

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS JABOTICABAL**

***Bremia lactucae*: MONITORAMENTO, DINÂMICA  
POPULACIONAL E SENSIBILIDADE A  
FUNGICIDAS**

**Carolina Andrade Franco**

Engenheira Agrônoma

**2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS JABOTICABAL**

***Bremia lactucae*: MONITORAMENTO, DINÂMICA  
POPULACIONAL E SENSIBILIDADE A  
FUNGICIDAS**

**Carolina Andrade Franco**

**Orientadora: Profa. Dra. Leila Trevisan Braz**

**Coorientadores: Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi**

**Prof. Dr. Richard Michelmore**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

**2020**

F825b

Franco, Carolina Andrade

Bremia lactucae: monitoramento, dinâmica populacional e sensibilidade a fungicidas / Carolina Andrade Franco. -- Jaboticabal, 2020

62 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Leila Trevisan Braz

Coorientadora: Rita de Cássia Panizzi

1. Lactuca sativa L.. 2. Dm genes. 3. Míldio da alface. 4. Resistência genética. 5. Resistência a fungicidas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** *Bremia lactucae*: MONITORAMENTO, DINÂMICA POPULACIONAL E SENSIBILIDADE À FUNGICIDAS

**AUTORA:** CAROLINA ANDRADE FRANCO

**ORIENTADORA:** LEILA TREVISAN BRAZ

**COORIENTADOR:** RICHARD MICHELMORE

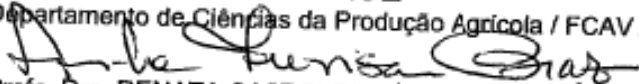
**COORIENTADORA:** RITA DE CÁSSIA PANIZZI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



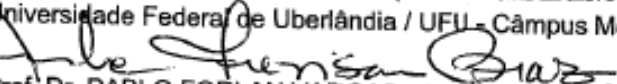
Profa. Dra. LEILA TREVISAN BRAZ

Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV / UNESP - Jaboticabal



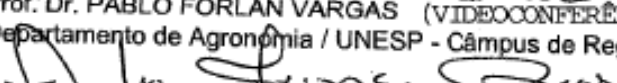
Profa. Dra. RENATA CASTOLDI (VIDEOCONFERÊNCIA)

Universidade Federal de Uberlândia / UFU - Câmpus Monte Carmelo, MG



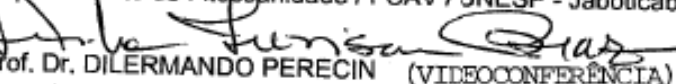
Prof. Dr. PABLO FORLAN VARGAS (VIDEOCONFERÊNCIA)

Departamento de Agronomia / UNESP - Câmpus de Registro/SP



Pós-doutoranda FERNANDA DIAS PEREIRA (VIDEOCONFERÊNCIA)

Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. DILERMANDO PERECIN (VIDEOCONFERÊNCIA)

Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de maio de 2020

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

CAROLINA ANDRADE FRANCO – nascida em 31 de agosto de 1990, na cidade de Uberlândia, localizada no estado de Minas Gerais, filha de Ilce Robsany Andrade Franco e Carlos Franco Souza. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica em março de 2008, na Universidade Federal de Uberlândia, graduando-se em outubro de 2013. Durante a graduação foi bolsista de projeto de extensão, realizando também monitorias e estágios. Realizou o estágio supervisionado obrigatório na Universidade da Flórida, nas áreas de olericultura e fitopatologia. Em fevereiro de 2016 obteve o título de mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista CAPES, sob orientação da Profa. Dra. Leila Trevisan Braz. Em 2016 iniciou o curso de doutorado pelo mesmo programa, como bolsista CAPES, realizando parte da sua formação na Universidade da Califórnia, em Davis, sob a orientação do Professor Richard Michelmore, pelo Programa Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE). Atualmente é responsável pelo programa de melhoramento genético de alface da Agristar do Brasil, onde busca desenvolver cultivares adaptadas ao clima brasileiro e principalmente, resistentes às raças de míldio identificadas no Brasil.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todos os dias me dar a o privilégio da vida e por todas as graças que Ele me concede diariamente.

Aos meus pais, Ilce e Carlos, meus melhores amigos, meu cerne, a razão de estar onde estou e de continuar lutando.

Aos meus avós e bisavós, pelas orações, torcidas e sacrifícios que a distância impõe.

Aos meus irmãos, Caio e Carlos, pelo apoio e por sempre me inspirarem a ir além. A toda a minha grande e amorosa família, por todo entusiasmo e suporte.

Ao meu namorado Eduardo, que me apoia todos os dias e me encoraja sempre a ser uma pessoa melhor.

Aos meus sogros e cunhados que sempre me apoiam nos pequenos e grandes detalhes.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP – FCAV), pela oportunidade de cursar uma das melhores pós-graduações do país, pela estrutura e professores, que foram fundamentais para o meu crescimento.

À Professora Dra. Leila, orientadora de vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço pela concessão da bolsa, que me permitiu realizar o curso de doutorado.

Ao Silvio Nakagawa e a empresa Agristar do Brasil Ltda. pela coleta e envio de isolados de míldio da alface, os quais foram essenciais para realização deste trabalho.

Aos Professores Doutores Rita de Cássia Panizzi e Richard Michelmore, por todo auxílio e paciência diante às inúmeras dúvidas.

Aos meus amigos Carlos Caprio e Larissa por todo zelo e companheirismo ao longo dos últimos anos de “Bremia”.

Ao Marcus Vinícius (Sr. Batata), meu amigo irmão, que está sempre presente mesmo com toda distância.

Aos meus amigos da “Horta”, Edgard, Renato, Lívia, Edicleide, Marcos, Renan e outros Neonzinhos que também passaram pelo meu caminho, pelo companheirismo e ajuda nessa travessia.

Aos meus velhos e bons amigos, que independente da distância e do tempo, me suportam de onde estiverem.

Aos novos amigos que fiz em Jabuca, Cássia, Matheus (Peão), Nádia, João, Paloma, Anderson (Zang) e Cíntia por toda amizade e companheirismo, principalmente nas horas mais duras.

Aos funcionários do Setor de Olericultura e Plantas Aromático-Medicinais, Inauro e Reinaldo Aparecido (Tilápia), por toda ajuda, dedicação e disponibilidade.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e sugestões para o engrandecimento do trabalho.

A todos que de uma forma indireta contribuíram na minha trajetória até aqui.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 A alface.....	2
2.2 O míldio.....	4
2.3 Variabilidade de <i>Bremia lactucae</i> e resistência a fungicidas.....	5
2.4 Resistência genética à <i>Bremia lactucae</i> .....	8
3 REFERÊNCIAS.....	9
CAPÍTULO 2 - Monitoramento e dinâmica populacional de <i>Bremia lactucae</i> nas regiões sul e sudeste do Brasil.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1 Coleta e multiplicação dos isolados de <i>Bremia lactucae</i> .....	18
2.2 Diferenciação e determinação dos códigos sextetos.....	20
2.3 Determinação da complexidade, diversidade e frequências nas populações de <i>Bremia lactucae</i> .....	21
3 RESULTADOS.....	22
3.1 Monitoramento de <i>Bremia lactucae</i> e fenótipos de virulência identificados.....	22
3.2 Distribuição dos genes ou fatores de virulência.....	27
3.3 Avaliação da complexidade e da diversidade das populações avaliadas de <i>Bremia lactucae</i> .....	29
4 DISCUSSÃO.....	30
5 CONCLUSÕES.....	37
6 REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 3 – Sensibilidade de <i>Bremia lactucae</i> a fungicidas utilizando dois métodos de aplicação.....	42
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1 Determinação da sensibilidade de um isolado de <i>Bremia lactucae</i> a três fungicidas.....	47



2.2 Determinação da sensibilidade de quatro isolados de <i>Bremia lactucae</i> a três fungicidas.....	49
2.3 Análise estatística .....	49
3 RESULTADOS .....	50
3.1 Determinação da sensibilidade de um isolado de <i>Bremia lactucae</i> a três fungicidas.....	50
3.2 Determinação da sensibilidade de quatro isolados de <i>Bremia lactucae</i> a três fungicidas.....	52
4 DISCUSSÃO .....	55
5 CONCLUSÕES .....	60
6 REFERÊNCIAS.....	60

## ***Bremia lactucae*: MONITORAMENTO, DINÂMICA POPULACIONAL E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS**

**RESUMO** - O míldio da alface causado pelo oomiceto *Bremia lactucae* representa uma das doenças mais importantes na cultura da alface. Sua variabilidade genética tem sido estudada no mundo. O monitoramento constante faz-se necessário pois torna possível avaliar a diversidade do patógeno, auxiliando no melhor uso das ferramentas disponíveis para controle de *B. lactucae*, como o uso de fungicidas e cultivares resistentes. Assim, objetivou-se com este trabalho monitorar, estudar a dinâmica populacional e determinar metodologias para a avaliação da sensibilidade dos isolados de *B. lactucae* a fungicidas. Isolados de *B. lactucae* foram coletados no Rio Grande do Sul em 2015, e no Paraná e São Paulo em 2016. Em relação a sensibilidade de *B. lactucae*, foram avaliados os fungicidas dimetomorfe, mandipropamida e oxathiapiprolin, submetidos a diferentes doses, aplicados diretamente nas folhas cotiledonares ou na raiz de plântulas de alface. As populações avaliadas de *B. lactucae* nos estados de Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo possuem semelhança, compartilhando nove dos 15 fatores de virulência avaliados. Foram encontrados 27 fenótipos de virulência, mas apenas os correspondentes aos códigos sextetos 31-00-00, 31-00-02, 31-01-00 e 31-01-02 foram mais frequentes neste estudo. Além disso, a reprodução clonal mostra-se como principal forma de propagação de *B. lactucae*. Os genes e fatores de resistência das cultivares Argelès (*Dm38*), Balesta e Bartoli podem ser recomendados como fontes de resistência para o melhoramento genético visando resistência ao míldio da alface para as três populações brasileiras avaliadas neste estudo. Em relação a sensibilidade dos fungicidas avaliados, mesmo na dose de 50 mg L<sup>-1</sup>, quando aplicado na raiz houve esporulação dos isolados avaliados. Já a dose de 10 mg L<sup>-1</sup> dos fungicidas dimetomorfe, mandipropamida e oxathiapiprolin, quando aplicados diretamente nas folhas foi suficiente para inibir a infecção causada pelo míldio da alface. Assim, a pulverização dos fungicidas nas folhas é mais confiável para a avaliação de sensibilidade de *B. lactucae* em condições similares às avaliadas no presente trabalho.

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa* L., *Dm* genes, míldio da alface, resistência genética, resistência a fungicidas.

## ***Bremia lactucae*: MONITORING, POPULATION DYNAMIC AND SENSITIVITY TO FUNGICIDES**

**ABSTRACT-** Lettuce downy mildew caused by the oomycete *Bremia lactucae* represents one of the most important diseases in lettuce culture. Its genetic variability has been studied worldwide. Constant monitoring is necessary because it makes it possible to assess the diversity of the pathogen, helping to make the best use of the tools available to control *B. lactucae*, such as the use of fungicides and resistant cultivars. Thus, the aim of this work was to monitor, study population dynamics and determine methodologies for assessing the sensitivity of *B. lactucae* isolates to fungicides. Isolates of *B. lactucae* were collected in Rio Grande do Sul in 2015, and in Paraná and São Paulo in 2016. Regarding the sensitivity of *B. lactucae*, dimethomorph, mandipropamid and oxathiapiprolin fungicides were evaluated, submitted to different doses, applied directly on cotyledons leaves or on the root. The populations evaluated for *B. lactucae* in the states of Paraná, Rio Grande do Sul and São Paulo are similar, sharing nine of the 15 virulence factors evaluated. 27 virulence phenotypes were found, but only those corresponding to the sextet codes 31-00-00, 31-00-02, 31-01-00 and 31-01-02 were more frequent in this study. In addition, clonal reproduction seems to be the main propagation of *B. lactucae*. The genes and resistance factors of the cultivars Argelès (*Dm38*), Balesta and Bartoli can be recommended as sources of resistance for genetic improvement aiming resistance to lettuce downy mildew for the three Brazilian populations evaluated in this study. Regarding the sensitivity of the evaluated fungicides, even at the dose of 50 mg L<sup>-1</sup>, when applied to the root, there was sporulation of the evaluated isolates. The 10 mg L<sup>-1</sup> dose of the fungicides dimethomorph, mandipropamid and oxathiapiprolin, when applied directly to the leaves, was enough to inhibit the infection caused by lettuce downy mildew. Thus, the spraying fungicides on the leaves is more reliable for assessing the sensitivity of *B. lactucae* under conditions similar to those evaluated in the present study.

**Keywords:** *Lactuca sativa* L., *Dm* genes, lettuce downy mildew, genetic resistance, fungicide resistance.

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa, economicamente mais importante para o Brasil, além de ser de grande importância social na agricultura familiar e para a alimentação humana. O cultivo dessa hortaliça possibilita obter elevada produção por hectare, por possuir ciclo curto, tornando-se atividade atrativa e de alta rentabilidade para o pequeno produtor (Araújo, 2010).

Entretanto, pode ser acometida por inúmeras doenças que reduzem sua produção. Uma das principais doenças que ocorre na alface mundial na estação do inverno, é o míldio da alface, cujo agente causal é o oomiceto *Bremia lactucae* Regel (IPM, 2001; Lebeda et al., 2002; Michelmore e Wong, 2008). Na região sul e sudeste do Brasil, nos períodos em que o clima é mais ameno, esta doença provoca grandes perdas. Trata-se de um patógeno com grande variabilidade, apresentando várias raças/fenótipos de virulência (Crute, 1992; Lebeda et al., 2002, Töfoli et al., 2014).

Em 1998, com o intuito de padronizar procedimentos para identificação e classificação da variação populacional europeia de *B. lactucae*, foi criado, por pesquisadores de empresas públicas e privadas na Europa, o “International Bremia Evaluation Board” (IBEB), (Guenard et al., 1999; van Ettehoven e van der Arend, 1999). Definiu-se assim um conjunto de cultivares diferenciadoras, as quais são periodicamente atualizadas; bem como protocolos para determinação dos fenótipos de virulência e denominação das raças. Na Europa, mais de 100 padrões de virulência diferentes são encontrados a cada ano e 36 raças de *B. lactucae* foram denominadas (ISF, 2020).

Em contrapartida, no Brasil, o Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento (NEOM) da UNESP-FCAV, tem pesquisado o míldio da alface no estado de São Paulo desde 2003, tendo identificado até 2015, 17 fenótipos de virulência de *B. lactucae* (Braz et al., 2007; Souza et al., 2011; Castoldi et al., 2012; Galatti et al., 2012; Franco, 2016; Nunes et al., 2016; Marin et al., 2019).

A interação entre alface e *B. lactucae* é baseada na relação gene-a-gene, sendo que genes de resistência da alface (*Dm* ou *FR*) correspondem a fatores de

avirulência no patógeno (*Avr*) (Crute, 1992; Lebeda et al., 2002; Bueno et al., 2006; Lebeda et al., 2007). Portanto, esse tipo de resistência é monogênica dominante, completa ou qualitativa, também sendo denominada de resistência vertical. Até o momento, pelo menos 52 genes *Dm* ou FR são descritos (Crute, 1992; Michelmore e Wong, 2008; Parra et al., 2016; ISF, 2020). Assim, entender a dinâmica populacional do míldio nas regiões produtoras é de fundamental importância, a fim de recomendar genes de resistência (*Dm*) para o desenvolvimento de cultivares de alface resistentes à *B. lactucae*.

O uso de cultivares resistentes é a alternativa de controle mais eficiente pois, representa menor custo ao produtor e é ambientalmente correto, por reduzir a utilização de produtos fitossanitários (Vargas et al., 2012). Contudo, a falta de informação sobre cultivares resistentes aos comportamentos de míldio encontrados nas regiões produtoras, ainda desfavorece o seu uso.

A utilização de proteção química apresenta uma série de inconvenientes como, a persistência de resíduos, altos custos, baixa eficiência - dado o ciclo de cultivo curto - e a alta pressão de seleção sobre o patógeno, favorecendo a seleção de linhagens resistentes a fungicidas (Schettini e Michelmore, 1991; Brown et al., 2004). No entanto, essa ainda é a ferramenta mais utilizada pelos produtores de alface.

