Charchar JM, Resende RO (2010) Multiple resistance to *Meloidogyne* spp. and to bipartite and monopartite *Begomovirus* spp. in wild *Solanum* (*Lycopersicon*) accessions. Plant Dis. 94: 179–185. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0179>
- Phillips P (2008) Epistasis – The essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. Nat. Rev. Genet. 9: 855–867. <https://doi.org/10.1038/nrg2452>

- Reis A, Boiteux L S (2006a) Mancha-de-estenfilio: Ressurgimento de um antigo problema do tomateiro. Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 41, 1–8.
- Reis A, Boiteux LS (2006b) Resistência de acessos de *Lycopersicon* a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 22, Embrapa Hortaliças.
- Reis A, Lourenço Jr V, Lopes CA (2021) Doenças causadas por fungos e oomicetos. In Lopes CA (ed) Doenças do tomateiro, 3ª ed. Embrapa Hortaliça, Brasília, pp 23–69. www.embrapa.br/fale-conosco/sac
- Rios JA, Debona D (2018) Efeito epidemiológico da resistência de hospedeiro. In Monteiro AL, Danelli A, Pereira A, Castro C, Debona D, Dianese É, Rodrigues F, Ferraz H, Filho J, Maciel J, Rios J, Badel JL, Thurow LB, Guimarães LM, Eiras M, Ceresini PC, Möller PA and Pereira-Carvalho RC (Eds.), Resistência Genética de Plantas a Patógeno. UFPel, Pelotas, pp 65–93.
- Su X, Zhu G, Huang Z, Wang X, Guo Y, Li B, Du Y, Yang W, Gao J (2019) Fine mapping and molecular marker development of the Sm gene conferring resistance to gray leaf spot (*Stemphylium* spp.) in tomato. Theor Appl Genet. 132: 871–882. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3242-z>
- Sun X-T, Zhang L, Zhang J-Z, Lu G (2016) First Report of Tomato Gray Leaf Spot Caused by *Stemphylium lycopersici* in Zhejiang Province, China. Plant Dis. 100: 227–227. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0615-PDN>
- Tomioka K, Sato T (2011) Fruit rot of sweet pepper caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 77: 342–344. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0337-7>
- Tomioka K, Abe D, Kawaguchi A, Kawakami A, Masunaka A, Mori S, Nomiyama K, Sekiguchi H (2021) *Stemphylium* leaf spot of asparagus caused by *Stemphylium lycopersici*. J. Gen. Plant Pathol. 87: 51–54. <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00968-6>
- Yang HH, Xu XY, Zhao TT, Jiang JB, Liu G, Li JF (2017) First Report of *Stemphylium lycopersici* Causing Gray Leaf Spot on Eggplant in China. Plant Dis. 101: 834. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1343-PDN>
- Yang H, Li Y, He Y, Sun Y, Jiang J, Zhao T, Zhang H, Xu X, Li J (2020) First Report of *Stemphylium lycopersici* Causing Gray Leaf Spot on Physali (*Physalis alkekengi*) in China. Plant Dis. 104: 2725–2725. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2231-PDN>

Yang H, Zhao T, Jiang J, Chen X, Zhang H, Liu G, Zhang D, Du C, Wang S, Xu X, Li J (2017) Transcriptome Analysis of the *Sm*-Mediated Hypersensitive Response to *Stemphylium lycopersici* in Tomato. Front. Plant Sci. 8: 01257. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01257>

Yang H, Wang H, Jiang J, Liu M, Liu Z, Tan Y, Zhao T, Zhang H, Chen X, Li J, Wang A, Du M, Xu X (2022) The *Sm* gene conferring resistance to gray leaf spot disease encodes an NBS-LRR (nucleotide-binding site-leucine-rich repeat) plant resistance protein in tomato. Theor. Appl. Genet. 135: 1467-1476. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04047-6>

Table 1 – Twenty-two (22) expected phenotypic ratios for one, two, and three genes involved in the resistance response of *Solanum habrochaites* ‘PI 127827’ to *Stemphylium lycopersici* in an F₂ segregating population.

Number of genes involved in determining the trait	Ratio
One dominant gene	3:1
One recessive gene	1:3
Two dominant genes	15:1
One dominant gene and one recessive gene	13:3
Two recessive genes	7:9
Two dominant and complementary genes	9:7
One dominant and one recessive complementary genes	3:13
Two recessive and complementary genes	1:15
three dominant genes	63:1
Two dominant genes and one recessive	61:3
One dominant and two recessive genes	55:9
three recessive genes	37:27
Three complementary dominant genes	27:37
Two dominant and one recessive complementary genes	9:55
One dominant and two complementary recessive genes	3:61
Three complementary recessive genes	1:63
One independent dominant gene and two complementary dominants	57:7
One independent dominant and one dominant and one recessive complementary gene	51:13
One independent dominant gene and two complementary recessives	49:15
One independent recessive gene and two complementary dominants	13:21
One independent recessive and one dominant and one complementary recessive gene	25:39
One independent recessive gene and two complementary recessives	19:45

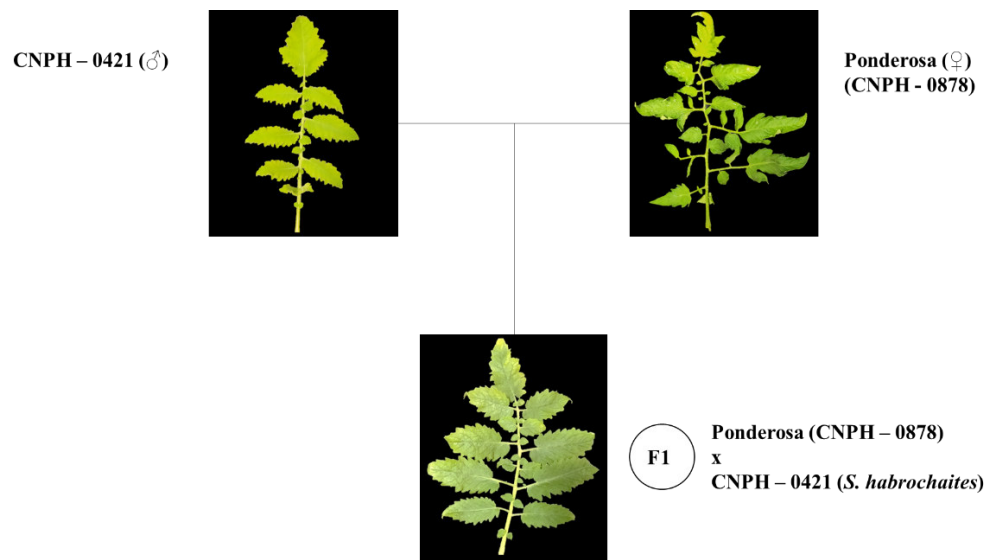


Figure 1 – Crosses between the male parent *Solanum habrochaites* ‘PI 127827’ (CNPH-0421), the female parent cultivar ‘Ponderosa’ (CNPH-0878) and the F1 progeny ‘Ponderosa’ x ‘PI 127827’.