No Brasil, o custo com insumos para a produção de 1.600 engradados ha<sup>-1</sup> de alface é R\$ 6.080,45, sendo que 626,00 (10,29%) do valor total, são gastos apenas com fungicidas (AGRIANUAL, 2020). Até o presente momento, não foi realizado nenhum estudo no Brasil quanto a ocorrência de resistência do míldio da alface a fungicidas. Tais estudos, são extremamente necessários pois poderiam evitar o uso de produtos fitossanitários ineficazes, além de auxiliar no manejo contra desenvolvimento de novas resistências do patógeno no campo.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho monitorar, estudar a dinâmica populacional e determinar metodologias para a avaliação da sensibilidade dos isolados de *B. lactucae* a fungicidas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A alface**

A alface, *Lactuca sativa* L., é a principal hortaliça folhosa consumida no mundo. Pertence à família Asteraceae e ao gênero *Lactuca*, possuindo este, mais de 100 espécies. Apesar da grande variabilidade dentro desse gênero, apenas a espécie *L. sativa* é cultivada no mundo.

O centro de distribuição da sua biodiversidade está na Ásia, e é na região do Egito, desde 4500 a.C., onde têm-se os primeiros relatos de *L. sativa* sendo consumida como alimento (Lindqvist, 1960; Lebeda et al., 2004).

Sobre a origem exata de *L. sativa*, a teoria mais aceita seria a que *L. sativa* seria descendente direta de *L. serriola* (Lindqvist, 1960). Atualmente devido ao cultivo sistemático de *L. sativa*, aliado ao melhoramento no início do século XIX, a alface tornou-se uma espécie extremamente variável, morfológica e geneticamente (Lebeda et al., 2008).

O uso de alface na Europa Ocidental teve início no século XV, sendo os tipos: lisa, batávia e romana os cultivados na época. Provavelmente com as expedições de Cristóvão Colombo para o Novo Mundo, a alface foi introduzida na América em 1494 e, em 1650 no Brasil, pelos portugueses (Sala e Costa, 2012).

Os principais tipos de alface cultivados no Brasil são: lisa, crespa, crocante, mimosa, romana e americana. As cultivares crespas representam mais de 50% dos materiais cultivados no Brasil e apresentam maior aceitação pelo mercado consumidor. A alface americana, que teve sua introdução por volta de 1989, tem apresentado maior consumo nos últimos anos e representa quase 30% das sementes comercializadas de alface (Sala e Costa, 2012, ABCSEM, 2017).

A alface é uma cultura que se desenvolve bem em condições de clima ameno, sendo que temperaturas mais elevadas aceleram seu ciclo, podendo resultar no pendoamento precoce (Henz e Suinaga, 2009). O desenvolvimento de cultivares tropicalizadas foi o primeiro desafio da cultura para os melhoristas brasileiros (Sala e Costa, 2012).

Essa hortaliça pode ser cultivada utilizando-se diversos sistemas de produção, sendo produzida principalmente em regiões próximas aos centros consumidores. O maior volume comercializado de alface está na região Sudeste, nos estados de São Paulo (31%), Rio de Janeiro (27%) e Minas Gerais (7%). Em São Paulo, as maiores áreas de produção estão localizadas na região do Cinturão Verde de São Paulo (região que compreende Biritiba Mirim, Salesópolis e Mogi das

Cruzes) e Piedade e Ibiúna, próximas a Sorocaba. Somente na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), cerca de 49.880 toneladas foram comercializadas entre janeiro e dezembro de 2018 (AGRIANUAL, 2020).

No Rio de Janeiro, a produção se concentra na região serrana estado, com maior volume de produção nos municípios de Teresópolis (83,67%), Sumidouro (7,97%) e Nova Friburgo (2,23%). Em 2019, 112.124,70 toneladas foram produzidas nesse estado (EMATER-Rio, 2020).

Já em Minas Gerais, os principais produtores estão localizados na região metropolitana de Belo Horizonte (Silva et al., 2015), como nos municípios de Mario Campos e Caeté (Anuário 2018 | 2019, 2019).

A alface também é cultivada em outros estados brasileiros, porém com menor expressividade. No Paraná em 2019, em área de 6.893 hectares foram produzidas 144.853 toneladas de alface, estando entre as seis principais hortaliças produzidas no estado (DERAL, 2020). A produção de alface nesse estado está concentrada próxima a Curitiba, nos municípios de São José dos Pinhais e Colombo.

No Rio Grande do Sul a produção de hortaliças concentra-se em pequenas propriedades e agricultores familiares (EMATER-RS, 2020) de regiões conforme o clima. Durante o verão a produção se concentra na região serrana do estado, próxima ao município de Caxias do Sul. No inverno, a produção é realizada mais próxima ao litoral, nas regiões de Terra de Areia, onde o clima é mais ameno nesse local.

## 2.2 O míldio

O míldio, causado pelo oomiceto (Peronosporaceae) *Bremia lactucae* Regel, é uma das principais doenças na cultura da alface e ocorre tanto em campo quanto em cultivo protegido, sendo mais limitante em regiões onde predominam condições de baixa temperatura e longos períodos de molhamento foliar (Lopes et al., 2010). Trata-se ainda de patógeno obrigatório, biotrófico e com alto nível de especificidade de hospedeiro, infectando apenas espécies do gênero *Lactuca* (Lebeda, 2001; Thines et al., 2010).

No Brasil, a partir da metade da década de 90, essa doença passou a causar sérios prejuízos na cultura da alface. Existem duas hipóteses levantadas para a introdução desse patógeno: a primeira é que esta doença foi introduzida com a importação de alface americana da Califórnia (USA) e da Espanha, com início das redes de “fast-food” no país, já que esse tipo de alface ainda não era cultivado na época; a segunda hipótese seria que esta doença já ocorreria naturalmente nas condições brasileiras (Souza, 2009).

O ciclo de infecção desta doença é do tipo policíclico, assim, a redução do inóculo inicial apresenta efeito limitado no desenvolvimento máximo da doença, uma vez que a progressão de multiplicação de novas infecções é geométrica, resultando em rápido aumento da doença em sua fase crítica (Vale et al., 2004). A intensidade da doença pode variar de acordo com a época de plantio e o manejo da cultura (Lopes et al., 2010).

Em geral, o controle efetivo do míldio da alface é obtido pela combinação de cultivares resistentes, aplicações frequentes de fungicidas e práticas culturais que reduzem o período de molhamento das folhas. No entanto, o uso de proteção química apresenta inconvenientes como: persistência de resíduos nas plantas e no solo, altos custos e aumento da pressão de seleção sobre o patógeno – que provoca o favorecimento da ocorrência de isolados resistentes a fungicidas (Schettini e Michelmore, 1991; Brown et al., 2004; Xu, 2011; Petrželová et al., 2013; van Hese et al., 2016).

Os produtos fitossanitários registrados no Brasil para o controle do míldio da alface são no geral de contato ou localmente sistêmicos. Os principais ingredientes ativos utilizados são: fenamidona, ciazofamida, bentiavalicarbe isopropílico + clorotalonil, fluopicolide + cloridrato de propamocarbe, dimetomorfe e mandipropamida (Agrofit, 2020).

### **2.3 Variabilidade de *Bremia lactucae* e resistência a fungicidas**

O grande desafio observado em *B. lactucae* refere-se a sua alta variabilidade genética, que é observada pela ocorrência de raças fisiológicas e de insensibilidade a fungicidas (Schettini e Michelmore, 1991; Brown et al., 2004; Xu, 2011; Castoldi et al., 2012; Petrželová et al., 2013; van Hese et al., 2016). Portanto, populações de



*B. lactucae* são altamente adaptáveis, com múltiplas fontes de variação, tornando o manejo do míldio altamente desafiador.

*Bremia lactucae* é um patógeno heterotático, que requer tipos opostos sexuais (“mating type”, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>), para que ocorra reprodução sexuada, sendo que sua ocorrência pode gerar novos fenótipos de virulência (Michelmore e Ingram, 1980). Tsuchida (2017) ao avaliar isolados de *B. lactucae* coletados em campos de produções americanos, identificou aumento da ocorrência de isolados do tipo B<sub>1</sub>, o que coincidiu com maior número de fenótipos de virulência, sugerindo que a reprodução sexual poderia estar ocorrendo e aumentando a variabilidade encontrada na população. Na Europa os dois “mating types” estão presentes e representam papel significativo na variação do patógeno (Lebeda e Blok, 1990). No Brasil ainda existe a carência de estudos nesse sentido a fim de identificar os fatores que contribuem para a variabilidade encontrada na população de *B. lactucae*.

Apesar da comprovação dos tipos sexuais causando variabilidade, a formação de novas raças também pode ocorrer por mecanismos como fusão somática e migração entre curtas e longas distâncias (Tsuchida, 2017).

Com objetivo de estudar e unir as informações encontradas sobre o míldio da alface, em 1998 foi criado o “International Bremia Evaluation Board” (IBEB). Tal comitê foi estabelecido por pesquisadores de empresas públicas e privadas da Europa, a fim de padronizar procedimentos para identificação e classificação de variação em populações europeias de *B. lactucae* (Guenard et al., 1999; van Ettehoven e van der Arend, 1999). Na Europa, mais de 100 padrões de virulência diferentes são encontrados a cada ano e 36 raças de *B. lactucae* já foram denominadas (ISF, 2020). Além dessa iniciativa, grupos de pesquisa dos Estados Unidos da América, República Tcheca, Austrália, Japão e de diversos países europeus também têm monitorado e acompanhado as populações de *B. lactucae* (Lebeda e Zinkernagel, 2003; Nishiguchi e Futai, 2010; Trimboli e Nieuwenhuis, 2011; Petrželová et al., 2013, Nordskog et al., 2014; Tsuchida, 2017).

No oeste dos EUA, pesquisadores da Universidade da Califórnia têm monitorado e arquivado isolados de *B. lactucae* da Califórnia e do Arizona desde 1982 (Tsuchida, 2017). Tal iniciativa compõe o IBEB-US.

Outros grupos também acompanharam populações de *B. lactucae* na Europa, a fim de avaliar a distribuição e variação da virulência e,

consequentemente, recomendam genes de resistência (*Dm*) para obtenção de novas cultivares de alface (Lebeda e Zinkernagel, 2003; Trimboli e Nieuwenhuis, 2011; Petrželová et al., 2013; Nordskog et al., 2014; Nishiguchi e Futai, 2010).

Recentemente, os esforços do IBEB-EU e IBEB-US uniram-se formalmente operando sob a organização guarda-chuva IBEB-Global (IBEB-G) (ISF, 2020). Isto significa grande progresso na compreensão da dinâmica de *B. lactucae*, não só para a Europa e Estados Unidos, mas também para os outros países que também realizam este trabalho.

Desde 2003, a população de *B. lactucae* tem sido monitorada no Brasil no estado de São Paulo. Apenas em 2005, houve uma pausa dessas atividades. As coletas e o monitoramento têm sido realizados pelos alunos do Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento (NEOM), sob a supervisão da Profa. Dra. Leila Trevisan Braz, da Universidade Estadual Paulista, do Câmpus de Jaboticabal (UNESP-FCAV). No total, mais de 600 isolados foram avaliados até 2015, sendo identificados 17 raças/fenótipos de virulência (Marin et al., 2019).

Nos anos de 2003 e 2004, a primeira raça foi identificada e denominada SPBI:01 (Braz et al., 2007). Posteriormente, em 2006 e 2007, foram encontradas outras três raças, que se denominaram: SPBI:02, SPBI:03 e SPBI:04 (Souza et al., 2011). Em 2008, 2009 e 2010, mais três novas raças foram identificadas: SPBI:05, SPBI:06 e SPBI:07 (Castoldi et al., 2012). Em 2011, foram encontradas mais duas: SPBI:08 e SPBI:09 (Galatti et al., 2012). Em 2012 e 2013, foram detectadas mais três novas raças: SPBI:10, SPBI:11 e SPBI:12 (Nunes et al., 2016). Em 2014, novas raças foram identificadas: SPBI:13, SPBI:14, SPBI:15 e SPBI:16. E em 2015, identificou-se a SPBI:17 (Marin et al., 2019).

Além do estado de São Paulo, no ano de 2010 isolados de *B. lactucae* coletados em Minas Gerais foram avaliados e raças semelhantes às de São Paulo foram identificadas, sendo: SPBI:01, SPBI:03, SPBI:04 e SPBI:06 (Vargas et al., 2010).

Durante 13 anos de monitoramento, observou-se que a população de *B. lactucae* em São Paulo tornou-se cada vez mais diversificada, com a ocorrência gradual de novos fenótipos de virulência. Até 2013, nenhum dos padrões encontrados no Brasil correspondia aos relatados em outros países. Entretanto, em 2014 o fenótipo de virulência SPBI:17, que possui o mesmo padrão de virulência

que BI:21EU, passou a ser observado na população de *B. lactucae*, provenientes do estado de São Paulo de *B. lactucae* (Marin, 2016; Marin et al., 2019).

Além das inúmeras raças fisiológicas existentes, isolados de *B. lactucae* do mundo todo têm apresentado insensibilidade a fungicidas. O primeiro fungicida em que houve esse comportamento foi o metalaxil, do grupo das fenilamidas. Por muitos anos esse produto foi utilizado indiscriminadamente, não só para o controle de *B. lactucae*, mas também no controle de *Pseudoperonospora cubensis*, *Phytophthora infestans*, *Plasmopara vitícola*, *Peronospora tabacina*, *P. cinnamomi*, *P. parasitica*, *Pythium* spp., *Plasmopara halstedii*, *P. erythroseptica*, *Peronospora viciae* e *P. destructor* (Schettini et al., 1991; Crute, 1992; Wicks et al., 1994; Brown et al., 2004, Gisi e Sierotzki, 2008).

Após falhas de outros fungicidas como fosetil-alumínio e maneb (Brown et al., 2004), novos fungicidas como: mandipropamida dimetomorfe, bentiavalicarb e iprovalicarb passaram a serem monitorados constantemente, principalmente por esses novos fungicidas também atuarem em sítios específicos do patógeno, o que gera maior pressão de seleção (Cohen et al., 2008; Cohen, 2020).

Apesar da grande importância desse tipo de estudo, até o presente momento, nenhum estudo no Brasil foi realizado no sentido de identificar isolados de míldio resistentes a fungicidas.

## **2.4 Resistência genética à *Bremia lactucae***

Vários mecanismos genéticos de resistência à *B. lactucae* foram identificados em espécies de *Lactuca* (Lebeda et al., 2002). A maior parte dos programas de melhoramento de alface tem utilizado os de raça-específica para buscar tal resistência (Lebeda et al., 2002 e 2007). A resistência é conferida quando genes de resistência dominante (genes *Dm* = Downy mildew) combinam com genes de avirulência (*Avr* genes) do patógeno. Em outras palavras, a combinação de um gene *Dm* e de um gene *Avr* resulta em interação incompatível, expresso como hipersensibilidade do hospedeiro. Cinquenta e um genes distintos que podem conferir resistência ao míldio da alface, são conhecidas até agora (Crute e Lebeda, 1981; Michelmore e Wong, 2008; Parra et al., 2016).

Os genes *Dm* fornecem resistência, no entanto, eles são eficazes apenas temporariamente até que novos genes *Avr* ocorram dentro da população do patógeno. Portanto, o controle permanente do míldio da alface, requer fornecimento contínuo de novos genes de resistência (Lebeda et al., 2007). Outra recomendação para diminuir o risco de quebra rápida da resistência, consiste no uso frequente de cultivares de alface com diferentes genes *Dm*/fatores de resistência, a fim de diminuir a pressão de seleção exercida pelo uso consecutivo dos mesmos (Petrželová et al., 2013).

Programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares de alface resistentes ao míldio, devem considerar a distribuição dos genes *Avr* nas populações do patógeno em cada região produtora. Portanto, é fundamental caracterizar quais são as principais raças/fenótipos de virulência e assim, selecionar genes *Dm* adequados para cada região (Lebeda e Zinkernagel, 2003).

O desenvolvimento de cultivares de alface resistentes ao míldio pode ser então baseado em genes *Dm* distribuídos em genótipos individuais, ou utilizando-se de piramidação de mais de um gene em um mesmo genótipo. Essa técnica visa aumentar os obstáculos necessários para que *B. lactucae* quebre a resistência de uma cultivar, tornando a mais durável (Parra et al., 2016).

### 3 REFERÊNCIAS

Agriannual 2020: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2020. p. 110-112.

Agrofit (2020) Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 20 mai. 2020.

Anuário 2018 | 2019 - Retrospectiva 2018 e Perspectiva 2019. São Paulo: CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - ESALQ/USP, 2019. p. 23-24.

Araújo JC (2010) **Resistência de genótipos de alface ao míldio**. 2010. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 63 p.

Braz LT, Dalpian T, Camargo M, Pissardi MA (2007) Identification of races of *Bremia lactucae* in São Paulo, Brazil. **Acta Horticulturae** 760:317–322.