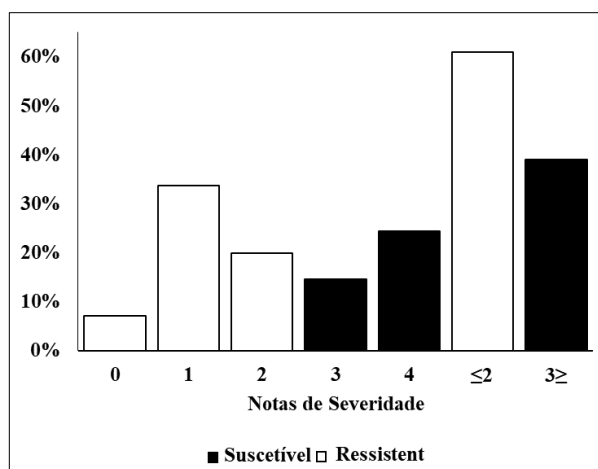


Figure 2 – Graphical representation of the distributions of *Stemphylium* spot severity scores in the F₂ population of ‘Ponderosa’ $\times$ *Solanum habrochaites* ‘PI 127827’ using the descriptive score scale from 0 to 4 (Huang & Tsai, 2017), where 0 = no symptoms; 1 = 1–3 necrotic spots; 2 = 4–6 necrotic spots; 3 = 7 or more spots, but no coalescence of spots; 4 = 7 or more spots with coalescence of spots.

Table 2 – Expected segregation hypotheses for one, two, and three genes involved in *Stemphylium lycopersici* spot resistance in the F₂ population of ‘Ponderosa’ x *Solanum habrochaites* ‘PI 127827’.

Pedigree	Expected frequency	Observed frequency		Observed Segregation		χ^2	P (%)
		R	S	R	S		
‘Ponderosa’	0:1	0	30	0	30	---	---
‘PI 127827’	1:0	30	0	30	0	---	---
F1	1:0	30	0	30	0	---	---
F2	9:7	204	131	188	147	3.10	7.8
F2	3:1	204	131	251	84	35.10	0
F2	1:3	204	131	84	251	228.99	0
F2	15:1	204	131	314	21	614.73	0
F2	13:3	204	131	272	63	90.40	0
F2	7:9	204	131	147	188	39.38	0
F2	3:13	204	131	63	272	388.66	0
F2	1:15	204	131	21	314	1701.37	0
F2	63:1	204	131	330	5	3223.31	0
F2	61:3	204	131	319	16	868.02	0
F2	55:9	204	131	288	47	174.63	0
F2	37:27	204	131	194	141	1.23	28.8
F2	27:37	204	131	141	194	48.61	0
F2	9:55	204	131	47	288	610.03	0
F2	3:61	204	131	16	319	2319.80	0
F2	1:63	204	131	5	330	8040.20	0
F2	57:7	204	131	298	37	268.46	0
F2	51:13	204	131	267	68	73.23	0
F2	49:15	204	131	256	79	44.79	0
F2	13:21	204	131	128	207	73.03	0
F2	25:39	204	131	131	204	66.80	0
F2	19:45	204	131	99	236	158.08	0

R = Resistant; S = Susceptible; χ^2 = Chi-square; P = Probability; ns = not significant 5%

CAPÍTULO V

Identificação de fontes de resistência do tipo imunidade contra *Stemphylium lycopersici* em acessos de *Capsicum annuum* e *C. annuum* var. *glabriusculum*



Identificação de fontes de resistência do tipo imunidade a *Stemphylium lycopersici* em acessos de *Capsicum annuum* e *C. annuum* var. *glabriusculum*

Tiago Bezerra Torres¹; Leonardo Silva Boiteux²; David Nataren Perdomo¹; Cláudia Silva Da Costa Ribeiro²; Sabrina Isabel Costa de Carvalho²; Ailton Reis²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife–PE, Brazil.

²Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Departamento de Fitopatologia, 70910-900, Brasília–DF, Brazil;

³Embrapa, National Center for Vegetable Crops Research (CNPH), Embrapa Vegetable Crops (Embrapa Hortaliças), 70275-970, Brasília–DF, Brazil.

Correspondence: leonardo.boiteux@embrapa.br.

ORCID: 0000-0002-5791-8002

RESUMO

A ‘mancha de stemphylium’ é uma doença emergente nos cultivos de espécies de *Capsicum* em regiões tropicais. Embora a doença apresente uma etiologia complexa, *Stemphylium lycopersici* têm sido o agente causal predominante nas condições brasileiras. A utilização de cultivares resistentes é a alternativa de controle com maior viabilidade econômica e sustentabilidade. No entanto, até o presente momento, poucas fontes de resistência foram detectadas em germoplasma de *Capsicum*. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a reação de uma coleção de 37 acessos de *Capsicum* em busca por fontes de resistência contra dois isolados de *S. lycopersici*. As cultivares de tomateiro ‘Ponderosa’ e ‘Santa Clara’ foram utilizadas como padrões de suscetibilidade, e ‘Floradade’ (gene *Sm*) como padrão de resistência. A reação dos acessos foi caracterizada com base nos parâmetros epidemiológicos, como o período de incubação (PI), severidade e a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Um subgrupo de acessos de *C. chinense* (‘CNPH-4570’), *C. annuum* var. *glabriusculum* (‘CNPH-4134’ e ‘CNPH-4135’), *C. baccatum* var. *pendulum* (‘CNPH-3833’, ‘CNPH-3837’ e ‘CNPH-4568’) e *C. frutescens* (‘CNPH-3835’) se mostraram extremamente suscetíveis a *S. lycopersici*. Por sua vez, os acessos *C. annuum* ‘Jalapeño TS’ e *C. annuum* var. *glabriusculum* ‘CNPH-3839’ apresentaram uma reação do tipo imunidade aos dois isolados de *S. lycopersici*. Estes acessos com respostas contrastantes poderão ser utilizados como parentais em estudos de herança visando identificar e mapear os fatores genéticos associados com a resistência a *S. lycopersici* em diferentes espécies de *Capsicum*. Por sua vez, os acessos resistentes podem ser inseridos como progenitores em programas de melhoramento genético visando o desenvolvimento de cultivares de *Capsicum* com resistência ao patógeno.

Palavras-chave: mancha-de-estenfílio; pimentão, pimentas, melhoramento genético.