Brown S, Koike ST, Ochoa OE, Laemmlen F, Michelmore RW (2004) Insensitivity to the fungicide fosetyl-aluminum in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. **Plant Disease**: 88:502-508.

- Bueno LCS, Mendes ANG, Carvalho SP (2006) **Melhoramento Genético de Plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 319 p.
- Castoldi R, Charlo HCO, Dalpian T, Melo DM, Botelho AP, Braz LT (2012) Identification of new *Bremia lactucae* races in lettuce in São Paulo state. **Horticultura Brasileira** 30:209–213.
- Cohen Y (2008) Activity of carboxylic acid amide (CAA) fungicides against *Bremia lactucae*. **European Journal of Plant Pathology** 122:169-183.
- Cohen Y (2020) Root treatment with oxathiapiprolin, bentiavalicarb or their mixture provides prolonged systemic protection against oomycete foliar pathogens. **PLoS One** 15 (1): e0227556. <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0227556>>.
- Crute IR (1992) The role of resistance breeding in the integrated control of downy mildew (*Bremia lactucae*) in protected lettuce. **Euphytica** 63:95–102.
- Crute IR, Johnson AG (1976) Breeding for resistance to lettuce downy mildew, *Bremia lactucae*. **Annals of Applied Biology**. 84(2): 287-290.
- DERAL - Departamento de Economia Rural (2020) OLERICULTURA: Análise da conjuntura. Paraná: Secretaria da agricultura e do Abastecimento, p. 3.
- EMATER-Rio - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio de Janeiro (2020). Relatório de Acompanhamento Sistemático da Produção Agrícola – ASPA, 2019. Disponível em <<http://www.emater.rj.gov.br/images/cul2019.htm>>. Acesso em 20 mai. 2020.
- EMATER-RS – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio Grande do Sul (2020). Olericultura. Disponível em: <<http://www.emater.tche.br/site/area-tecnica/sistema-de-producao-vegetal/olericultura.php#.XwvtvTShKjIU>>. Acesso em 20 mai. 2020.
- Franco CA (2016) **Monitoramento de raças de *Bremia lactucae* em alface no ano de 2014 e sua distribuição no Estado de São Paulo**. 34 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Unesp, Jaboticabal.
- Galatti FS, Castoldi R, Braz LT, Panizzi RC (2013) Monitoramento de raças de *Bremia lactucae* em 2010 e 2011 no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica** 38: 271–279.
- Gisi U, Sierotzki H (2008) Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology** 122:157–167.
- Guenard M, Cadot V, Boulineau F, de Fontanges H (1999). **Collaboration between breeders and GEVES-SNES for the harmonization and evaluation of a disease resistance test: *Bremia lactucae* of the lettuce**. In: Lebeda A, Krístková E (Eds). *Eucarpia Leafy Vegetables*. Olomouc: Palacký University, p. 177 –181.
- Henz GP, Suinaga F (2009) Comunicado Técnico 75. **Tipos de alface cultivadas no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 7 p.
- IPM (2001) Crop Profile for Lettuce in California. Integrated Pest Management. Disponível em <<http://www.ipmcenters.org/cropprofiles/docs/calettuce-leaf.pdf>>. Acesso em 20 mai. 2020.

- ISF. The International Bremia Evaluation Board (IBEB). Disponível em: <<https://www.worldseed.org/our-work/plant-health/other-initiatives/ibeb/>>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- Lebeda A, Doležalová I, Feráková V, Astley D (2004) Geographical distribution of wild *Lactuca* species (Asteraceae, *Lactuceae*). **The Botanical Review** 70: 328–356.
- Lebeda A, Doležalová I, Křístková E (2007) Lettuce (Asteraceae; *Lactuca* spp.). In: Singh RBR, FL. (eds) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series, vegetable crops. **CRC Press**, Boca Raton, pp 377–472
- Lebeda A, Pink DAC, Astley D (2002) Aspects of the Interactions Between Wild *Lactuca* Spp. and Related Genera and Lettuce Downy Mildew (*Bremia lactucae*). In: Spencer-Phillips PTN, Gisi U, Lebeda A (Eds.) **Advances in downy mildew research**. Holanda: Kluwer Academic Publishers, p. 85–117.
- Lebeda A, Sedlářová M, Petřivalský M, Prokopová J (2008) Diversity of defence mechanisms in plant–oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*. **European Journal of Plant Pathology** 122:71–89.
- Lebeda A, Zinkernagel V (2003) Characterization of new highly virulent German isolates of *Bremia lactucae* and efficiency of resistance in wild *Lactuca* spp. germplasm. **Journal of Phytopathology** 151:274–282.
- Lebeda A, Pink DAC, Astley D (2001) **Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*)**. In: Spencer-Phillips PTN, Gisi U, Lebeda A (Eds). *Advances in downy mildew research* Kluwer, Dordrecht, p.85-117.
- Lebeda A, Blok I (1990) Sexual compatibility types of *Bremia lactucae* isolates originating from *Lactuca serriola*. **Netherlands Journal of Plant Pathology** 96:51-54.
- Lindqvist K (1960) On the origin of cultivated lettuce. **Hereditas** 46:319-350.
- Lopes, CA, Quezado-Duval AM, Reis A (2010) Doenças da alface. Brasília: Embrapa Hortaliças, 68p.
- Marin M (2016) **Monitoramento de raças e distribuição dos fatores de virulência de *Bremia lactucae*, em alface, no estado de São Paulo em 2014 e 2015**. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia agrônômica) – Unesp, Jaboticabal.
- Marin MV, Franco CA, Smilde D, Panizzi RC, Braz LT (2019) Distribution of races and virulence factors of *Bremia lactucae* in the main lettuce production area in Brazil. **Journal of Plant Pathology**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42161-019-00444-x>>.
- Michelmore R, Wong J (2008) Classical and molecular genetics of *Bremia lactucae*, cause of lettuce downy mildew. **European Journal of Plant Pathology** 122:19–30.
- Michelmore RW, Ingram DS (1980) Heterothallism in *Bremia lactucae*. **Transactions of the British Mycological Society** 75:47–56.
- Nishiguchi S, Futai K (2010) Race of *Bremia lactucae* (Downy mildew of lettuce) in Hyogo Prefecture. **Annual Rep Kansai Plant Prot Soc** 52: 81–83.

- Nordskog B, Elameen A, Gadoury DM, Hermansen A (2014) Virulence characteristics of *Bremia lactucae* populations in Norway. **European Journal of Plant Pathology** 139:679–686.
- Nunes RC, Castoldi R, Gomes RF, Tobar-Tosse DE, Braz LT (2016) Levantamento de raças do agente causador do míldio da alface no Estado de São Paulo em 2012 e 2013. **Summa Phytopathologica** 42:53–58.
- Parra L, Maisonneuve B, Lebeda A, Schut J, Christopoulou M, Jeuken M, Mchale L, Truco MJ, Crute I, Michelmore R (2016) Rationalization of genes for resistance to *Bremia lactucae* in lettuce. **Euphytica** 210:309–326.
- Petrželová I, Lebeda A, Kosman E (2013) Distribution, disease level and virulence variation of *Bremia lactucae* on *Lactuca sativa* in the Czech Republic in the period 1999-2011. **Journal of Phytopathology** 161:503–514.
- Sala FC, Costa CP (2012) Retrospectiva e tendência da alfaceicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, 30(2):187-194.
- Schettini TM, Legg EJ, Michelmore RW (1991) Insensitivity to Metalaxyl in California Populations of *Bremia lactucae* and Resistance os California Lettuce Cultivars to Downy Mildew. **Phytopathology** 81:64–70.
- Silva WF, Marques DJ, Silva EC, Bianchini HC, Ishimoto FA, Pereira Júnior MJF (2015) Diagnóstico da produção de hortaliças na região metropolitana de Belo Horizonte. **Horticultura Brasileira** 33:368-372. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000300015>
- Souza JO (2009) **Identificação de raças de *Bremia lactucae* no Estado de São Paulo e desenvolvimento de linhagens de alface crespa resistentes**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Unesp Jaboticabal, 54 f.
- Souza JO, Dalpian T, Braz LT, Camargo M (2011) Novas raças de *Bremia lactucae*, agente causador do míldio da alface, identificadas no estado de São Paulo. **Horticultura Brasileira** 29(3):282–286
- Thines M, Runge F, Telle S, Voglmayr H (2010) Phylogenetic investigations in the downy mildew genus *Bremia* reveal several distinct lineages and a species with a presumably exceptional wide host range. **European Journal Plant Pathology** 128:81-89.
- Töfoli JG, Domingues RJ, Ferrari JT (2014) Míldio e mofo branco da alface: doenças típicas de inverno. **Biológico** 76:19–24.
- Trimboli DS, Nieuwenhuis J (2011) New races of *Bremia lactucae* on lettuce in Australia. **Australasian Plant Disease Notes** 6:62–63.
- Tsuchida C (2017) Variation of *Bremia lactucae*, the Causal Agent of Lettuce Downy Mildew. Dissertação - University of California, Davis.
- Vale FXR, Jesus Jr WC, Liberato JR, Souza CA (2004) Natureza Das Epidemias. In: Vale FXR, Jesus Jr WC, Zambolim L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Editora Perffil, p. 21-46.
- van Ettehoven K, van der Arend A (1999) Identification and denomination of “new” races of *Bremia lactucae*. Eucarpia Meeting on Leafy Vegetables Genetics and Breeding. **Anais...** Olomuc: Czech Republic.

van Hese N, Huang CJ, Vleesschauwer D, Delaere I, Pauwelyn E, Bleyaert P, Höfte M (2016) Evolution and distribution of virulence characteristics of Belgian *Bremia lactucae* populations between 2008 and 2013. **European Journal of Plant Pathology** 144:431–441.

Vargas PF, Túlio FA, Andrade MAP (2012) Monitoramento de raças de *Bremia Lactucae* em alface no Estado de Minas Gerais em 2010. **Ciência et Praxis** 5:7–10.

Wicks TG, Hall B, Pezzaniti P (1994) Fungicidal control of metalaxyl-insensitive strains of *Bremia lactucae* on lettuce. **Crop Protection** 13:617-623.

XU L (2011) **Development of molecular approaches in the study of lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) population biology**. 262 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Vegetais). University of Warwick, Coventry.



## **CAPÍTULO 2 - Monitoramento e dinâmica populacional de *Bremia lactucae* nas regiões sul e sudeste do Brasil**

**RESUMO** - O míldio da alface, causado por *Bremia lactucae*, é a principal doença que afeta a alfaceicultura no inverno. A identificação de genes/fatores de virulência presentes nos campos de produção gera informação fundamental para o melhoramento da cultura visando resistência a essa doença. Nesse sentido, o presente trabalho visou monitorar e avaliar a dinâmica populacional de *B. lactucae* de três estados brasileiros a fim de se recomendar genes para o melhoramento genético de alface visando resistência a esse patógeno. A reação de isolados coletados em São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná foi avaliada nas 16 cultivares/linhagens de *Lactuca* spp. do código EU-C. Foram calculados índices de complexidade de virulência por isolado ( $C_i$ ) e por fenótipo ( $C_f$ ), Índice de Gleason ( $I_g$ ), além das frequência dos fenótipos e fatores de virulência a fim de entender a dinâmica populacional de *B. lactucae*. As populações de *B. lactucae* nos estados de Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo avaliadas possuem semelhança, compartilhando nove dos 15 fatores de virulência avaliados. Foram encontrados 27 fenótipos de virulência, mas apenas os correspondentes aos códigos sextetos 31-00-00, 31-00-02, 31-01-00 e 31-01-02 apresentaram maior frequência neste estudo. Além disso a reprodução clonal mostra-se como principal forma de propagação de *B. lactucae*. Os genes e fatores de resistência das cultivares Argelès (*Dm38*), Balesta e Bartoli podem ser recomendados como fontes de resistência para o melhoramento genético visando resistência genética ao míldio da alface para as três populações brasileiras avaliadas neste estudo.

**Palavras-chave:** *Lactuca* spp., alface, melhoramento de plantas, míldio da alface, resistência genética

## CHAPTER 2 - Monitoring and population dynamic of *Bremia lactucae* in southern and southeastern Brazil

**ABSTRACT** - Lettuce downy mildew caused by *Bremia lactucae* is the main disease affecting winter farming. The identification of genes/virulence factors present in the fields generates fundamental information for the improvement of the culture for resistance to this disease. In this sense, the present work aimed to monitor and evaluate the population dynamics of *B. lactucae* from three Brazilian states in order to recommend genes for the genetic improvement of lettuce aiming at resistance to this pathogen. The reaction of isolates collected in São Paulo, Rio Grande do Sul and Paraná was evaluated in the 16 cultivars or lines of *Lactuca* spp. of the EU-C code. Virulence complexity indices were calculated by isolate ( $C_i$ ) and by phenotype ( $C_f$ ), Gleason index ( $I_g$ ), in addition to the frequency of phenotypes and virulence factors in order to understand the population dynamics of *B. lactucae*. The evaluated populations of *B. lactucae* from the states of Paraná, Rio Grande do Sul and São Paulo are similar, sharing nine of the 15 virulence factors evaluated. 27 virulence phenotypes were found, but only those corresponding to the sextet codes 31-00-00, 31-00-02, 31-01-00 and 31-01-02 were more frequent in this study. In addition, clonal reproduction seems to be the main propagation of *B. lactucae*. The genes and resistance factors of the cultivars Argelès (*Dm38*), Balesta and Bartoli can be recommended as sources of resistance for genetic improvement aiming genetic resistance to lettuce downy mildew for the three Brazilian populations evaluated in this study

**Keywords:** *Lactuca* spp., lettuce, plant breeding, lettuce downy mildew, genetic resistance.

## 1 INTRODUÇÃO

O melhoramento de hortaliças tem proporcionado o desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições ambientais, com melhor qualidade, tornando o processo produtivo cada vez mais sustentável. Nesse sentido, é necessário conhecer bem a cultura, assim como seus principais desafios.

A alface (*Lactuca sativa* L.) protagoniza o principal papel entre as hortaliças folhosas, sendo a mais popular nesse segmento. O míldio da alface, causado pelo oomiceto *Bremia lactucae* Regel por sua vez, é a doença de inverno mais preocupante no mundo todo. Essa doença afeta diretamente o produto comercializável da alface: as folhas. Em condições de baixa temperatura, entre 12 e 20°C e, alta umidade (90 a 100%), as perdas causadas por essa doença podem ser superiores a 80% (Töfoli, Domingues e Ferrari, 2014; Fall et al., 2015).

A grande variabilidade de *B. lactucae* representa o maior desafio no controle dessa doença. Traduzida pelo grande número de raças ou fenótipos de virulência, sua variabilidade tem sido estudada no mundo todo (Lebeda, 1984; Lebeda e Zinkernagel, 2003; Sharaf et al., 2007; Trimboli e Nieuwenhuis, 2011; Braz et al., 2016; Hese, van et al., 2016).

Em busca de melhor entendimento da variação de *B. lactucae* na Europa foi criado o “International Bremia Evaluation Board” (IBEB) em 1998. Essa iniciativa foi estabelecida por pesquisadores europeus, de empresas públicas e privadas a fim de padronizar procedimentos para identificação e classificação de raças de *B. lactucae* (van Ettehoven e van der Arend, 1999; Perrot, Buffard e Grimault, 2015). Assim, definiu-se um conjunto de cultivares ou linhagens de *Lactuca* spp. diferenciadoras, periodicamente atualizadas e protocolos para determinação de fenótipos de virulência e denominação de raças. Na Europa, mais de 100 fenótipos de virulência são encontrados a cada ano, sendo que 36 foram denominados como raças de *B. lactucae* (ISF, 2020).

Nos EUA, a variabilidade de *B. lactucae* tem sido estudada na Universidade da Califórnia (Câmpus de Davis), contando com o apoio de empresas de sementes de alface do país. Tal iniciativa deu origem ao IBEB-US. O sistema utilizado por esses pesquisadores tem sido o de agrupar os fenótipos de virulência em

patótipos/raças, tendo sido descritos nove até o momento (Tsuchida, 2017; The Bremia Database, 2020).

Nos últimos anos foi criado o IBEB-G (Global), parceria entre o IBEB-US (americano) e o IBEB-EU (europeu). Tal iniciativa unifica as informações obtidas entre todos os integrados (Tsuchida, 2017).

No Brasil, o Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento (NEOM) da UNESP/FCAV, tem estudado o míldio da alface no estado de São Paulo desde 2003. Até 2015, mais de 500 isolados foram avaliados e 17 fenótipos de virulência de *B. lactucae* foram identificados (Braz et al., 2007; Souza et al., 2011; Castoldi et al., 2012; Galatti et al., 2013; Nunes et al., 2016; Marin et al., 2019). Mesmo não participando oficialmente do IBEB, esses dados foram obtidos utilizando a metodologia descrita por esse órgão. Além dessa iniciativa, isolados de Minas Gerais também foram avaliados em um único estudo em 2010 (Vargas et al., 2012).