ABSTRACT

‘*Stemphylium* leaf spot’ is an emerging disease *Capsicum* of species in tropical regions. Although the disease has a complex etiology, the predominant causal agent under Brazilian conditions has been *Stemphylium lycopersici*. The use of resistant cultivars is the control alternative with greater economic viability and sustainability. However, few sources of resistance have been detected in *Capsicum* germplasm thus far. In this context, the objective of the present work was to evaluate the reaction of a collection of 37 *Capsicum* accessions searching for sources of resistance against two isolates of *S. lycopersici*. The tomato cultivars ‘Ponderosa’ and ‘Santa Clara’ were used as susceptibility standards, and ‘Floradade’ (with the *Sm* gene) as resistance standards. The reaction of the accessions was characterized based upon epidemiological parameters, such as the incubation period (IP), symptom severity, and the area under the disease progress curve (AUDPC). A subgroup of accessions of *C. chinense* (‘CNPH-4570’), *C. annuum* var. *glabriusculum* (‘CNPH-4134’ and ‘CNPH-4135’), *C. baccatum* var. *pendulum* (‘CNPH-3833’, ‘CNPH-3837’, and ‘CNPH-4568’) and *C. frutescens* (‘CNPH-3835’) were extremely susceptible to both *S. lycopersici* isolates. In turn, the accessions *C. annuum* ‘Jalapeño TS’ and *C. annuum* var. *glabriusculum* ‘CNPH-3839’ showed an immune-like reaction to both *S. lycopersici* isolates. These accessions with contrasting responses could be used as parents in inheritance studies to identify and map the genetic factors associated with resistance to *S. lycopersici* in different *Capsicum* species. In addition, the resistant accessions can be incorporated as progenitors in breeding programs aimed at the development of *Capsicum* cultivars with resistance to the pathogen.

Keywords: gray leaf spot; sweet pepper, hot pepper, breeding.

INTRODUÇÃO

O pimentão e as pimentas do gênero *Capsicum* estão entre as hortaliças, condimentos e especiarias mais antigas e também mais consumidas e cultivadas do mundo (Perry, 2007; Hernández-Pérez *et al.*, 2020). O Brasil apresenta uma produção considerável de pimentas e pimentões, apresentando um mercado extremamente segmentado com várias espécies com variados usos e formas de consumo (Ferraz *et al.*, 2016). O gênero *Capsicum* apresenta entre 27 e 43 espécies (Ibiza *et al.*, 2012; Barboza *et al.*, 2022) das quais seis são mais amplamente cultivadas: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. pubescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. assamicum* (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). Os centros de origem e domesticação das diferentes espécies se localizam na América do Sul, Mesoamérica e México (Barboza *et al.*, 2022). A espécie *C. assamicum* foi identificada como uma nova espécie domesticada na região nordeste da Índia que está intimamente relacionada com *C. frutescens* e *C. chinense*, mas pode ser diferenciada devido às suas características morfológicas, filogenia molecular e análise proteômica diferencial (Purkayastha *et al.*, 2012).

Um dos principais fatores que podem limitar a produção e qualidade das espécies de pimentas e pimentões é a ocorrência de doenças (Xie *et al.*, 2019b). As pimentas e o pimentão do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae, que inclui hortaliças economicamente importantes como tomate, batata, berinjela e jiló, as quais compartilham muitas doenças. A mancha de stemphylium é uma das doenças presentes que pode afetar uma ampla gama de hospedeiras da família Solanaceae (Boiteux *et al.*, 1993; Reis and Boiteux, 2006a, presente tese), embora o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) seja a principal hospedeira. A nível mundial, a mancha de stemphylium do tomateiro e outras Solanaceae tem sido atribuída a três patógenos do gênero *Stemphylium* (Weber, 1930; Blancard, 2012; Jones *et al.*, 2016): *S. solani* G.F. Weber, *S. lycopersici* (Enjoji) W. Yamam. (= *S. floridanum* Hannon and G.F. Weber) e *S. botryosum* Wallr. No Brasil, os agentes causais predominantes da doença têm sido isolados da espécie *Stemphylium lycopersici* (Torres *et al.*, 2023 presente tese). Espécies de outras famílias botânicas também têm sido reportadas como hospedeiras incluindo Malvaceae, Lamiaceae, Euphorbiaceae, Amaryllidaceae, Asparagaceae, Asteraceae, Fabaceae e Cucurbitaceae (Ben *et al.*, 2021; Dumin *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Reis and Boiteux, 2006b; Tomioka *et al.*, 2021).

Mais recentemente, surtos epidêmicos da mancha de stemphylium têm sido reportados com maior frequência em cultivos de *Capsicum* principalmente em condições quentes e úmidas no continente asiático (Sun and Huang, 2022; Xie *et al.*, 2019b). Em *Capsicum*, a

mancha de stemphylium afeta principalmente as folhas de mudas de pimentas, mas em condições ambientais favoráveis, infecta o caule, pecíolo e até mesmo o pedúnculo. Os sintomas começam a aparecer como manchas foliares pequenas de até 1-2 mm de diâmetro, apresentando o centro com cor cinza a branco cercados por margens marrons a marrons escuras, que progride para manchas maiores de até 3-6 mm de diâmetro. Em uma alta intensidade da doença as manchas próximas tendem a coalescer, expandir à medida que envelhecem e provocar desfolha da planta. Os frutos dificilmente são atacados, porém existe um caso raro relatado no Japão de podridão severa de frutos pós-colheita em cultivares de *C. annuum* (Tomioka and Sato, 2011).

A doença pode ser controlada via pulverização de fungicidas, no entanto esses são escassos para as espécies de *Capsicum* com o agravante que o repertório de moléculas recomendadas para o patógeno ainda é limitado (AGROFIT, 2023). Além disso, o uso indiscriminado de uma única molécula poderá selecionar variantes do patógeno resistentes, como também afetar negativamente o meio ambiente (Bi *et al.*, 2022). Neste contexto, a utilização de cultivares resistentes em sistemas comerciais de produção se apresenta como uma alternativa ecologicamente viável e com economia de mão de obra e insumos. No entanto, poucas fontes de resistência foram detectadas nas diferentes espécies de *Capsicum* sendo estes trabalhos restritos ao continente asiático (Cho *et al.*, 2001). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de uma coleção de germoplasma de 37 acessos de *Capsicum* em busca por fontes de resistência contra dois isolados de *S. lycopersici*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação e laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. Nesse experimento, foram avaliados 37 acessos de *Capsicum* da coleção de germoplasma da Embrapa Hortaliças (**Tabela 1**) a dois isolados identificados como *Stemphylium lycopersici*, sendo um obtido de planta de tomate (EH-2800) e o outro de pimenta (EH-2811). As cultivares de tomateiro ‘Ponderosa’ e ‘Santa Clara’ foram utilizadas como padrão de suscetibilidade, e ‘Floradade’ de resistência.