A principal interação entre a alface e *B. lactucae* é baseada no modelo gene a gene, onde a resistência ao patógeno é conferida quando genes de resistência dominantes específicos (*Dm*) ou Fatores de resistência (FR) da planta se combinam com alelos dominantes de avirulência no patógeno (*Avr*) (Crute, 1992; Lebeda, Pink e Astley, 2002; Parra et al., 2016). Esse tipo de resistência é monogênica dominante, completa ou qualitativa e até o momento pelo menos 51 genes *Dm* ou FR foram descritos (Crute, 1992; Michelmores e Wong, 2008; Parra et al., 2016; ISF, 2020). Por meio da interpretação baseada no modelo gene a gene, foi possível compreender melhor a distribuição e evolução da virulência de *B. lactucae* no tempo e espaço (Lebeda e Zinkernagel, 2003). O uso dessa teoria possibilita a obtenção de cultivares de alface com alto nível de resistência ao míldio (Petrželová et al., 2013). Assim, partir da identificação das raças/fenótipos de virulência identificados, é possível recomendar genes de resistência *Dm* ou FR específicos para a população em questão.

O uso de cultivares resistentes é uma ferramenta imprescindível, mas a ocorrência de novas raças, que causam a quebra dessa resistência, têm sido o maior entrave encontrado pelos melhoristas de plantas. A perda da resistência genética ocorre principalmente em razão da evolução dos fitopatógenos. A evolução por sua vez é causada por mutação, tamanho da população, recombinação, fluxo gênico e seleção. Conhecer a estrutura genética das populações dos fitopatógenos

permite identificar o nível de diversidade genética e sua distribuição dentro e entre as populações analisadas, possibilitando a identificação desses fatores que interferem na estrutura populacional. Portanto, o entendimento do que está ocorrendo na população do patógeno é chave essencial para que o melhoramento genético visando resistência a fitopatógenos obtenha sucesso (McDonald, 2014; Ceresini, 2018).

Até o momento não havia nenhum relato de identificação de míldio da alface na região Sul do país. Assim, este trabalho consiste no primeiro levantamento populacional de *B. lactucae* nos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná. Tal informação é de extrema relevância para o desenvolvimento de cultivares de alface resistentes ao míldio para esses estados.

Nesse sentido, o presente trabalho visou monitorar e avaliar a dinâmica populacional de *B. lactucae* de três estados brasileiros a fim de se recomendar genes eficazes para o melhoramento genético de alface visando resistência a esse patógeno.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta e multiplicação dos isolados de *Bremia lactucae***

As coletas foram realizadas no Rio Grande do Sul em 2015, São Paulo e Paraná em 2016. A época de coleta ocorreu entre junho e setembro, na qual as condições climáticas eram mais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno e variou de acordo com a logística da coleta.

A partir de 2015 ações do NEOM passaram a ser integradas com a empresa Agristar do Brasil Ltda., que coletou os isolados do Rio Grande do Sul em 2015, do Paraná e de parte do estado de São Paulo, em 2016. Tal parceria tem permitido amostrar maior área, com maior representatividade das amostragens. Membros do NEOM, da UNESP-FCAV, realizaram a coleta da maior parte dos isolados do estado de São Paulo.

Os locais de coleta no estado de São Paulo foram determinados de acordo com os municípios visitados em estudos prévios, realizados pelo Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento - NEOM. Desde 2003, esse grupo tem feito

monitoramento do míldio da alface no estado paulista, e anualmente, os mesmos produtores sempre que possível, são revisitados.

Os isolados foram obtidos a partir de folhas de cultivares comerciais de alface, infectadas por míldio, e que apresentavam esporulação visível. Cada folha doente foi coletada e colocada em um pote individual. As amostras coletadas foram armazenadas em caixa térmica com gelo e destinadas ao Laboratório de Genética e Melhoramento de Hortaliças da UNESP-FCAV.

Também se coletaram vários isolados de *B. lactucae* em Serralha (*Lactuca serriola*), principal planta infestante do gênero *Lactuca*, presente em campos de produção de alface, a fim de se identificar a possibilidade da mesma estar atuando como hospedeira de *B. lactucae*.

No laboratório, as amostras coletadas foram armazenadas em temperatura de -20°C e posteriormente multiplicadas para realização do teste de diferenciação. Cada folha contendo esporângios de cada pote foi considerada como um isolado. Devido a laboriosidade de todo o procedimento de manutenção, multiplicação e diferenciação, houve a necessidade de selecionar parte das amostras coletadas para serem avaliadas. Assim, pelo menos uma amostra dos municípios menos representativos foi selecionada, sendo que para os municípios de maior relevância, mais de uma amostra foi analisada. Cada ciclo de multiplicação consistiu na semeadura da cultivar suscetível, inoculação dos isolados e de um período de incubação. Cada isolado foi multiplicado separadamente, por quatro ou cinco ciclos, até que se obtivesse esporângios suficientes para o teste de diferenciação.

A cultivar Solaris foi utilizada na multiplicação por apresentar suscetibilidade aos isolados de míldio da alface avaliados. A multiplicação de cada isolado foi realizada utilizando-se aproximadamente 40 sementes de 'Solaris', semeadas em caixa plásticas do tipo Gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), forradas com papel substrato mata borrão autoclavado e umedecidos com 11 mL de água destilada. Cada isolado foi multiplicado em três caixas em cada ciclo. As 'Solaris' foram cultivadas em câmara de incubação do tipo "Biochemical Oxygen Demand" (B. O. D.), com temperatura de 16°C e fotoperíodo de 12h (Castoldi et al., 2012; Marin, 2016).

Entre sete e dez dias após a semeadura, dependendo do desenvolvimento das folhas cotiledonares prosseguiu-se com inoculações dos isolados selecionados. Os esporângios de cada isolado foram obtidos, agitando-se as folhas infectadas em

15 mL de solução água destilada e Tween a 1%, utilizando agitador do tipo “Vortex” da marca Biomixer. Posteriormente, a suspensão contendo os esporângios foi filtrada em gaze esterilizada e depois aplicada nas plântulas de ‘Solaris’ com pipeta descartável do tipo Pasteur, até o ponto de escorrimento. As caixas contendo as plântulas inoculadas foram colocadas nas câmaras de incubação a 13°C, com fotoperíodo de 12h e 100% de umidade relativa. Entre sete e dez dias, quando foi possível observar esporulação nos cotilédones, estes foram utilizados como fonte de inóculo para o próximo ciclo de multiplicação.

## 2.2 Diferenciação e determinação dos códigos sextetos

Para o teste de diferenciação foi utilizado o conjunto de cultivares indicadas e fornecidas pelo IBEB-EU, utilizando o conjunto EU-C (Tabela 1).

**Tabela 1.** Conjunto de linhagens ou cultivares diferenciadoras de *Lactuca* spp. utilizadas para identificação de fatores de virulência de *Bremia lactucae* (EU-C).

Linhagem ou cultivar de <i>Lactuca</i> spp.	Gene <i>Dm</i> ou FR <sup>1</sup>	Valor código sexteto EU-C
Green Towers	0	0
Dandie	3	1
R4T57D	4	2
UC DM14	14	4
Nun DM 15	15	8
CG Dm-16	16	16
Colorado	18	32
FrRsal-1	Rsal-1	1
Argelès	38	2
RYZ 2164	25	4
RYZ 910457	? <sup>1</sup>	8
Bedford	?	16
Balesta	?	32
Bartoli	?	1
Design	?	2
Kibrille	?	4

<sup>1</sup> As linhagens que possuem “?” ainda não tiveram gene claramente identificado, mas possuem fator de resistência (FR) confirmado na literatura (Parra et al., 2016).

Segundo a metodologia do IBEB, essas cultivares são divididas em três grupos. Cada grupo possui seis cultivares, cada uma em uma posição e com valor

específico (1, 2, 4, 8, 16 ou 32). O valor das cultivares suscetíveis de cada grupo é somado para determinar-se o código sexteto de cada isolado. Cada código sexteto compreende um fenótipo de virulência. A cultivar suscetível Green Towers não possui valor para compor o código sexteto (van Hese et al., 2016). As cultivares/linhagens diferenciadoras utilizadas e seus genes *Dm* ou fatores de resistência (FR) associados estão apresentados na Tabela 1.

Cada isolado foi representado por três caixas plásticas do tipo Gerbox, forradas com papel mata borrão umedecidos e divididos em seis partes, uma para cada diferenciadora, com duas divisões vazias. Foram semeadas 20 sementes de cada cultivar diferenciadora. A inoculação dos isolados nesta etapa foi realizada conforme metodologia utilizada na multiplicação, empregando-se suspensão ajustada para  $5 \times 10^4$  esporângios mL<sup>-1</sup> (Michelmore e Crute, 1982).

As avaliações foram realizadas 7, 11 e 15 dias após a inoculação, sendo considerada a avaliação final do décimo quinto dia. Atribuiu-se sinais +, (+), - ou (-), de acordo com a reação de danos nos tecidos vegetais de alface, sendo:

- +: esporulação profusa, completamente suscetível;
- (+): esporulação esparsa superior a 50%;
- -: nenhuma esporulação, completamente resistente;
- (-): esporulação esparsa inferior a 50% (IBEB-US, 2020).

Portanto, os sinais de +, (+), indicam a suscetibilidade dos genótipos de alface avaliados. Já os sinais - ou (-), são designados quando os genótipos são resistentes. Somando-se os valores das cultivares suscetíveis dentro de cada grupo, obtém-se o código sexteto, que equivale a um fenótipo de virulência (van Ettehoven e van der Arend, 1999; Perrot et al., 2015; IBE-US, 2020).

A partir da suscetibilidade do patógeno (+ ou (+)), de cada cultivar do conjunto de diferenciadoras, infere-se quais são os genes/fatores de virulência de cada isolado de *B. lactucae*. Por outro lado, com a reação de resistência (- ou (-)), pode-se inferir quais são os genes *Dm* que podem condicionar resistência nas cultivares de alface a serem desenvolvidas.

### **2.3 Determinação da complexidade, diversidade e frequências nas populações de *Bremia lactucae***



A complexidade de virulência dos isolados foi calculada por isolado ( $C_i$ ) e por fenótipo de virulência ( $C_f$ ). A complexidade de virulência por isolado ( $C_i$ ) foi calculada através da fórmula:  $C_i = \sum_j p_j v_j$  em que,  $j=1...N_f$ , e  $N_f$  é o número de fenótipos de virulência identificados,  $p_j$  é a frequência do fenótipo de virulência  $j$  e  $v_j$  é o número de fator de virulência do fenótipo  $j$ . A complexidade de virulência por fenótipo ( $C_f$ ) foi calculada por  $C_f = (\sum_j v_j)/N_f$ . Considerou-se o número de fatores de virulência ( $v$ ) do fenótipo ( $j$ ) como o número de genes *Dm* e fatores de resistência (FR) ineficazes contra um isolado do fenótipo ( $j$ ) (Andrison, 1994; van Hese et al., 2016).

Já a diversidade da população foi obtida através do índice de Gleason ( $I_g$ ), que reflete a riqueza fenotípica das populações avaliadas, sendo calculado por  $I_g = (N_f - 1) / \ln(N_i)$ , em que  $N_i$  é o número de isolados avaliados (Andrison, 1994).

Estimou-se também a frequência dos fenótipos de virulência identificados nos isolados amostrados, tanto por estado, quanto pelo total de isolados avaliados nas três populações.

A frequência de cada fator de virulência foi obtida somando-se o número de vezes que sua cultivar correspondente foi suscetível (+ ou (+)) nas populações avaliadas e dividida pelo número total de isolados de cada uma.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Monitoramento de *Bremia lactucae* e fenótipos de virulência identificados

Nos anos de 2015 e 2016 foram avaliados 90 isolados de *B. lactucae* do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, coletados em cultivares de alface do tipo americana, crespa, crespa roxa, friseé verde, friseé roxa, lisa, mimosa verde, mimosa roxa e romana (Tabela 2). Entre os isolados de *B. lactucae* coletados em Serralhas, apenas o isolado SP24/16 conseguiu ser multiplicado em 'Solaris'. Amostras de míldio do Rio Grande do Sul chegaram a ser coletadas em 2016, porém devido grande distância entre estados e problemas com a logística de transporte, as amostras não sobreviveram.

**Tabela 2.** Relação dos isolados coletados em folhas de alface, em 2015 e 2016 nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul e identificação dos fenótipos de *Bremia lactucae*.

Identificação amostra <sup>1</sup>	Local	Grupo de Alface	Cultivar <sup>2</sup>	Código sexteto
RS01/15	Maquiné/RS	Crespa	Amanda	31-00-02
RS02/15	Maquiné/RS	Lisa	Regina	31-00-02
RS03/15	Maquiné/RS	Americana	Raider Plus	51-08-00
RS04/15	Maquiné/RS	Americana	Raider Plus	51-01-02
RS05/15	Maquiné/RS	Americana	Raider Plus	50-01-00
RS06/15	Flores da Cunha/RS	Crespa	Vera	31-00-02
RS07/15	Flores da Cunha/RS	Crespa	Vera	31-00-02
PR02/16	São José dos Pinhais/PR	Crespa	Cristal	31-17-06
PR03/16	São José dos Pinhais/PR	Crespa	Vanda	31-01-00
PR04/16	São José dos Pinhais/PR	Lisa	Regiane	63-25-00
PR05/16	São José dos Pinhais/PR	Americana	Pedrola	63-09-00
PR06/16	São José dos Pinhais/PR	Americana	Pedrola	63-05-00
PR07/16	São José dos Pinhais/PR	Americana	Calore	63-05-00
PR08/16	São José dos Pinhais/PR	Lisa	Regiane	31-01-00
PR09/16	Colombo/PR	Crespa	Vanda	31-17-00
PR10/16	Colombo/PR	Mimosa	-	31-01-00
PR12/16	Colombo/PR	Mimosa roxa	-	31-01-04
PR13/16	Colombo/PR	Crespa	Valentina	31-01-00
PR14/16	Colombo/PR	Americana	Calore	31-01-02
PR15/16	Colombo/PR	Crespa	Isabela	31-01-02
PR16/16	Colombo/PR	Crespa	Valentina	31-17-00
PR17/16	Colombo/PR	Mimosa roxa	Mila	31-01-02
PR18/16	Colombo/PR	Lisa	Regiane	31-01-00
SP26/16	Assis/SP	Americana	Lucy Brown	31-00-02
SP27/16	Assis/SP	Americana	Lucy Brown	31-24-02
SP43/16	Assis/SP	Americana	Lucy Brown	31-00-02
SP44/16	Assis/SP	Americana	Lucy Brown	31-00-02
SP48/16	Assis/SP	Lisa	-	31-00-02
SP33/16	Assis/SP	Crespa	-	31-01-02
SP53/16	Bauru/SP	Crespa	Vanda	31-01-02
SP55/16	Bauru/SP	Crespa	Vanda	31-01-06
SP174/16	Biritiba Mirim/SP	Romana	-	31-00-00
SP176/16	Biritiba Mirim/SP	Romana	-	31-01-06
SP180/16	Biritiba Mirim/SP	Friseé roxa	-	31-00-00
SP181/16	Biritiba Mirim/SP	Crespa roxa	Pira Roxa	63-08-02
SP185/16	Biritiba Mirim/SP	Friseé verde	-	31-00-02
SP187/16	Biritiba Mirim/SP	Friseé verde	-	31-00-02
SP191/16	Biritiba Mirim/SP	Americana	Silvana	35-04-00
SP197/16	Biritiba Mirim/SP	Americana	-	31-00-02
SP212/16	Biritiba Mirim/SP	Americana	Ludmila	31-08-02
SP217/16	Biritiba Mirim/SP	Crespa	Brida	31-00-00
SP57/16	Botucatu/SP	Crespa	-	23-00-06
SP58/16	Botucatu/SP	Crespa	-	31-00-02
SP62/16	Botucatu/SP	Americana	-	31-08-02
SP71/16	Botucatu/SP	Americana	-	63-01-02
SP75/16	Botucatu/SP	Lisa	-	51-00-00
SP77/16	Botucatu/SP	Mimosa	-	31-09-02
SP2/16	Campinas/SP	Crespa	Vanda	31-00-00
SP3/16	Campinas/SP	Crespa	Vanda	31-00-02
SP4/16	Campinas/SP	Crespa	Vanda	63-00-00
SP5/16	Campinas/SP	Americana	Laurel	51-00-00
SP231/16	Elias Fausto/SP	Americana	Lucy Brown	31-00-02
SP232/16	Elias Fausto/SP	Americana	Lucy Brown	31-00-02
SP233/16	Elias Fausto/SP	Americana	Lucy Brown	31-17-02