O inoculo (conídios) foi produzido em placas de Petri contendo meio V8. Um disco de micélio de uma cultura pura do patógeno foi transferido para o centro de cada placa. As placas foram mantidas durante sete dias em Câmara Incubadora BOD, sob temperatura de 25±2°C em fotoperíodo de 12 horas de luz negra e 12 horas no escuro. Após sete dias, os conídios

foram extraídos a partir da raspagem das colônias fúngicas em água com auxílio de um bisturi. A suspensão foi filtrada em gaze dupla e ajustada a concentração do inóculo para 10^4 conídios/mL.

As sementes dos acessos de *Capsicum* spp. e das cultivares de tomate foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial Bioplant[®], sob condições de casa de vegetação. Aos 30 dias após a germinação, as mudas foram transplantadas para vasos de 1 L preenchidos com solo esterilizado. Quando as mudas estavam no estágio de dois a três pares de folhas verdadeira, essas foram aspergidas com a suspensão de conídios com o auxílio de um borrifador manual, até o ponto de escorrimento. As plantas inoculadas foram distribuídas em bancadas, na casa de vegetação, em desenho inteiramente casualizado com quatro repetições. Os vasos foram irrigados e as bancadas foram cobertas com uma lona plástica transparente visando fornecer um microclima com alta umidade (câmara úmida) por 48 horas.

A reação dos acessos e cultivares aos isolados de *S. lycopersici* foi caracterizada com base em parâmetros epidemiológicos: período de incubação (PI), severidade final e a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). A severidade da doença foi avaliada aos 5, 7, 9, 11, 13 e 15 dias após a inoculação, em quatro folhas por planta, usando uma escala descritiva de 0 a 4 (Cho *et al.* 2001): **0** = sem sintomas; **1** = Entre 1–3 pontos necróticos nas folhas; **2** = Entre 4–6 pontos necróticos nas folhas; **3** = Sete ou mais manchas foliares, mas sem coalescência de manchas; **4** = Mais de sete manchas foliares com coalescência de lesões e/ou queda das folhas. A AACPD do isolado mais agressivo foi calculada utilizando a seguinte equação: $AACPD = \sum ((Y_i + Y_{i+1}) / 2) (t_{i+1} - t_i)$, em que Y são valores de severidade da doença; t é o tempo (intervalo entre as avaliações, em dias) e i é o número de avaliações feitas ao longo do tempo (Campbell and Madden 1990). A severidade final foi medida na última avaliação (15 dias após a inoculação). Com base nas notas obtidas nessa avaliação, foi calculado o índice da doença (ID), através da fórmula de McKinney (1923), onde $ID (\%) = 100.S[(f.v)/(n.x)]$; sendo f = número de plantas com a mesma nota; v = nota observada; n = número total de plantas avaliadas e x = nota máxima da escala. Os genótipos que não demonstraram sintomas da mancha de stemphylium tiveram o PI ajustado para 16 dias, correspondendo ao período de avaliação total (15) mais um dia (Miranda *et al.*, 2010). Os dados de PI, AACPD e ID foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste

Scott-Knott de agrupamentos de médias através do programa de análises estatísticas (SISVAR versão 4.2. DEX/UFLA, 2003).

RESULTADOS

A análise de variância demonstrou que existe diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos resultados de severidade final da mancha de *stemphylium* nos acessos e entre os isolados avaliados. As cultivares de tomate ‘Ponderosa’ e ‘Santa Clara’ foram altamente suscetíveis, enquanto a cultivar ‘Floradade’ foi altamente resistente, confirmando a virulência dos isolados. A maioria dos acessos avaliados apresentou reações similares, sendo resistentes ou suscetíveis aos dois isolados de *S. lycopersici*. O isolado EH-2811 apresentou maior virulência e agressividade quando comparado a EH-2800, causando maior severidade em um número maior de acessos de *Capsicum*. Os sintomas observados nos acessos foram variados, manchas irregulares e pontos isolados (**Figura 1**).

O teste de agrupamento de Scott-Knott permitiu observar clara diferenciação dos acessos em termos de ID (**Tabela 2**). Os padrões de suscetibilidade (‘Ponderosa’ e ‘Santa Clara’) estiveram entre os acessos que apresentaram maior severidade da doença, enquanto o padrão de resistência (‘Floradade’) entre os que apresentaram valores próximos de zero. Os maiores valores de ID do isolado ‘EH-2800’ foram observados nos acessos ‘CNPH-3833’, ‘CNPH-3837’, ‘CNPH-4135’, ‘CNPH-4568’ e ‘CNPH-4631’ e os menores nos acessos ‘CNPH-3839’, ‘CNPH-0678’, ‘Jalapeño’, ‘Pimenta Andina’ e ‘162 OR-5’. Para o isolado ‘EH-2811’, os maiores valores foram observados em ‘CNPH-4570’, ‘CNPH-4134’, ‘CNPH-4135’, ‘CNPH-3833’, ‘CNPH-3835’, ‘CNPH-3837’ e ‘CNPH-4568’, e os menores valores em ‘Jalapeño’ e ‘CNPH-3839’.

Os menores valores de PI foram observados em dez acessos de *Capsicum* para EH-2800 e onze para EH-2811. Os padrões de suscetibilidade (‘Ponderosa’ e ‘Santa Clara’) também estiveram entre os acessos com menores valores de PI da doença. Os acessos ‘CNPH-3833’, ‘CNPH-3835’, ‘CNPH-3837’, ‘CNPH-4163’, ‘CNPH-4506’, ‘CNPH-4549’, ‘CNPH-4568’, ‘CNPH-4570’ e ‘BRS Biguatinga’ apresentaram os menores PIs nos dois isolados inoculados. Para os dois isolados avaliados, os acessos de ‘Jalapeño TS’ e ‘CNPH-3839’ apresentaram ID zero, além dos maiores valores de PI. Por sua vez, os acessos ‘CNPH-3833’, ‘CNPH-3837’, ‘CNPH-4135’ e ‘CNPH-4568’ apresentaram os maiores valores de ID para os dois isolados e menores valores de PI.

Os valores de AACPD dos acessos de *Capsicum* obtidos após inoculação com um

isolado mais agressivo (EH-2811) permitiram classificar os acessos quanto aos níveis de resistência. Os acessos ‘CNPH-3839’, ‘Jalapeño TS’ e ‘CNPH-0678’ apresentaram o mesmo comportamento da cultivar de tomate ‘Floradade’ que apresenta o gene *Sm* de resistência ao patógeno. Reação de imunidade foi observada no acesso ‘CNPH-3839’ e na cultivar ‘Jalapeño TS’ que apresentaram valor zero de AACPD. Embora o acesso ‘CNPH-0678’ tenha apresentado valor de AACPD maior que zero, não diferiu estatisticamente da cultivar de tomate resistente (‘Floradade’). Os acessos ‘CNPH-4135’, ‘CNPH-3833’ e ‘CNPH-4568’ foram altamente suscetíveis ao patógeno, obtendo os maiores valores de AACPD, acima dos valores da cultivar suscetível ‘Ponderosa’. Os valores de AACPD variaram entre e dentro das espécies de *Capsicum* avaliadas. As espécies *C. annuum* var. *annuum* apresentaram níveis mais baixos da doença, variando de 0 a 395,31 de AACPD, quando comparado com *C. chinense*, que foi de 0 a 1046. Os acessos da espécie *C. baccatum* var. *pendulum* foram altamente suscetíveis. A espécie *C. annuum* var. *glabriusculum* apresentou diferentes valores de AACPD para diferentes acessos, variando de resistente a altamente suscetível.

DISCUSSÃO

A mancha de stemphylium é uma doença importante para muitas solanáceas, principalmente tomate. No entanto, essa doença vem se tornando um problema para as culturas da pimenta e do pimentão em diferentes regiões tropicais e subtropicais em diferentes continentes (Kim *et al.*, 2004; Sun and Huang, 2022; Tomioka and Sato, 2011; Vitale *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2019b; presente tese). Em virtude dessa expansão em importância e abrangência geográfica, trabalhos iniciais de avaliação de germoplasma de *Capsicum* para reação a esse grupo de patógenos têm sido conduzidos (Cho *et al.*, 2001). Embora fontes de resistência tenham sido identificadas em diferentes espécies tais como *C. annuum*, *C. pubescens*, *C. baccatum* e *C. frutescens*, nenhum gene de resistência foi caracterizado em *Capsicum* que confira resistência a essa doença até o presente momento.

A triagem dos acessos de *Capsicum* conduzida no presente trabalho confirmou que a resistência ao *S. lycopersici* é restrita, sendo a suscetibilidade o fenótipo preponderante na coleção amostrada. Um ou mais acessos de todas as espécies do gênero *Capsicum* se mostraram suscetíveis. Pode-se observar uma frequência mais elevada de acessos com resistência nas variedades botânicas de *C. annuum* var. *glabriusculum* e *C. annuum* var. *annuum*. Em contrapartida, a espécie *C. baccatum* var. *pendulum* tendeu a um status de suscetibilidade. *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser e Pickersgill se

encontra naturalmente distribuída em regiões da Colômbia, América Central, México e sudoeste dos Estados Unidos. Essa variedade botânica tem sido considerado um importante recurso genético para o melhoramento (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). O presente trabalho também confirma a utilidade desse germoplasma para resistência contra isolados de *S. lycopersici*.

O conhecimento do tempo entre a infecção do hospedeiro e a expressão dos sintomas da doença em plantas é crucial para a compreensão da epidemiologia da doença e para tomada de estratégias de prevenção e controle (Leclerc *et al.*, 2014). Estes estudos mostraram que o período de incubação não está ligado preferencialmente a resistência de *Capsicum* a mancha-de-estenfilio, isso porque alguns acessos que apresentaram um PI menor tiveram índice da doença baixo. Miranda *et al.* (2010) encontraram o mesmo problema em utilizar o PI para selecionar genótipos de tomate resistentes a duas espécies causadoras da mancha-de-estenfilio. No entanto, o baixo índice da doença pode estar relacionado com a reação de hipersensibilidade e não suscetibilidade. Como comprovado por Bentes and Matsuoka, 2005 em cortes histológicos da infecção de *S. solani* em tomateiro. Estes autores observaram pequenas lesões necróticas de 48 a 72 horas após a inoculação em algumas plantas, que não evoluíam para sintomas típicos da doença.

No melhoramento de plantas, dois tipos de resistências têm sido descritos: resistência qualitativa, que é conferida por uma série de genes dominantes principais que tornam o hospedeiro incompatível com o patógeno; resistência quantitativa, que geralmente é conferida pelo efeito de múltiplos genes de efeitos menores. A resistência quantitativa causa a redução, mas não a ausência, de doenças e as diferenças no nível de resistência são geralmente menos distintas (French *et al.*, 2016; Kushalappa *et al.*, 2016). O cálculo da área sob a curva de progresso da doença (AACPD) foi um importante parâmetro para entender a interação planta-patógeno ao longo do tempo, assim como também na distinção dos níveis de resistência contra *S. lycopersici* entre os acessos avaliados.

Os resultados observados sugerem que as plantas resistentes tiveram forte impacto de diversos mecanismo de resistência a doença, os quais, ainda não foram elucidados neste trabalho. Os acessos ‘Jalapeño TS’ e o ‘CNPH-3839’ foram imunes, uma vez que não foi observado sintomas característicos da mancha-de-estenfilio neles, levando a crer que esses possuem uma resistência do tipo qualitativa, vertical ou monogênica. Dos trinta e sete acessos avaliados, trinta e um apresentaram maiores níveis de resistência à doença quando

comparados com o padrão de suscetibilidade ‘Ponderosa’, logo esses devem possuir uma resistência do tipo quantitativa, horizontal ou poligênica.

Os isolados podem possuir diferenças intraespecíficas quanto às características patogênicas, pois apresentaram diferentes níveis de virulência e agressividade nos acessos avaliados. Isso pode estar relacionado à hospedeira ou ao local de origem dos isolados ou ainda às espécies de *Capsicum* testadas. O isolado (EH-2811) foi coletado de uma planta de tomate, demonstrando uma possível ausência de preferência por hospedeira no mesmo. Este trabalho também sugere a necessidade de um estudo focado na resposta histológica da interação das espécies de plantas resistentes e suscetíveis de *Capsicum* à mancha de stemphylium para entender melhor os mecanismos de defesa das plantas, como barreiras morfológicas, morte local das células infectadas (reação de hipersensibilidade), biossíntese de fitoalexinas, síntese das enzimas que degradam as paredes celulares do patógeno e síntese das proteínas ativadoras de ribossomos.