**Tabela 2. (continuação)**

<b>Identificação amostra<sup>1</sup></b>	<b>Local</b>	<b>Grupo de Alface</b>	<b>Cultivar<sup>2</sup></b>	<b>Código sexteto</b>
SP236/16	Hortolândia/SP	Americana	Lucy Brown	31-01-02
SP237/16	Hortolândia/SP	Americana	Lucy Brown	31-08-02
SP238/16	Hortolândia/SP	Americana	Lucy Brown	31-01-02
SP221/16	Ibiúna/SP	Crespa	Cristal	31-01-00
SP225/16	Ibiúna/SP	Crespa	Cristal	31-00-00
SP13/16	Itapira/SP	Americana	Lucy Brown	31-01-00
SP16/16	Itapira/SP	Mimosa	-	31-00-02
SP17/16	Itapira/SP	Friseé verde	Brunela	31-00-02
SP19/16	Itapira/SP	Crespa	Vera	31-00-00
SP20/16	Itapira/SP	Crespa	Vanda	31-01-02
SP239/16	Jaboticabal/SP	Crespa	Vanda	31-00-00
SP241/16	Jaboticabal/SP	Crespa	Vanda	31-00-00
SP242/16	Jaboticabal/SP	Crespa	Vanda	31-00-00
SP234/16	Limeira/SP	Lisa	Elisa	31-00-02
SP235/16	Limeira/SP	Lisa	Elisa	31-00-00
SP141/16	Mogi das Cruzes/SP	Mimosa	Gabi	51-05-00
SP142/16	Mogi das Cruzes/SP	Mimosa	Gabi	51-00-00
SP145/16	Mogi das Cruzes/SP	Romana	Roma	23-09-06
SP160/16	Mogi das Cruzes/SP	Lisa	Elisa	31-01-00
SP168/16	Mogi das Cruzes/SP	Americana	Laurel	31-01-02
SP169/16	Mogi das Cruzes/SP	Mimosa	Salad Bowl	31-00-00
SP21/16	Mogi Mirim/SP	Crespa	-	31-01-02
SP22/16	Mogi Mirim/SP	Crespa	-	31-00-00
SP23/16	Mogi Mirim/SP	Crespa	-	31-00-02
SP24/16	Mogi Mirim/SP	Serralha	-	31-00-02
SP28/16	Ribeirão Preto/SP	Americana	Lucy Brown	31-00-00
SP29/16	Ribeirão Preto/SP	Crespa	Vanda	31-00-02
SP34/16	Ribeirão Preto/SP	Crespa	Vanda	31-00-02
SP35/16	Ribeirão Preto/SP	Crespa	Vanda	31-08-02
SP36/16	Ribeirão Preto/SP	Crespa	Vanda	31-16-02
SP89/16	Salesópolis/SP	Crespa	Isabela	31-00-00
SP95/16	Salesópolis/SP	Lisa	Elisa	31-00-02
SP97/16	Salesópolis/SP	Lisa	Elisa	31-00-02
SP100/16	Salesópolis/SP	Lisa	Elisa	31-00-02
SP104/16	Salesópolis/SP	Crespa	Brida	31-00-02
SP115/16	Salesópolis/SP	Mimosa	Mimosa	31-00-00
<b>Total de isolados:</b>	90		<b>Total de fenótipos:</b>	27

<sup>1</sup>As duas primeiras letras da identificação da amostra correspondem ao estado em que foram originadas, seguido do número do isolado e do ano em que foi coletado. <sup>2</sup>Cultivar não identificada.

No estado de São Paulo, em 2016, foram amostrados 23 municípios, sendo que durante as coletas, não se identificou a doença nos municípios de Pirangi, Catanduva, São José do Rio Preto, Atibaia, Cândido Mota, Presidente Prudente, Echaporã e Marília. Nos estados do Paraná e do Rio Grande do Sul, foram amostradas as principais cidades onde se concentram a produção de alface.

Baseado na reação de 16 linhagens ou cultivares de *Lactuca* spp. do conjunto de diferenciadoras, 27 fenótipos de virulência foram identificados (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resposta de resistência/suscetibilidade de linhagens de alface diferenciadoras à *Bremia lactucae* e códigos sextetos identificados em 2015 e 2016 nos estados do Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul.

Cultivares diferenciadoras																Código sexteto
Green Towers	Dandle	R4T57D	UC Dm14	NunDm15	CGDm16	Colorado	FrRsal-1	Argelès	RYZ 2164	RYZ910457	Bedford	Balesta	Bartoli	Design	Kibrille	
Gene Dm ou FR																
0	3	4	14	15	16	18		38								
Valor no conjunto sexteto																
0	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4	
+	+	+	+	(-)	+	-	-	-	-	-	(-)	-	-	+	+	23-00-06
+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	23-09-06
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	(-)	-	-	-	(-)	-	31-00-00
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	31-00-02
+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	(-)	-	-	-	(-)	(-)	31-01-00
+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	(-)	-	-	+	(-)	31-01-02
+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	31-01-04
+	+	+	+	+	+	-	+	(-)	-	-	(-)	-	(-)	+	+	31-01-06
+	+	+	+	+	+	-	(-)	-	-	+	-	-	-	+	(-)	31-08-02
+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	(-)	-	-	+	(-)	31-09-02
+	+	+	+	+	+	-	(-)	(-)	-	(-)	+	-	-	+	(-)	31-16-02
+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	31-17-00
+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	(-)	+	-	-	+	(-)	31-17-02
+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	31-17-06
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	(-)	+	-	31-24-02
+	+	+	(-)	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	(-)	-	35-04-00
+	-	+	-	-	+	+	+	(-)	(-)	-	-	-	(-)	-	-	50-01-00
+	+	+	-	-	+	+	-	-	(-)	(-)	-	-	-	-	-	51-00-00
+	+	+	-	-	+	+	+	-	(-)	(-)	-	-	-	+	-	51-01-02
+	+	+	-	(-)	+	+	+	(-)	+	(-)	-	-	-	(-)	-	51-05-00
+	+	+	-	-	+	+	-	-	(-)	+	-	-	-	-	-	51-08-00
+	+	+	+	+	+	+	(-)	-	-	(-)	(-)	-	-	(-)	-	63-00-00
+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	(-)	-	(-)	-	-	(-)	(-)	63-01-02
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	(-)	63-05-00
+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	(-)	-	-	+	63-08-02
+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	63-09-00
+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	63-25-00

Os fenótipos de virulência mais frequentes foram 31-00-02 (28,89%), 31-00-00 (15,56%), 31-01-02 (11,11%) e 31-01-00 (10,00%) (Tabela 4). Os fenótipos de virulência correspondentes aos códigos sextetos 31-00-02, 31-01-02 e 31-01-00

foram identificados em mais de um estado. Já os demais fenótipos de virulência ocorreram apenas em um estado.

Dos sete isolados coletados no Rio Grande do Sul em 2015, quatro fenótipos de virulência foram identificados (Tabela 2). O baixo número de amostras avaliadas se deu devido a perdas que ocorreram entre a coleta e o recebimento do material. O fenótipo de virulência 31-00-02 identificado em dois municípios do Rio Grande do Sul, também foi observado em 11 municípios de São Paulo, sendo o mais frequente (28,89%), entre todas as populações avaliadas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Códigos sextetos, frequência e estabilidade dos fenótipos de virulência identificados no estado de São Paulo - SP, Paraná - PR e Rio Grande do Sul - RS, com os respectivos municípios de origem.

Códigos sextetos	Frequência (%)			Frequência geral <sup>1</sup> (%)	Origem	
	SP	PR	RS		Municípios	Estados
23-00-06	1,49	-	-	1,11	Botucatu	SP
23-09-06	1,49	-	-	1,11	Mogi das Cruzes	SP
31-00-00	20,90	-	-	15,56	Biritiba Mirim, Campinas, Ibiúna, Jaboticabal, Limeira, Mogi das Cruzes, Mogi Mirim, Ribeirão Preto, Salesópolis	SP
31-00-02	32,84	-	57,14	28,89	Assis, Biritiba Mirim, Botucatu, Campinas, Elias Fausto, Itapira, Limeira, Mogi Mirim, Ribeirão Preto, Salesópolis	SP
					Flores da Cunha, Maquiné	RS
31-01-00	5,97	31,25	-	10,00	Ibiúna, Itapira, Mogi das Cruzes	SP
					Colombo, São José dos Pinhais	PR
31-01-02	10,45	18,75	-	11,11	Assis, Bauru, Hortolândia, Itapira, Mogi das Cruzes, Mogi Mirim	SP
					Colombo	PR
31-01-04	-	6,25	-	1,11	Colombo	PR
31-01-06	2,99	-	-	2,22	Bauru, Biritiba Mirim	SP
31-08-02	5,97	-	-	4,44	Biritiba Mirim, Botucatu, Hortolândia, Ribeirão Preto	SP
31-09-02	1,49	-	-	1,11	Botucatu	SP
31-16-02	1,49	-	-	1,11	Ribeirão Preto	SP
31-17-00	-	12,5	-	2,22	Colombo	PR
31-17-02	1,49	-	-	1,11	Elias Fausto	SP
31-17-06	-	6,25	-	1,11	São José dos Pinhais	PR
31-24-02	1,49	-	-	1,11	Assis	SP
35-04-00	1,49	-	-	1,11	Biritiba Mirim	SP
50-01-00	-	-	14,29	1,11	Maquiné	RS
51-00-00	4,48	-	-	3,33	Botucatu, Campinas, Mogi das Cruzes	SP
51-01-02	-	-	14,29	1,11	Maquiné	RS
51-05-00	1,49	-	-	1,11	Mogi das Cruzes	SP

**Tabela 4. (continuação)**

Códigos sextetos	Frequência (%)			Frequência geral <sup>1</sup> (%)	Origem	
	SP	PR	RS		Municípios	Estados
51-08-00	-	-	14,29	1,11	Maquiné	RS
63-00-00	1,49	-	-	1,11	Campinas	SP
63-01-02	1,49	-	-	1,11	Botucatu	SP
63-05-00	-	12,5	-	2,22	São José dos Pinhais	PR
63-08-02	1,49	-	-	1,11	Biritiba Mirim	SP
63-09-00	-	6,25	-	1,11	São José dos Pinhais	PR
63-25-00	-	6,25	-	1,11	São José dos Pinhais	PR

<sup>1</sup>Frequência geral: frequência observada nas três populações avaliadas em conjunto.

No Paraná em 2016, foram avaliados 16 isolados de *B. lactucae*. Oito fenótipos de virulência distintos foram identificados (Tabela 2). Os fenótipos de virulência correspondentes aos códigos sextetos 31-01-00 e 31-01-02 foram identificados no Paraná e em São Paulo (Tabela 4). Os fenótipos de virulência mais frequentes neste estado foram 31-01-00 (31,25%), 31-01-02 (18,75%), 31-17-00 (12,5%) e 63-05-00 (12,5%).

Em São Paulo foram avaliados 67 isolados, que por sua vez foram distribuídos em 18 fenótipos de virulência. Os fenótipos de virulência que apresentaram maior frequência foram 31-00-02 (32,84%), 31-00-00 (20,90%) e 31-01-02 (10,45%). Dentre os mais frequentes, apenas o 31-00-00 ocorreu apenas no estado de São Paulo.

Dentre os 27 fenótipos de virulência encontrados nas três populações avaliadas, apenas dois são correspondentes a códigos sextetos (EU-C) já identificados na Europa (ISF, 2020). O código 50-01-00, encontrado em Maquiné-RS, foi idêntico à raça BI:25EU. Já o código 51-00-00, o qual ocorreu em Campinas, Botucatu e Mogi das Cruzes, foi idêntico a BI:20EU.

### 3.2 Distribuição dos genes ou fatores de virulência

A partir das reações de suscetibilidade (+ ou (+)) nas linhagens diferenciadoras de *Lactuca* spp., foram identificados de quatro a nove fatores/genes de virulência nos isolados avaliados (Tabela 5). Os fenótipos de virulência correspondentes aos códigos sextetos 31-17-06 e 63-25-00, apresentaram nove fatores de virulência, o maior número identificado neste trabalho.

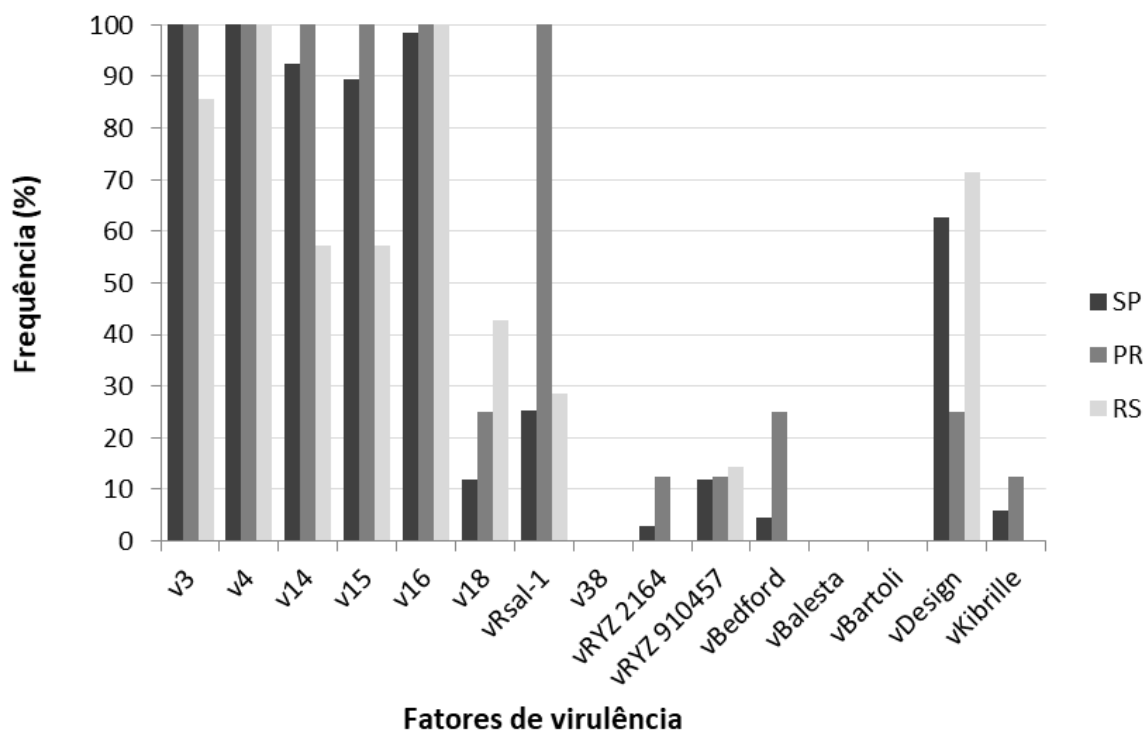
**Tabela 5.** Códigos sextetos de isolados de *Bremia lactucae* identificados em 2015 e 2016, nos estados do Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul e seus fatores/genes de virulência correspondentes.

Códigos sextetos	Fatores/genes de virulência	Nº de fatores de virulência <sup>1</sup>
23-00-06	<i>v3, v4, v14, v16, vDesign, vKibrille</i>	6
23-09-06	<i>v3, v4, v14, v16, vRsal-1, vRYZ 910457, vDesign, vKibrille</i>	8
31-00-00	<i>v3, v4, v14, v15, v16</i>	5
31-00-02	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vDesign</i>	6
31-01-00	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vRsal-1</i>	6
31-01-02	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vRsal-1, vDesign</i>	7
31-01-04	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vRsal-1, vKibrille</i>	7
31-01-06	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vRsal-1, vDesign, vKibrille</i>	8
31-08-02	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vRYZ 910457, vDesign</i>	7
31-09-02	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vRsal-1, vRYZ 910457, vDesign</i>	8
31-16-02	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vBedford, vDesign</i>	7
31-17-00	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vRsal-1, vBedford</i>	7
31-17-02	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vRsal-1, vBedford, vDesign</i>	8
31-17-06	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vRsal-1, vBedford, vDesign, vKibrille</i>	9
31-24-02	<i>v3, v4, v14, v15, v16, vRYZ 910457, vBedford, vDesign</i>	8
35-04-00	<i>v3, v4, v18, vRYZ 2164</i>	4
50-01-00	<i>v4, v16, v18, vRsal-1</i>	4
51-00-00	<i>v3, v4, v16, v18</i>	4
51-01-02	<i>v3, v4, v16, v18, vRsal-1, vDesign</i>	6
51-05-00	<i>v3, v4, v16, v18, vRsal-1, vRYZ 2164</i>	6
51-08-00	<i>v3, v4, v16, v18, vRYZ 910457</i>	5
63-00-00	<i>v3, v4, v14, v15, v16, v18</i>	6
63-01-02	<i>v3, v4, v14, v15, v16, v18, vRsal-1</i>	7
63-05-00	<i>v3, v4, v14, v15, v16, v18, vRsal-1, vRYZ 2164</i>	8
63-08-02	<i>v3, v4, v14, v15, v16, v18, vRYZ 910457, vDesign</i>	8
63-09-00	<i>v3, v4, v14, v15, v16, v18, vRsal-1, vRYZ 910457</i>	8
63-25-00	<i>v3, v4, v14, v15, v16, v18, vRsal-1, vRYZ 910457, vBedford</i>	9

<sup>1</sup>O número de fatores de virulência foi obtido somando-se as cultivares, com exceção da 'Green Towers' - padrão de suscetibilidade, para cada fenótipo de virulência identificado.