Em conclusão, os acessos ‘Jalapeño TS’ e *C. annuum* var. *glabriusculum* ‘CNPH-3839’ apresentaram reação de imunidade a dois isolados de *S. lycopersici*, podem ser considerados boas fontes de resistência para esse patógeno. Esses acessos constituem materiais interessantes a serem utilizados em programas de melhoramento genético de *Capsicum*, visando resistência à doença. Além disso, a resistência destes acessos poderá ser caracterizada em estudos histopatológicos e genéticos antes de eles serem inseridos em programas de melhoramento genético visando à resistência a esse patógeno.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. 2023. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 13 de março de 2023.
- Barboza, GE; García, CC; Bianchetti, LB; Romero, MV; Scaldaferrro, M. 2022. Monograph of wild and cultivated chili peppers (*Capsicum* L., Solanaceae). *PhytoKeys*, 200: 1–423. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.200.71667>
- Ben, H; Huo, J; Song, C; Yao, Y; Gao, W; Wang, W; Hao, Y; Zhang, X. 2021. *Stemphylium lycopersici* Causing Leaf Spot of Watermelon (*Citrullus lanatus*) in China. *Plant Disease*, 105(12): 4157. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0990-PDN>
- Bentes, JLS; Matsuoka, K. 2005. Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 30 (3): 224–231. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000300002>
- Bi, L; Xu, J; Wang, Q; Li, T; Wang, J; Zhou, M; Duan, Y. 2022. Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Stemphylium solani* to fluxapyroxad. *Crop Protection*, 156: 105944. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.105944>
- Blancard, D (2012). Tomato Diseases: Identification, Biology and Control. *CRC Press*. 688.p <https://doi.org/10.1201/b15145>
- Boiteux, LS; Henz, GP; Giordano, LB. 1993. *Solanum lycocarpum*: A natural host of *Stemphylium solani*. 77(8): 846.
- Cho, HJ; Kim, BS; Hwang, HS. 2001. Resistance to gray leaf spot in *Capsicum* peppers *HortScience* 36(4): 752–754.
- Dumin, W; Han, YK; Park, JH; Han, JW; Back, CG. 2021. First report of leaf blight disease caused by *Stemphylium solani* on Welsh onion in Korea. *New Disease Reports*, 43(2). <https://doi.org/10.1002/ndr2.12010>
- Farr DF; Rossman, AY .2023. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved March 25, 2023, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Ferraz, RM; Ragassi, CF; Heinrich, AG; Lima, MF; Peixoto, JR; Reifschneider, FJB. 2016. Caracterização morfoagronômica preliminar de acessos de pimentas cumari. *Horticultura Brasileira*, 34: 498–506. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620160408>
- French, E; Kim, BS; Iyer-Pascuzzi, AS. 2016. Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 56: 201–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semedb.2016.05.015>
- Hayano-Kanashiro, C; Gámez-Meza, N; Medina-Juárez, LÁ. 2016. Wild pepper *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*: Taxonomy, plant morphology, distribution, genetic diversity, genome sequencing, and phytochemical compounds. *Crop Science*, 56(1): 1–11.
- Hernández-Pérez, T; Gómez-García, MR; Valverde, ME; Paredes-López, O. 2020. *Capsicum annuum* (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19: 2972–2993. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12634>

- Ibiza, VP; Blanca, J; Cañizares, J; Nuez, F. 2012. Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 1077–1088.
- Jones, JB; Zitter, TA; Momol, TM; Miller, SA. 2016. Compendium of Tomato Diseases and Pests, Second Edition (JB Jones, TA Zitter, TM Momol, and SA Miller, Eds.), APS. <https://doi.org/10.1094/9780890544341>
- Khaitov, B; Umurzokov, M; Cho, KM; Lee, YJ; Park, KW; Sung, J. 2019. Importance and production of chilli pepper; heat tolerance and efficient nutrient use under climate change conditions. *Agricultural Science Korean Journal of Agricultural Science*, 46(3): 769-779 . <https://doi.org/10.7744/kjoas.20190059>
- Kim, BS; Yu, SH; Cho, HJ; Hwang, HS. 2004. Gray leaf spot in peppers caused by *Stemphylium solani* and *S. lycopersici*. *The Plant Pathology Journal*, 20: 85-91. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2004.20.2.085>
- Kushalappa, AC; Yogendra, KN; Karre, S. 2016. Plant innate immune response: Qualitative and quantitative resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35(1), 38–55. <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1148980>
- Leclerc, M; Doré, T; Gilligan, CA; Lucas, P; Filipe, JAN. 2014. Estimating the delay between host infection and disease (incubation period) and assessing its significance to the epidemiology of plant diseases. *PLoS One*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086568>
- Li, YT; Zhang, WH; Wang, YH; Zhang, M; Guo, HC; Gao, C; Gao, XL. 2019. First report of leaf and stem spot on common bean caused by *Stemphylium lycopersici* in China. *Plant Disease*, 104(2): 572. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1805-PDN>
- Liu, H; Wang, H; Zhong, J; Lu, X; Pan, XT; Zhu, HJ; Zhou, Q. 2019. First report of *Stemphylium lycopersici* and *Stemphylium vesicarium* causing leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa*) in China. *Plant Disease*, 103: 2598–2957. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1052-PDN>
- Miranda, BEC; Boiteux, LS; Reis, A. 2010. Identificação de genótipos do gênero *Solanum* (seção *Lycopersicon*) com resistência a *Stemphylium solani* e *S. lycopersici*. *Horticultura Brasileira*, 28 (2): 178–184. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000200007>
- Perry, L; Dickau, R; Zarrillo, S; Holst, I; Pearsall, DM; Piperno, DR; Berman, MJ; Cooke, RG; Rademaker, K; Ranere, AJ; Raymond, JS; Sandweiss, DH; Scaramelli, F; Tarble, K; Zeidler, JA. 2007. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 315(5814): 986–988. <https://doi.org/10.1126/science.1136914>
- Purkayastha, J; Alam, SI; Gogoi, HK; Singh, L. 2012. *Capsicum assamicum* sp. nov. (Solanaceae), from Assam, Northeastern India. *Ozean Journal of Applied Sciences*, 5: 55-66.
- Reis, A; Boiteux, LS. 2006a. Círculo de hospedeiras de isolados de *Stemphylium solani*. Embrapa Hortaliças. Brasília-DF, *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 18. 1-8.
- Reis, A; Boiteux, LS. 2006b. Mancha-de-estenfílio: Ressurgimento de um antigo problema do tomateiro. Embrapa Hortaliças. Brasília-DF, *Circular Técnica*, 41, 1–8.
- Sun, YC; Huang, CJ. 2022. First report of *Stemphylium lycopersici* causing gray leaf spot of pepper in Taiwan. *Journal of Plant Pathology*, 104(3): 1169. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01144-9>

- Tomioka, K; Abe, D; Kawaguchi, A; Kawakami, A; Masunaka, A; Mori, S; Nomiya, K; Sekiguchi, H. 2021. Stemphylium leaf spot of asparagus caused by *Stemphylium lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology*, 87(1): 51–54. <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00968-6>
- Tomioka, K; Sato, T. 2011. Fruit rot of sweet pepper caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 77(6): 342–344. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0337-7>
- Vitale, S; Luongo, L; Galli, M; Belisario, A. 2017. First report of *Stemphylium vesicarium* on chilli pepper in Italy. *New Disease Reports*, 35(1): 36. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2017.035.036>
- Weber, G. F. (1930). Gray leaf spot of Tomato caused by *Stemphylium solani*, sp. nov. *Phytopathology*, 20, 513–518.
- Xie, X; Wu, J; Cheng, Y; Shi, J; Zhang, X; Shi, Y; Chai, A; Li, B. 2019a. First report of *Stemphylium lycopersici* causing leaf spot on hot pepper in China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41: 124–128. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1516238>

Tabela 1. Acessos de espécies *Capsicum* e *Solanum*, da coleção de germoplasma Embrapa Hortaliças, utilizados neste trabalho.

Acessos	Espécie	Tipo
CNPH-0143	<i>C. annuum</i> L. var. <i>annuum</i>	Pimenta cayenne
CNPH-0148	<i>C. annuum</i> L. var. <i>annuum</i>	Pimenta serrano
CNPH-0678	<i>C. annuum</i> L. var. <i>annuum</i>	Pimenta
CNPH-3445	<i>C. annuum</i> L. var. <i>annuum</i>	Pimentão
Ikeda	<i>C. annuum</i> L. var. <i>annuum</i>	Pimentão
Jalapeño TopSeed	<i>C. annuum</i> L. var. <i>annuum</i>	Pimenta jalapeño
101 OR-1	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
106 OR-5	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
108 OR-4	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
113 OR-1	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
115 OR-1	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
148 OR-2	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
154 OR-1	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
155 OR-2	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
158 OR-2	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
161 OR	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
162 OR-5	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
CNPH-3839	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
CNPH-4134	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
CNPH-4135	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i>	Pimenta ornamental
CNPH-3833	<i>C. baccatum</i> L. var. <i>pendulum</i>	Pimenta cambuci
CNPH-3837	<i>C. baccatum</i> L. var. <i>pendulum</i>	Pimenta dedo-de-moça
CNPH-4568	<i>C. baccatum</i> L. var. <i>pendulum</i>	Pimenta cambuci
Pimenta Andina TopSeed	<i>C. baccatum</i> L. var. <i>pendulum</i>	Pimenta dedo-de-moça
BRS Araçari	<i>C. chinense</i> Jacq.	Pimenta habanero
BRS Biguatinga	<i>C. chinense</i> Jacq.	Pimenta habanero
BRS Juruti	<i>C. chinense</i> Jacq.	Pimenta habanero
BRS Moema	<i>C. chinense</i> Jacq.	Pimenta biquinho
BRS Nandaia	<i>C. chinense</i> Jacq.	Pimenta habanero
BRS Seriema	<i>C. chinense</i> Jacq.	Pimenta bode
BRS Tui	<i>C. chinense</i> Jacq.	Pimenta biquinho
CNPH-0290	<i>C. chinense</i> Jacq.	Cumari-do-Pará
CNPH-4163	<i>C. chinense</i> Jacq.	Pimenta-de-cheiro
CNPH-4570	<i>C. chinense</i> Jacq.	Pimenta-de-cheiro
CNPH-4133	<i>C. chinense</i> Jacq.	Pimenta biquinho
CNPH-3835	<i>C. frutescens</i> L.	Pimenta malagueta
CNPH-4631	<i>C. frutescens</i> L.	Pimenta malagueta
Floradade	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomate (CNPH-0010)
Ponderosa	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomate (CNPH-0878)
Santa Clara	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomate (CNPH-0489)

Tabela 2. Severidade final (ID%) e Período de Incubação (PI) dos acessos de *Capsicum* e *Solanum* avaliados com dois isolados de *Stemphylium lycopersici*.

Acessos	EH-2800				EH-2811			
	^a PI		^b ID (%)		PI		ID (%)	
Jalapeño TopSeed	16	A g	0,0	A a	16	A g	0,0	A a
CNPH-3839	16	A g	0,0	A a	16	A g	0,0	A a
Floradade	16	A g	0,0	A a	16	A g	0,0	A a
162 OR-5	16	A g	0,0	A a	7	B e	12,5	A b
CNPH-0678	7	B c	10,9	A a	9	A f	14,1	A b
Ikeda	9	A d	25,0	A b	9	A f	17,2	A b
161 OR Feltrin	13	A f	31,3	A b	7	B e	25,0	A c
Pimenta andina TopSeed	7	B c	3,1	B a	9	A f	28,1	A c
101 OR-1	9	A d	40,6	A c	7	B e	32,8	A c
108 OR-4	9	A d	25,0	A b	7	B e	32,8	A c
CNPH-0148	7	A c	54,7	A d	7	A e	35,9	B c
155 OR-2	9	A d	31,3	A b	7	B e	37,5	A c
113 OR-1	7	A c	54,7	A d	7	A e	40,6	B c
115 OR-1	9	A d	25,0	B b	6	B d	40,6	A c
158 OR-2	11	A e	31,3	A b	7	B e	40,6	A c
106 OR-5	7	A c	64,1	A d	7	A e	50,0	B d
148 OR-2	7	A c	76,6	A e	7	A e	51,6	B d
CNPH-0290	7	A c	53,1	A d	6	B d	51,6	A d
154 OR-1	9	A d	37,5	B c	5	B c	59,4	A e
BRS Nandaia	5	A b	71,9	A e	4	B a	60,9	A e
BRS Araçari	5	A b	82,8	A f	5	A c	62,5	B e
CNPH-4631	7	A c	98,4	A g	6	B d	62,5	B e
CNPH-0143	5	A b	45,3	B c	5	A c	65,6	A e
BRS Moema	4	A a	62,5	A d	4	A a	67,2	A e
BRS Tui	4	B a	54,7	A d	5	A c	67,2	A e
CNPH-4163	4	A a	75,0	A e	4	A a	68,8	A e
BRS Biguatinga	4	A a	84,4	A f	4	A a	70,3	B e
CNPH-4133	5	A b	57,8	A d	5	A b	70,3	A e
BRS Seriema	5	A b	73,4	A e	5	A c	78,1	A f
CNPH-3445	9	A d	54,7	B d	5	B c	79,7	A f
BRS Juruti	4	A a	87,5	A f	4	A a	79,7	A f
Santa Clara	4	A a	73,4	A e	4	A a	81,3	A f
CNPH-4570	4	A a	78,1	A e	4	A a	85,9	A g
CNPH-4134	5	A b	87,5	A f	5	A c	93,8	A g
Ponderosa	4	A a	100,0	A g	4	A a	93,8	A g
CNPH-4135	5	A b	93,8	A g	4	B a	98,4	A g
CNPH-3833	4	A a	100,0	A g	4	A a	100,0	A g
CNPH-3837	4	A a	100,0	A g	4	A a	100,0	A g
CNPH-4568	4	A a	100,0	A g	4	A a	100,0	A g
CNPH-3835	4	A a	78,1	B e	4	A a	100,0	A g

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na vertical ou por letras minúsculas na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($p>0,05$). ^a Período de incubação (PI), Os genótipos que não demonstravam sintomas da mancha de stemphylium tiveram o PI ajustados para 16 dias. ^b Índice da doença (ID), proposto por McKinney (1923).