Os fenótipos de virulência mais frequentes, 31-00-02, 31-00-00, 31-01-02 e 31-01-00, apresentaram entre cinco e sete fatores de virulência, demonstrando menor complexidade (Tabela 5).

Em todas as populações avaliadas, os fatores de virulência *v3, v4, v14, v15, v16, v18, vRsal-1* e os correspondentes a 'RYZ910457' foram encontrados (Figura 1). Além disso, quase todos os isolados avaliados compartilham *v3, v4* e *v16* (Tabela 5). Já os genes de virulência que ocorreram em menor frequência foram *v18*, e os correspondentes as linhagens RYZ 2164, RYZ 910457, Bedford, Design e Kibrille (Figura 1).



**Figura 1.** Frequência dos fatores de virulência observados em isolados de *Bremia lactucae*, avaliados nos estados do Rio Grande do Sul em 2015 e em São Paulo e Paraná em 2016.

Os fatores de virulência que apresentaram maior variação entre os isolados avaliados foram *v14*, *v15*, *v18*, *vRsal-1* e os correspondentes aos genótipos RYZ 2164, Bedford, Design e Kibrille (Figura 1).

Dentre as populações avaliadas, o gene *Dm38* da ‘Argelès’ e os fatores de resistência da ‘Balesta’ e ‘Bartoli’ foram os únicos que puderam ser indicados para conferir resistência aos isolados de *B. lactucae* avaliados neste trabalho pois, seus fatores de virulência correspondentes não foram identificados (Tabela 5).

### 3.3 Avaliação da complexidade e da diversidade das populações avaliadas de *Bremia lactucae*

A complexidade de virulência por isolado ( $C_i$ ) foi maior nos isolados do Paraná em 2016 (Tabela 6), com 12 fatores de virulência (Figura 1). Os fenótipos de virulência identificados no Rio Grande do Sul foram os mais simples, com menor número de fatores de virulência ( $C_f = 5,25$ ). Já a complexidade de virulência por



fenótipo ( $C_f$ ) foi semelhante a  $C_i$ , indicando que os fenótipos de virulência foram detectados com mesma frequência em cada uma das três populações avaliadas (Tabela 6).

Outro aspecto observado no presente estudo, nos estados de Paraná e São Paulo,  $C_f$  foi maior que  $C_i$ , o que significa que fenótipos de virulência simples, ou seja, com menor número de fatores de virulência, tendem a predominar nas populações avaliadas (Andrivon, 1994; Lebeda e Zinkernagel, 2003) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Caracterização da diversidade e complexidade dos fenótipos de virulência de *Bremia lactucae*, obtidos nos estados do Paraná (2016), São Paulo (2016), Rio Grande do Sul (2015) e o total de isolados amostrados.

<b>Estados</b>	<b><math>N_i</math></b>	<b><math>N_f</math></b>	<b><math>I_g</math></b>	<b><math>C_i</math></b>	<b><math>C_f</math></b>
Paraná	16	8	2,52	7,13	7,63
São Paulo	67	18	4,04	6,07	6,61
Rio Grande do Sul	7	4	1,54	5,57	5,25
<b>Total amostrado</b>	<b>90</b>	<b>27</b>	<b>5,78</b>	<b>6,22</b>	<b>6,74</b>

Número de isolados identificados ( $N_i$ ), Número de fenótipos de virulência identificados ( $N_f$ ), Índice de Gleason ( $I_g$ ), Complexidade de virulência por isolado ( $C_i$ ) e Complexidade de virulência por fenótipo ( $C_f$ ).

O Índice de Gleason ( $I_g$ ) mostrou diferentes níveis de diversidade nos isolados amostrados em 2016, com maior riqueza de diversidade observada no estado de São Paulo ( $I_g = 4,04$ ). O menor nível de diversidade foi observado para o estado do Rio Grande do Sul, em 2015, resultando em menor diversidade nos isolados amostrados ( $I_g = 1,54$ ), o que pode ser explicado devido ao baixo número amostrado (Tabela 6). Considerando todos os isolados avaliados nos três estados, a diversidade encontrada foi alta ( $I_g = 5,78$ ).

#### 4 DISCUSSÃO

Os trabalhos realizados no Brasil em relação ao míldio da alface têm-se concentrado na região Sudeste. No estado de São Paulo, esse patógeno tem sido monitorado desde 2003 e, até 2015, 17 raças haviam sido identificadas (Braz et al., 2007; Souza et al., 2011; Castoldi et al., 2012; Galatti et al., 2013; Franco, 2016; Nunes et al., 2016; Marin et al., 2019). Em Minas Gerais, um único levantamento das raças de míldio da alface foi realizado em 2010, no qual 40 isolados foram avaliados, identificando-se quatro raças de *B. lactucae* (Vargas et al., 2012). Para

os estados do Paraná e Rio Grande do Sul este consiste no primeiro monitoramento realizado.

No monitoramento de 2016, o número de fenótipos de virulência identificados no estado de São Paulo foi superior às 17 raças identificadas em 12 anos de monitoramento. Isso se deve a mudanças que ocorreram na metodologia de avaliação indicada pelo IBEB. Até 2015, os isolados de *B. lactucae*, no Brasil, foram identificados nos conjuntos sextetos de diferenciadoras EU-A e EU-B (ISF, 2020) e os fenótipos de virulência obtidos, baseados em suas semelhanças, eram agrupados em raças anteriormente identificadas. Com a mudança na metodologia de avaliação para o conjunto EU-C, o número de cultivares/linhagens de *Lactuca* spp. foi resumido de forma a identificar apenas os genes de virulência mais relevantes (ISF, 2020). Assim, os códigos sextetos antigos não se equiparam com os novos códigos obtidos devido a perdas e adições de novas cultivares no conjunto de diferenciadora. Para se comparar as raças já identificadas, recomenda-se que isolados representantes dessas sejam novamente diferenciados nos novos genótipos de *Lactuca* spp., gerando novo código sexteto, como foi realizado pelo IBEB. As reações dos genótipos RYZ 2164, RYZ 910457, Bedford, Balesta, passaram a ser avaliadas somente a partir de 2014. Já os genótipos FrRsal-1, Bartoli e Kibrille, só foram inseridos ao conjunto de diferenciadoras a partir de 2016 (ISF, 2020).

Quando um novo fenótipo de virulência aparece repetidamente em várias regiões e ao longo de vários anos, o IBEB o identifica como uma ameaça para a indústria de alface, define uma nova raça de *B. lactucae* e seleciona um isolado como representante dela. Além da ocorrência em várias regiões e anos, outros elementos desempenham um papel no processo de decisão de nomear uma nova raça. Esta deve superar os genes de resistência mais utilizados e além da combinação de genes. O isolado deve ser estável na reprodução e fornecer resultados robustos (ISF, 2020).

Os fenótipos de virulência que poderiam ser denominados como raças neste trabalho são: 31-00-00, 31-00-02, 31-01-00 e 31-01-02 pois cumprem o requisito de ocorrência em vários locais e com maior frequência. No entanto, futuros monitoramentos devem confirmar esta hipótese.

Diferenças na distribuição dos fenótipos de virulência dentro de outros países já foram observadas em diversos estudos (Crute, 1987; Lebeda e Zinkernagel, 2003). Apesar da ocorrência de vários fenótipos de virulência nos campos de produção, apenas alguns fenótipos de virulência tendem a predominar devido a reprodução clonal (assexuada), podendo se espalhar e contribuir para mudanças na dinâmica populacional do patógeno (Crute, 1987). Isto pode ser claramente observado nos resultados obtidos no estado de São Paulo que, mesmo tendo o maior número de fenótipos de virulência identificados, apenas alguns poucos predominaram.

A identificação de *B. lactucae* em uma amostra de serralha (*L. serriola*) e sua reprodução e cultivares de alface (*L. sativa*), pode indicar que essas plantas infestantes estão atuando como fonte de inóculo. O isolado identificado apresentou o fenótipo de virulência 31-00-02, o mais frequente entre os identificados. Além disso, outra possibilidade é que esteja ocorrendo reprodução sexual do patógeno nestes hospedeiros. Lebeda e Petrzellová (2004), ao avaliarem isolados de *B. lactucae* coletados em *L. serriola* em regiões da Europa, identificaram principalmente, fatores de virulência que se combinam com genes/fatores de resistência desta planta infestante, o que resultaria em alta especificidade entre os isolados de *L. serriola* e *B. lactucae*. No entanto, eles também acreditam que a ocorrência de reprodução sexual de isolados de *B. lactucae* originárias de alface (*L. sativa*) com os de serralha (*L. serriola*), parece ser uma provável explicação para a ocorrência de elevado número de fenótipos de virulência identificados, o que também pode estar acontecendo nas populações de *B. lactucae* do Brasil.

Marin et al. (2019) observaram que em 13 anos de estudos, ocorreram diversas raças de *B. lactucae* no estado de São Paulo, mas que apenas algumas eram predominantes. Até 2015 este fato pode ter sido justificado pelas principais cultivares utilizadas no Brasil não possuírem resistência ao míldio, reduzindo a pressão de seleção sobre a população de míldio da alface, favorecendo a prevalência de poucas raças. Entretanto, nos últimos anos, a oferta de cultivares apresentando resistência a *B. lactucae* tem aumentado no Brasil, e o uso contínuo de novas cultivares pode provocar a evolução mais rápida do patógeno.

Dentre 23 municípios amostrados no estado de São Paulo em 2016, em oito não foi identificada a ocorrência de *B. lactucae*. Comparando-se com anos

anteriores, em que os mesmos municípios foram visitados (Marin et al., 2019), houve menor incidência da doença, o que pode indicar que o período avaliado foi desfavorável ao patógeno. O míldio da alface apresenta alta sensibilidade a fatores climáticos como radiação solar e temperatura, afetando drasticamente sua sobrevivência no campo (Nordskog et al., 2007; Wu et al., 2007; Fall et al., 2015). Mudanças na estratégia do manejo dos produtores também podem interferir no desenvolvimento da doença. Aplicações de fungicidas específicos para o controle da doença, associadas ao uso de cultivares resistentes aos fenótipos de virulência da região produtora, desfavorecem a ocorrência desse patógeno (Wu et al., 2007; Töfoli, Domingues e Ferrari, 2014). Essas duas estratégias devem ser combinadas sempre que possível para diminuir a pressão de seleção exercida sobre o patógeno (Barriere et al., 2015).

Observa-se pela distribuição dos fatores de virulência (Tabela 5 e Figura 1), que cada população avaliada possui vários genes de virulência de comum compartilhamento, mas também possuem genes de virulência com diferentes destaques dentro de cada população. Entre os isolados amostrados em São Paulo e Paraná, 12 foram os fatores de virulência encontrados nas duas populações. Essas duas populações ainda apresentaram valores de  $C_i$  e de  $C_f$  próximos entre si (Tabela 6), refletindo em um grau de complexidade semelhante (van Hese et al. 2016). Quando comparados por região, São Paulo e Paraná apresentaram maior número de fatores de virulência (12) que o Rio Grande do Sul (9). O *v18* e o fator de virulência correspondente a 'Design' foram mais frequentes na população do Rio Grande do Sul, diferentemente dos outros estados. Assim, apesar das populações apresentarem características únicas, elas acabam compartilhando os fatores de virulência mais comuns.

Os genes/FR que conferem resistência aos isolados de *B. lactucae* no Rio Grande do Sul são os mesmos para os estados de São Paulo e Paraná e pertencem as cultivares Argelès (*Dm38*), Balesta (FR) e Bartoli (FR). Porém é possível utilizar-se ainda dos FRs de 'RYZ 2164', 'Bedford' e 'Kibrille' para conferir resistência aos isolados coletados no Rio Grande do Sul (Figura 1). Há de se ressaltar que o baixo número de isolados avaliados neste estado pode ter proporcionado a omissão de outros fatores de virulência.

No Brasil, o *v18* tem apresentado maior frequência nos últimos anos (Marin et al., 2019). Sua primeira ocorrência foi observada em 2014 em Echaporã-SP e em 2015, em Campinas (Marin, 2016). Nas populações avaliadas neste trabalho, esse fator de virulência foi observado em São Paulo, nos municípios de Biritiba Mirim, Botucatu, Campinas, Mogi das Cruzes; no Paraná, em São José dos Pinhais; e no Rio Grande de Sul, em Maquiné. A maior recorrência desse fator de virulência indica mudança na estrutura populacional desse patógeno, sendo traduzida na quebra da resistência do gene *Dm18*. Assim, cultivares desenvolvidas com *Dm18* correm alto risco de perder sua eficácia em curto prazo.

Mundialmente, o *v18* apresenta alta frequência, sendo *Dm18* ainda considerado como uma das principais fontes de resistência às populações avaliadas. Em Israel, cultivares de alface contendo *Dm18* conferem resistência às populações de *B. lactucae* (Sharaf et al., 2007). Na Alemanha, República Tcheca e Austrália, a frequência desse fenótipo tem aumentado, assim como no Brasil (Lebeda e Zinkernagel, 2003; Trimboli, 2004; Trimboli e Nieuwenhuis, 2011; Petrželová, et al., 2013).

Apesar disso, na Bélgica e na Noruega, o uso do gene *Dm18* já não é recomendável devido à alta ocorrência do seu fator de virulência correspondente (Nordskog et al., 2014; van Hese et al., 2016). Em isolados da Califórnia e do Arizona, nos Estados Unidos da América, identificou-se que a resistência conferida pelo gene *Dm18* foi menor que 30% nas duas populações (Tsuchida, 2017). Entre os isolados denominados como raça BI:5-9US e BI:16-35EU, esse fator de virulência (*v18*) é observado em 81% dessas raças (ISF, 2020).

O gene *Dm38* que conferiu resistência a todos os isolados avaliados, também é eficaz em outras populações. Em monitoramentos anteriores no estado de São Paulo e de Minas Gerais, não se identificou o *v38* (Vargas et al., 2012; Franco, 2016; Marin, 2016). Na Austrália (Trimboli e Nieuwenhuis, 2011), Bélgica (van Hese et al., 2016), EUA (Tsuchida, 2017; Michelmore et al., 2018), República Tcheca (Petrželová et al., 2013) e Noruega (Nordskog et al., 2014), este fator de virulência tem sido observado com baixas e médias frequências. Entre as raças identificadas pelo IBEB, o gene *Dm38* confere resistência a mais de 50% das 21 raças identificadas na Europa (ISF, 2020). No entanto, isolados com *v38* foram relatados

com alta frequência em Israel (Sharaf et al., 2007) e na Alemanha (Lebeda e Zinkernagel, 2003).

O FR da 'Balesta' também tem conferido alta resistência nas populações de *B. lactucae* no estado de São Paulo, mas só passou a ser avaliado a partir de 2014 (Marin, 2016). Nos EUA, a resistência conferida por 'Balesta' é eficaz em mais de 95% dos isolados avaliados até 2017 (Tsuchida, 2017; Michelmore et al., 2018). Na Austrália e Bélgica, assim como no Brasil, os genes de virulência correspondentes a essa cultivar não foram detectados (Trimboli e Nieuwenhuis, 2011; Franco, 2016; van Hese et al., 2016; Marin, 2016).

Apesar de ter conferido resistência aos isolados avaliados nas três populações brasileiras, o gene de resistência da 'Bartoli' só foi testado a partir de 2016 para os isolados de São Paulo e Paraná, e em 2015, para os do Rio Grande do Sul. Em relação às raças europeias identificadas, esse é o fator de resistência mais efetivo, sendo virulento apenas em uma destas raças (ISF, 2020).

Os fatores de virulência mais frequentes nas populações avaliadas neste estudo (*v3*, *v4*, *v14*, *v15* e *v16*) também foram identificados anteriormente nos estados de São Paulo e Minas Gerais, não sendo recomendados como fontes de resistência (Vargas et al., 2012; Franco, 2016; Marin et al., 2019). O gene de virulência da 'Design', que também apresentou alta frequência, tem sido estudado mais recentemente, mas também não deve ser indicado como fonte de resistência tendo em vista a alta frequência já observada (Figura 1).

As cultivares RYZ 2164, RYZ 910457, Bedford e Kibrille também apresentaram relativamente baixa frequência dos fatores de virulência no presente estudo. Em uma população avaliada na Bélgica, com exceção da Kibrille, que não foi avaliada, os genes de resistência correspondentes a esses genótipos proporcionaram resistência a mais de 60% dos isolados testados nas populações avaliadas entre 2008 e 2013 (van Hese et al., 2016). Nos EUA, 'RYZ 910457' conferiu resistência a mais de 60% dos isolados testados entre 2013 e 2016. A resistência baseada na cultivar Bedford já não foi efetiva para essa mesma população de *B. lactucae* (Tsuchida, 2017).

Os fenótipos de virulência identificados neste monitoramento, correspondentes aos identificados na Europa, não haviam sido relatados anteriormente no Brasil (50-01-00, correspondente Bl:25EU e o código 51-00-00, a

Bl:20EU). Em 2014 e 2015, isolados coletados no estado de São Paulo tiveram o mesmo fenótipo de virulência que a raça denominada como Bl:21EU (Marin et al., 2019). A semelhança entre esses isolados pode ter se dado pela migração intercontinental de isolados (Choi et al., 2011), como foi sugerida para o míldio do espinafre. Entretanto, a baixa frequência entre fenótipos de virulência similares aos encontrados no exterior e suas necessidades específicas de sobrevivência, esta teoria não é suportada, sendo mais aceitável o surgimento dessas raças devido reprodução sexuada, mutação ou outros fatores.

A variabilidade em *B. lactucae* pode ser explicada de várias formas. Variação somática e heterocariótica ou poliploidia, assim como documentadas em populações de *B. lactucae* dos EUA e de outros países (Hulbert e Michelmore, 1985; Michelmore e Wong, 2008). Análise genômica de progênies de cruzamentos de diferentes isolados de *B. lactucae* e o uso da técnica de citometria de fluxo poderiam indicar a ocorrência desse tipo de variação (Fletcher et al., 2019). No entanto, esses dados não foram avaliados neste estudo.

É possível que a reprodução sexual de *B. lactucae* gere muitos fenótipos de virulência (Lebeda e Zinkernagel, 2003; van Hese et al., 2016), e que sua ocorrência possa ter contribuído para maior número de fenótipos de virulência. Além disso, é preciso advertir que para reprodução sexual de *B. lactucae* acontecer, é necessário que ocorra dois tipos sexuais ( $B_1$  e  $B_2$ ) no mesmo ambiente (Michelmore e Ingram, 1980). Entretanto, neste estudo não foi realizado teste de compatibilidade sexual entre os isolados coletados e não houve observação de oósporos nas amostras (formados pela reprodução sexual de *B. lactucae*), fundamentais para esta comprovação. Em experimentos laboratoriais com isolados coletados em campos de produção na Califórnia e Arizona entre 2013 e 2016, foram observados tipos sexuais compatíveis ( $B_1$  e  $B_2$ ), indicando ocorrência de reprodução sexual no campo, que explicaria o aumento da diversidade identificada (Tsuchida, 2017). Assim, estudos neste sentido são essenciais para explicar a ocorrência deste tipo de reprodução na população brasileira de *B. lactucae*.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que apesar do alto número de fenótipos de virulência observados, a maior parte ocorre em poucos fenótipos de virulência, que compartilham a maioria dos genes de virulência. Isso pode sugerir predominância da reprodução clonal, com migração para demais

regiões. Entretanto, a reprodução sexual ainda pode ser a fonte da variabilidade observada eventualmente nos fenótipos de virulência de menor frequência.

## 5 CONCLUSÕES

- As populações de *Bremia lactucae* nos estados de Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo e avaliadas possuem semelhança, compartilhando nove dos 15 fatores de virulência avaliados;
- Apesar de terem sido encontrados 27 fenótipos de virulência, apenas 31-00-00, 31-00-02, 31-01-00 e 31-01-02 foram mais frequentes neste estudo;
- Houve predominância de poucos fenótipos de virulência, indicando que a reprodução clonal ainda é a principal forma de propagação de *B. lactucae*;
- Os genes e fatores de resistência das cultivares Argelès (*Dm38*), Balesta e Bartoli podem ser recomendados como fontes de resistência para o melhoramento genético visando resistência ao míldio da alface para as três populações brasileiras avaliadas neste estudo.

## 6 REFERÊNCIAS

- Andrivon D (1994) Race structure and dynamics in populations of *Phytophthora infestans*. **Canadian Journal of Botany** 72:1681–1687.
- Barriere V, Lecompte F, Lescourret F (2015) Efficacy of pest and pathogen control, yield and quality of winter lettuce crops managed with reduced pesticide applications. **European Journal of Agronomy** 71:34–43.
- Braz LT, Dalpian T, Camargo M, Pissardi MA (2007) Identification of races of *Bremia lactucae* in São Paulo, Brazil. **Acta Horticulturae** 760:317–322.
- Braz LT, Diniz GMM, Castoldi R, Nunes RC, Galatti FS, Camargo M, Marin MV, Dalpian T, Souza JO, Gomes RF, Rabelo HO (2016) Monitoring races of *Bremia lactucae* in the State of São Paulo from 2003 to 2012. **Acta Horticulturae**. Anais eletrônicos... Leuven: Belgium. Disponível em: <<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1127.51>>
- Brown S, Koike ST, Ochoa OE, Laemmlen F, Michelmore RW (2007) Insensitivity to the fungicide Fosetyl-Aluminum in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. **Plant Disease** 88:502–508.
- Castoldi R, Charlo HCO, Dalpian T, Melo DM, Botelho AP, Braz LT (2012) Identification of new *Bremia lactucae* races in lettuce in São Paulo state. **Horticultura Brasileira** 30:209–213.



Ceresini PC (2018) Estrutura Genética de Populações, Abordagens Analíticas e Estratégias de Manejo Durável de Doenças Baseadas no Potencial Evolutivo de Fitopatógenos. In: DALLAGNOL LJ (Eds.). **Resistência genética: de plantas a patógenos**. Pelotas: Ed. UFPel, p. 103–125.

Choi YJ, Thines M, Han JG, Shin HD (2011) Mitochondrial phylogeny reveals intraspecific variation in *Peronospora effusa*, the spinach downy mildew pathogen. **Journal of Microbiology** 49:1039–1043.

Crute IR (1987) The geographical distribution and frequency of virulence determinants in *Bremia lactucae*: relationships between genetic control and host selection. In: Wolfe MS, Caten CE (Eds.) **Populations of Plant Pathogens: Their Dynamics and Genetics**. Oxford, UK: Blackwell Scientific, p. 193–212.

Crute IR (1992) The role of resistance breeding in the integrated control of downy mildew (*Bremia lactucae*) in protected lettuce. **Euphytica** 63:95–102.

van Ettehoven K, van der Arend A (1999) Identification and denomination of “new” races of *Bremia lactucae*. Eucarpia Meeting on Leafy Vegetables Genetics and Breeding. **Anais...** Olomuc: Czech Republic.

Fall ML, Van der Heyden H, Beaulieu C, Carisse O (2015) *Bremia lactucae* Infection Efficiency in Lettuce is Modulated by Temperature and Leaf Wetness Duration Under Quebec Field Conditions. **Plant Disease** 99:1010–1019.

Fletcher K, Gil J, Bertier LD, Kenefick A, Wood KJ, Zhang L, Reyes-Chin-Wo S, Cavanaugh K, Tsuchida C, Wong J, Michelmore R (2019) Genomic signatures of heterokaryosis in the oomycete pathogen *Bremia lactucae*. **Nature Communications** DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10550-0>

Franco CA (2016) **Monitoramento de raças de *Bremia lactucae* em alface no ano de 2014 e sua distribuição no Estado de São Paulo**. 34 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Unesp, Jaboticabal.

Galatti FS, Castoldi R, Braz LT, Panizzi RC (2013) Monitoramento de raças de *Bremia lactucae* em 2010 e 2011 no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica** 38: 271–279.

van Hese N, Huang CJ, Vleeschauwer D, Delaere I, Pauwelyn E, Bleyaert P, Höfte M (2016) Evolution and distribution of virulence characteristics of Belgian *Bremia lactucae* populations between 2008 and 2013. **European Journal of Plant Pathology** 144:431–441.

Hulbert SH, Michelmore RW (1985) Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*). **Theoretical and Applied Genetics** 70:520–528.

ISF. The International Bremia Evaluation Board (IBEB). Disponível em: <<https://www.worldseed.org/our-work/plant-health/other-initiatives/ibeb/>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

IBEB-US Lettuce Downy Mildew (*Bremia lactucae*) Ring Test Work Instructions <https://bremia.ucdavis.edu/data/IBEB%20Lettuce%20Downy%20Mildew%20Ring%20Test%20Protocol%20Draft%2003-26-2018.pdf>

Lebeda A (1984) Race-specific factors of resistance to *Bremia lactucae* in the world assortment of lettuce. **Scientia Horticulturae** 22:23–32.

Lebeda A, Pink DAC, Astley D (2002) Aspects of the Interactions Between Wild *Lactuca* Spp. and Related Genera and Lettuce Downy Mildew (*Bremia lactucae*). In: Spencer-Phillips PTN, Gisi U, Lebeda A (Eds.) **Advances in downy mildew research**. Holanda: Kluwer Academic Publishers, p. 85–117.

Lebeda A, PetrZelová I (2004) Variation and distribution of virulence phenotypes of *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. **Plant Pathology** 53:316–324.

Lebeda A, Zinkernagel V (2003a) Characterization of new highly virulent German isolates of *Bremia lactucae* and efficiency of resistance in wild *Lactuca* spp. germplasm. **Journal of Phytopathology** 151:274–282.

Lebeda A, Zinkernagel V (2003b) Evolution and distribution of virulence in the German population of *Bremia lactucae*. **Plant Pathology** 52:41–51.

McDonald BA (2014) Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. **Tropical Plant Pathology** 39(3):191-196.

Marin M (2016) **Monitoramento de raças e distribuição dos fatores de virulência de *Bremia lactucae*, em alface, no estado de São Paulo em 2014 e 2015**. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia agrônômica) – Unesp, Jaboticabal.

Marin MV, Franco CA, Smilde D, Panizzi RC, Braz LT (2019) Distribution of races and virulence factors of *Bremia lactucae* in the main lettuce production area in Brazil. **Journal of Plant Pathology**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42161-019-00444-x>>.

Michelmore RW, Christopoulou M, Caldwell KS (2013) Impacts of resistance gene genetics, function and evolution on a durable future. **Annual Review of Phytopathology** 51:291-319.

Michelmore RW, Crute IR (1982) A method for determining the virulence phenotype of *Bremia lactucae* isolates. **Transactions of the British Mycological Society** 79:542–546.

Michelmore RW, Ingram DS (1980) Heterothallism in *Bremia lactucae*. **Transactions of the British Mycological Society** 75:47–56.

Michelmore RW, Truco MJ, Sanders P, Xu H, Kenefick A, Gil J, Simko I, Mccreight J, Subbarao K, Gordon T, Koike S (2018) Breeding Crisphead and Leafy Lettuce. Annual Report. **Anais eletrônicos...** Salina, CA, USA, 2018. Disponível em: <<http://calgreens.org/wp-content/uploads/2018/08/Michelmore-Truco-crisp-leafy-report-2017-2018-06-23-18-final.pdf>> . Acesso em 20 de janeiro de 2020.

- Michelmore R, Wong J (2008) Classical and molecular genetics of *Bremia lactucae*, cause of lettuce downy mildew. **European Journal of Plant Pathology** 122:19–30.
- Nordskog B, Elameen A, Gadoury DM, Hermansen A (2014) Virulence characteristics of *Bremia lactucae* populations in Norway. **European Journal of Plant Pathology** 139:679–686.
- Nordskog B, Gadoury DM, Seem RC, Hermansen A (2007) Impact of Diurnal Periodicity, Temperature, and Light on Sporulation of *Bremia lactucae*. **Phytopathology** 97:979–986.
- Nunes RC, Castoldi R, Gomes RF, Tobar-Tosse DE, Braz LT (2016) Levantamento de raças do agente causador do míldio da alface no Estado de São Paulo em 2012 e 2013. **Summa Phytopathologica** 42:53–58.
- Ondov BD, Starrett GJ, Sappington A, Kostic A, Koren S, Buck CB, Phillippy (2019) Mash Screen: high-throughput sequence containment estimation for genome discovery <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1841-x>.
- Parra L, Maisonneuve B, Lebeda A, Schut J, Christopoulou M, Jeuken M, Mchale L, Truco MJ, Crute I, Michelmore R (2016) Rationalization of genes for resistance to *Bremia lactucae* in lettuce. **Euphytica** 210:309–326.
- Perrot S, Buffard M, Grimault V (2015) European harmonization of evaluation of resistance of lettuce to *Bremia lactucae*. In: Proceedings Eucarpia Leafy Vegetables Congress. **Anais...** Murcia: Spain.
- Petrželová I, Lebeda A, Kosman E (2013) Distribution, disease level and virulence variation of *Bremia lactucae* on *Lactuca sativa* in the Czech Republic in the period 1999-2011. **Journal of Phytopathology** 161:503–514.
- Schettini TM, Legg EJ, Michelmore RW (1991) Insensitivity to Metalaxyl in California Populations of *Bremia lactucae* and Resistance os California Lettuce Cultivars to Downy Mildew. **Phytopathology** 81:64–70.
- Sharaf K, Lewinsohn D, Nevo E, Beharav A (2007) Virulence patterns of *Bremia lactucae* in Israel. **Phytoparasitica** 35:100–108.
- Souza JO, Dalpian T, Braz LT, Camargo M (2011) Novas raças de *Bremia lactucae*, agente causador do míldio da alface, identificadas no estado de São Paulo. **Horticultura Brasileira** 29:282–286.
- Töfoli JG, Domingues RJ, Ferrari JT (2014) Míldio e mofo branco da alface: doenças típicas de inverno. **Biológico** 76:19–24.
- Trimboli DS (2004) A new pathotype of *Bremia lactucae* on lettuce in Australia. **Australasian Plant Pathology** 33:605.
- Trimboli DS, Nieuwenhuis J (2011) New races of *Bremia lactucae* on lettuce in Australia. **Australasian Plant Disease Notes** 6:62–63.
- Tsuchida C (2017) Variation of *Bremia lactucae*, the Causal Agent of Lettuce Downy Mildew. Dissertação - University of California, Davis.

Vargas PF, Túlio FA, Andrade MAP (2012) Monitoramento de raças de *Bremia Lactucae* em alface no Estado de Minas Gerais em 2010. **Ciência et Praxis** 5:7–10.

Wicks TJ, Hall B, Pezzaniti P (1993) Fungicidal control of downy mildew (*Bremia lactucae*) on lettuce. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 33:381–384.

Wu BM, Subbarao KV, Bruggen AHC (2007) Factors affecting the survival of *Bremia lactucae* sporangia deposited on lettuce leaves. **Phytopathology** 90:827–833.

Wu BM, Subbarao KV, Bruggen AHC, Koike ST (2007) Comparison of Three Fungicide Spray Advisories for Lettuce Downy Mildew. **Plant Disease** 85:895–900.

### **CAPÍTULO 3 – Sensibilidade de *Bremia lactucae* a fungicidas utilizando dois métodos de aplicação**

**RESUMO** - O míldio da alface causado por *Bremia lactucae* é uma das principais doenças que ocorrem durante o inverno. Seu controle é realizado principalmente pelo uso de cultivares resistentes e fungicidas. Entretanto, devido à sua grande variabilidade, existem vários relatos de desenvolvimento de insensibilidade a fungicidas. Identificar a ocorrência de insensibilidade a fungicidas é fundamental, pois diminui o risco de evolução de resistência e garante maior eficiência dos compostos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade de *B. lactucae* a fungicidas. Este trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foram realizados experimentos individuais para os fungicidas: dimetomorfe, mandipropamida e oxathiapiprolin. Cada composto foi aplicado nas raízes, ou pulverizado nas folhas cotiledonares da cultivar Green Towers, nas doses de 0, 10, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup>, utilizando apenas um isolado de *B. lactucae*. Na segunda etapa, avaliaram-se quatro isolados de *B. lactucae*, utilizando os mesmos fungicidas, porém nas doses de 10 mg L<sup>-1</sup> pulverizados nas folhas cotiledonares ou de 50 mg L<sup>-1</sup> aplicados diretamente nas raízes das plântulas. Apesar dos isolados de *B. lactucae* terem apresentado esporulação quando os fungicidas foram aplicados nas raízes, esses não puderam ser tidos como insensíveis. Pois, quando os compostos foram pulverizados diretamente nas folhas, houve total inibição da doença, mesmo na dose de 10 mg L<sup>-1</sup> de todos os fungicidas avaliados. Assim, a pulverização dos fungicidas nas folhas é mais confiável para avaliação de sensibilidade de *B. lactucae* em condições similares às avaliadas no presente trabalho.