Tabela 3. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) dos acessos de *Capsicum* spp. inoculados com o isolado EH-2811 de *Stemphylium lycopersici*.

Acessos	Espécie	AACPD*
Jalapeño TopSeed	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	0,00 a
CNPH-3839	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	0,00 a
Floradade (gene <i>Sm</i>)	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,00 a
CNPH-0678	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	85,94 a
162 OR-5	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	137,50 b
Ikeda	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	156,25 b
155 OR-2	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	175,00 b
CNPH-0290	<i>C. chinense</i>	185,94 b
Pimenta andina TopSeed	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	215,63 b
108 OR-4	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	220,31 b
CNPH-4631	<i>C. frutescens</i>	240,63 b
161 OR Feltrin	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	275,00 c
101 OR-1	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	285,94 c
113 OR-1	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	287,50 c
106 OR-5	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	331,25 c
115 OR-1	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	337,50 c
158 OR-2	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	340,63 c
148 OR-2	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	351,56 c
CNPH-0148	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	395,31 d
CNPH-0143	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	421,88 d
154 OR-1	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	434,38 d
BRS Nandaia	<i>C. chinense</i>	454,69 d
BRS Araçari	<i>C. chinense</i>	475,00 d
CNPH-4133	<i>C. chinense</i>	545,31 e
BRS Tui	<i>C. chinense</i>	554,69 e
BRS Biguatinga	<i>C. chinense</i>	576,56 e
BRS Seriema	<i>C. chinense</i>	603,13 e
CNPH-3445	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	620,31 e
CNPH-4163	<i>C. chinense</i>	693,75 f
BRS Moema	<i>C. chinense</i>	735,94 f
Santa Clara	<i>Solanum lycopersicum</i>	746,88 f
CNPH-4134	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	756,25 f
BRS Juruti	<i>C. chinense</i>	770,31 f
CNPH-4570	<i>C. chinense</i>	770,31 f
CNPH-3835	<i>C. frutescens</i>	884,38 g
Ponderosa	<i>Solanum lycopersicum</i>	900,00 g
CNPH-3837	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	925,00 g
CNPH-4135	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	967,19 h
CNPH-3833	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	1012,50 h
CNPH-4568	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	1046,88 h

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($p>0,05$).

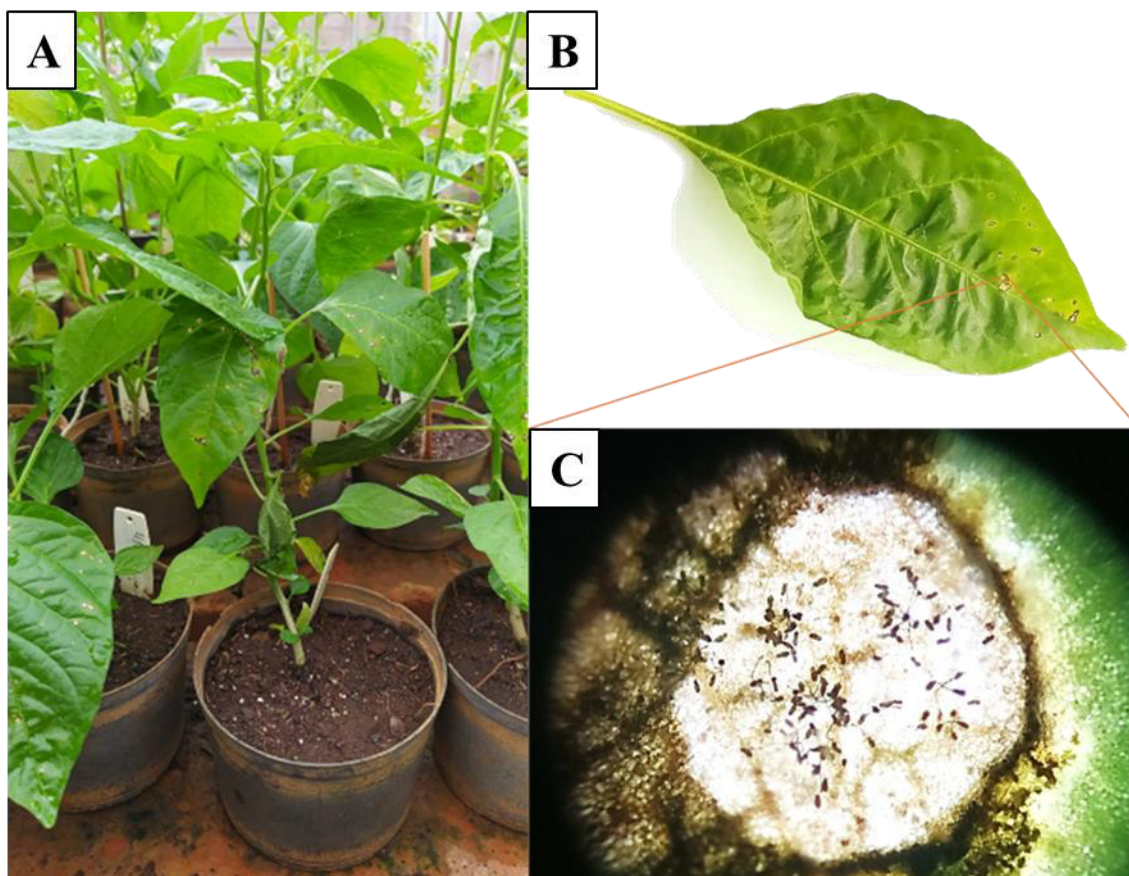


Figura 1 – (A) Planta de pimenta, inoculada, com sintomas de mancha de stemphylium; (B) Lesões em folha de em um acesso de *Capsicum* e (C) Profusa produção de esporos de *Stemphylium lycopersici*, visualizada via microscópio estereoscópio.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES GERAIS

Conclusões Gerais

1. *Stemphylium lycopersici* é a principal espécie causadora da mancha de stemphylium no tomateiro e em outras solanáceas (excetuando o jiló), sendo detectado em todas as macrorregiões do Brasil;
2. Isolados de *S. lycopersici* apresentaram um amplo círculo plantas de hospedeiras, infectando diversas espécies de Solanaceae cultivadas, silvestres e invasoras;
3. Foram encontrados 27 acessos resistentes a mancha de stemphylium, sendo 13 da espécie *S. habrochaites*, 13 da *S. peruvianum* e apenas 1 da *S. pimpinellifolium*;
4. A resistência encontrada em *S. habrochaites* 'PI 127827' indicou o envolvimento de dois novos genes dominantes independentes e complementares;
5. Os acessos 'Jalapeño TS' e *C. annuum* var. *glabriusculum* 'CNPH-3839' apresentaram reação de imunidade a dois isolados de *S. lycopersici*, podendo ser considerados boas fontes de resistência para esse patógeno.