**Palavras-chave:** dimetomorfe, mandipropamida, míldio da alface, oxathiapiprolin, resistência a fungicida

### CHAPTER 3 - Sensitivity of *Bremia lactucae* to fungicides using two application methods

**ABSTRACT** – Lettuce downy mildew caused by *Bremia lactucae* is one of the main diseases that occur during winter. Its control is carried out mainly by the use of resistant cultivars and fungicides. However, due to its great variability, there are several reports of the development of insensitivity to fungicides. Identifying the occurrence of insensitivity to fungicides is fundamental, as it reduces the risk of resistance evolution and ensures greater efficiency of the compounds. The aim of this work was to evaluate the sensitivity of *B. lactucae* to fungicides. This work was carried out in two stages. In the first stage, individual experiments were carried out for the fungicides: dimetomorph, mandipropamid and oxathiapiprolin. Each compound was applied on the roots or sprayed on cotyledon leaves of the cultivar Green Towers, in doses of 0, 10, 25 and 50 mg L<sup>-1</sup>, using only one isolate of *B. lactucae*. In the second stage, four isolates of *B. lactucae* were evaluated, using the same fungicides, however at doses of 10 mg L<sup>-1</sup> sprayed on the cotyledon leaves or 50 mg L<sup>-1</sup> applied directly to the seedling roots. Although *B. lactucae* isolates showed sporulation when the fungicides were applied to the roots, they could not be considered insensitive. Because, when the compounds were sprayed directly on the leaves, there was total inhibition of the disease, even at the dose of 10 mg L<sup>-1</sup> of all evaluated fungicides. Thus, spraying fungicides on the leaves is more reliable in assess the sensitivity of *B. lactucae* under conditions similar to those evaluated in the present study.

**Keywords:** dimetomorph, mandipropamid, lettuce downy mildew, oxathiapiprolin, fungicide resistance

## 1 INTRODUÇÃO

Os oomicetos são patógenos causadores de doenças importantes e caracterizados por serem de fácil adaptação, conferindo grande variabilidade em suas populações. O míldio da alface causado pelo oomiceto *Bremia lactucae* Regel é a principal doença que ocorre em condições de clima ameno, tanto no campo quanto em cultivo protegido, no mundo todo (Crute e Dixon, 1981). No Brasil, esta doença pode causar perdas superiores a 80% durante o inverno (Töfoli et al., 2014).

O uso de fungicidas, aliados ao uso de cultivares resistentes são as principais medidas de controle do míldio da alface. No Brasil, o custo com insumos para a produção de 1.600 engradados contendo nove unidades ha<sup>-1</sup> de alface é R\$ 6.080,45, sendo que R\$ 626,00 (10,29%) do valor total, são gastos apenas com fungicidas (AGRIANUAL, 2020).

Insensibilidade de *B. lactucae* a fungicidas tem sido avaliada pelo mundo todo. No entanto, até no presente momento, nenhum estudo no Brasil foi realizado no sentido de identificar linhagens de míldio resistentes a fungicidas. Tais informações são extremamente necessárias, pois podem evitar que o produtor utilize produtos fitossanitários ineficazes e dispensem custo desnecessário.

Relatos de insensibilidade de *B. lactucae* a fungicidas foram realizados no Reino Unido, Austrália e nos Estados Unidos (Califórnia), quando isolados coletados em campo de produção, apresentaram resistência ao ingrediente ativo (i.a.) metalaxil do grupo das fenilamidas (Schettini et al., 1991; Crute, 1992; Wicks et al., 1994; Brown et al., 2004). Quando este fungicida foi introduzido no mercado, era capaz de promover controle eficaz da doença. No entanto, no final dos anos 1980, falhas na sua utilização começaram a ser observadas e, posteriormente foram confirmadas em laboratório (Schettini et al., 1991; Brown et al., 2004).

A resistência a fungicidas do grupo das fenilamidas também foi observada em outros oomicetos como *Pseudoperonospora cubensis*, *Phytophthora infestans*, *Plasmopara viticola*, *Peronospora tabacina*, *P. cinnamomi*, *P. parasitica*, *Pythium* spp., *Plasmopara halstedii*, *P. erythroseptica*, *Peronospora viciae* e *P. destructor* (Gisi e Sierotzki, 2008).

Após o fracasso no uso de fungicidas a base de metalaxil, outros produtos passaram a ser utilizados. Na Califórnia, no final dos anos 80, o controle do míldio da alface passou a ser feito utilizando fungicidas fosetil-alumínio e maneb. O maneb

permaneceu eficaz por vários anos, mas por ser um fungicida de contato, proporciona controle incompleto, sendo medida preventiva e não curativa. Já o fosetil-alumínio, trata-se de fungicida sistêmico que induz resposta de resistência nas plantas. Em 1997 e 1998, foi observado alta infestação de míldio em campos tratados com fosetil-alumínio e/ou maneb. A doença causou perdas significativas, mesmo com uso repetido desses fungicidas. O possível desenvolvimento de raças de *B. lactucae* insensíveis também ao fosetil-alumínio passou a representar ameaça significativa ao manejo do míldio (Brown et al., 2004).

Nos últimos anos vários novos fungicidas têm sido desenvolvidos para o controle de oomicetos. A maior parte desses fungicidas atuam em sítios específicos, como os do grupo das fenilamidas, e apresentam alto risco de causar a evolução de subpopulações resistentes de patógenos, pelo uso contínuo destes fungicidas (Gisi e Sierotzki, 2008). Outros exemplos dos principais fungicidas que atuam em sítio específico são os do grupo das amidas do ácido carboxílico (CAA-fungicidas, ex. mandipropamida, dimetomorfe), inibidores de quinona oxidase (Qol fungicidas, ex. azoxistrobina), cianoacetamida-oxima (ex. cimoxanil) e inibidores do homólogo da proteína de ligação a oxisterol (OSBPI, ex. oxathiapiprolin) (Gisi e Sierotzki, 2008; Cohen et al., 2018).

Os fungicidas CAA têm sido utilizados amplamente nos últimos anos no controle de doenças foliares. Tais fungicidas agem em oomicetos fitopatogênicos, inibindo a biossíntese de fosfolipídios e modificando a parede celular, na síntese de celulose, impedindo a germinação dos esporos, no caso de *B. lactucae* (Cohen et al., 2008; Blum et al., 2009; Wang et al., 2013).

Estudos realizados com isolados provenientes de campos de produção indicaram que o mandipropamida tem sido altamente eficaz contra míldio da videira, requeima da batateira e do tomateiro, míldio da alface, além de outros oomicetos causadores de doenças em hortaliças (Huggenberger et al., 2005; Harp et al., 2006; Huggenberger e Kuhn, 2006; Cohen et al., 2008).

Wicks et al. (1994) observaram que dimetomorfe foi capaz de controlar isolados de *B. lactucae* sensíveis ao metalaxil, indicando seu uso em alface. No entanto, esses mesmos autores advertem que se esse composto for usado indiscriminadamente, verificações regulares serão necessárias para que a insensibilidade que venha a ocorrer em baixa frequência, não se torne generalizada.



O oxathiapiprolin é um fungicida descoberto mais recentemente, atuando na inibição da proteína de ligação ao oxisterol, que afeta os estágios assexuais de reprodução dos patógenos (Cohen, 2015; Pasteris et al., 2016). A aplicação desse fungicida tem demonstrado atividade extremamente alta contra oomicetos (Cohen, 2015; Qu et al., 2016; Cohen et al., 2018), sendo eficaz quando aplicado preventiva ou curativamente, nas folhas ou no sistema radicular (Cohen, 2020). Entretanto, Olaya et al. (2019) afirmam que o risco de desenvolvimento de resistência para esse fungicida é considerado médio a alto e o gerenciamento de resistência deve ser implementado quando usado em campo.

Esses três fungicidas atuam em sítios específicos e conseqüentemente, apresentam risco médio a alto de desenvolvimento de populações resistentes (Gisi e Sierotzki, 2008; Pasteris et al., 2016; Qu et al., 2016). Entre as estratégias para evitar resistência aos fungicidas e prolongar sua eficiência no campo, estão: monitoramento constante das populações e diminuição da pressão de seleção, utilizando doses e frequências conscientes, rotacionando os ingredientes ativos (i.a.) aplicados e realizando também manejo integrado da cultura (Ghini e Kimati, 2000).

Portanto, monitorar a sensibilidade de *B. lactucae* a fungicidas é fundamental para o controle da doença, sendo indicativo de evolução de resistência no campo (Cohen et al., 2007), auxiliando na elaboração de estratégias para que não ocorra resistência. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar isolados de *B. lactucae* quanto a sensibilidade a fungicidas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi executado no Laboratório do Professor Richard Michelmore, no Genome Center da Universidade da Califórnia (UC), Davis, CA/EUA.

Por meio de uma entrevista informal com produtores de alface da região de Salinas, CA, EUA, identificaram-se quais eram os principais fungicidas utilizados para controle do míldio da alface. Dentre os produtos citados, três que apresentam maior eficiência foram escolhidos. Dessa forma, avaliaram-se os fungicidas: mandipropamida (Revus, Syngenta), dimetomorfe (Forum, Basf) e oxathiapiprolin (Orondis, Syngenta). No Brasil, apenas os dois primeiros produtos são registrados para o controle do míldio da alface.

## 2.1 Determinação da sensibilidade de um isolado de *Bremia lactucae* a três fungicidas

Na primeira etapa foram realizados experimentos individuais para cada ingrediente ativo (i. a.). Os ingredientes ativos mandipropamida, oxathiapiprolin e dimetomorfe foram testados, respectivamente, através dos produtos comerciais Revus (Syngenta), Orondis (Syngenta) e Forum (BASF). O delineamento experimental empregado em cada experimento foi inteiramente casualizado, com três repetições. As concentrações avaliadas foram 0 (controle), 10, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup> de cada ingrediente ativo, aplicados nas raízes (R) ou nas folhas cotiledonares (F).

O isolado de míldio da alface utilizado nestes experimentos foi o C98O622b (622b), coletado na região costal da Califórnia em 1998, tendo seu tipo sexual identificado como B<sub>2</sub> (Tsuchida, 2017).

A cultivar suscetível a *B. lactucae*, Green Towers, foi utilizada em todos os experimentos. Ela foi semeada em caixa acrílica dividida em 24 partes, contendo de 10 a 15 sementes por compartimento. Antes da semeadura, cada compartimento foi forrado com papel filtro e irrigado com solução nutritiva de Hewitt (Hewitt, 1952). Após o semeio, a caixa foi vedada com Parafilm<sup>®</sup> e armazenada a 15°C, com fotoperíodo de 12h.

Após seis dias da semeadura, dez plântulas foram transferidas para caixas do tipo Magenta<sup>®</sup>, forradas com papel filtro, sendo que cada caixa correspondeu a uma parcela.

Uma solução estoque de 100 mg L<sup>-1</sup> de cada fungicida foi preparada com água destilada e posteriormente diluída para 10, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup> de ingredientes ativos. Para o método de solução aplicada diretamente nas raízes - R, dois mL da solução, de cada concentração separadamente, foram aplicados diretamente nas raízes das plântulas com auxílio de uma pipeta automática. Já nas parcelas que receberam o fungicida pulverizado nas folhas - F, todas as folhas cotiledonares foram pulverizadas utilizando-se borrifador plástico. Foi utilizado cerca de dois mL por caixa Magenta<sup>®</sup> da solução de cada concentração. Após a aplicação do fungicida, as caixas foram armazenadas em câmara de crescimento, a 15°C, com fotoperíodo de 12h.

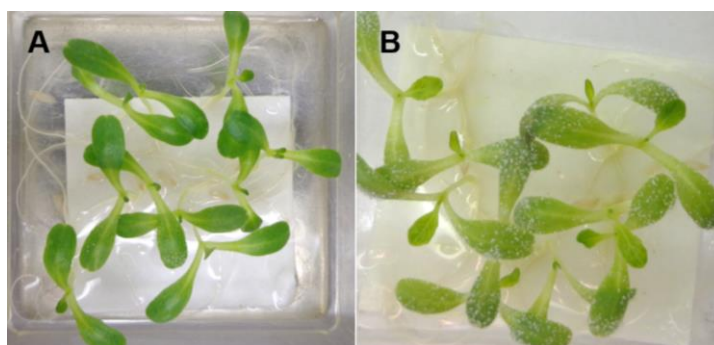
Quando a solução do fungicida foi aplicada diretamente nas raízes R, procurou-se avaliar a atuação sistêmica deste. Já quando a solução do fungicida foi pulverizada diretamente nas folhas (F) procurou-se avaliar a eficiência na ação local dos ingredientes ativos.

Após 24 horas da aplicação de cada fungicida, realizou-se a inoculação do isolado 622b de *B. lactucae*. Os esporângios utilizados na inoculação foram obtidos de plântulas de 'Green Towers' esporuladas, inoculadas sete dias antes da implantação do experimento. As folhas cotiledonares, apresentando esporulação profusa, foram cortadas e lavadas por agitação em 15 mL de água destilada. Esta suspensão foi então centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O pellet obtido foi ressuspensão em 10 mL de água destilada, que posteriormente foram calibrados, de modo a se obter entre 1 e 5 x 10<sup>4</sup> esporângios mL<sup>-1</sup>. As parcelas do controle consistiram em plântulas de 'Green Towers' inoculadas com o isolado 622b de *B. lactucae* e não tratadas com fungicida.

Após a incubação, a esporulação de *B. lactucae* foi avaliada utilizando-se uma escala de notas de 0; 2; 4 e 5. Quando não houve esporulação de *B. lactucae* visível, a folha cotiledonar recebeu nota zero; já as folhas cotiledonares com pouca esporulação, nota 2; quando a esporulação estava dispersa, nota 4 e quando estava completamente esporulada, atribuiu-se a nota 5. A severidade da doença na parcela foi então obtida utilizando a seguinte fórmula:

$$S(\%) = (0 \times n) + (2 \times n) + (4 \times n) + (5 \times n)$$

em que  $n$  = número de cotilédones com cada nota correspondente. A Figura 1 contém exemplos de plântulas esporuladas com *B. lactucae*.



**Figura 1.** Diferentes graus de severidade de *Bremia lactucae* nas plântulas de 'Green Towers' tratadas com fungicidas. A – plântulas sem esporulação (nota zero), com pouca esporulação (nota 2) e com esporulação dispersa. B – plântulas completamente infectadas (nota 5).

As avaliações foram realizadas 5; 7; 11; 14 e 19 dias após a inoculação do isolado 622b de *B. lactucae*.

Além disso, o isolado foi classificado como sensível - quando não houve esporulação/incidência do patógeno na presença do fungicida; e como insensível (sinônimo de resistente) - quando houve esporulação/incidência do patógeno na presença do fungicida.

## **2.2 Determinação da sensibilidade de quatro isolados de *Bremia lactucae* a três fungicidas**

Na segunda etapa, foram avaliadas a sensibilidade de quatro isolados de *B. lactucae* aos fungicidas DMM, MDP e OXT. Foi realizado um experimento para cada isolado, com os três fungicidas, submetidos às concentrações de 10 mg L<sup>-1</sup> de i.a. aplicados na folha (F) e de 50 mg L<sup>-1</sup> aplicado nas raízes das plântulas de 'Green Towers' (R).

Optou-se por utilizar apenas duas concentrações dos fungicidas a fim de se avaliar o maior número de isolados, tendo em vista que o primeiro experimento serviu para balizar as doses e metodologias de aplicação desta etapa.

Foram utilizados os isolados de *B. lactucae* 622b (o mesmo utilizado nos primeiros experimentos), SF5 (coletado na Finlândia, tipo sexual B<sub>1</sub>) (Osara e Crute, 1981), C14C1485 (coletados em King City, Califórnia-EUA, em 2014, tipo sexual B<sub>1</sub>, sensível ao mefenoxan) e C14C1486 (coletados em King City, Califórnia-EUA, em 2014, tipo sexual B<sub>2</sub>, insensível ao metalaxil) e armazenados e multiplicados na Universidade da Califórnia, Davis, EUA (Tuschida, 2017).

Os procedimentos utilizados na implantação e avaliação deste experimento, foram os mesmos descritos no primeiro experimento.

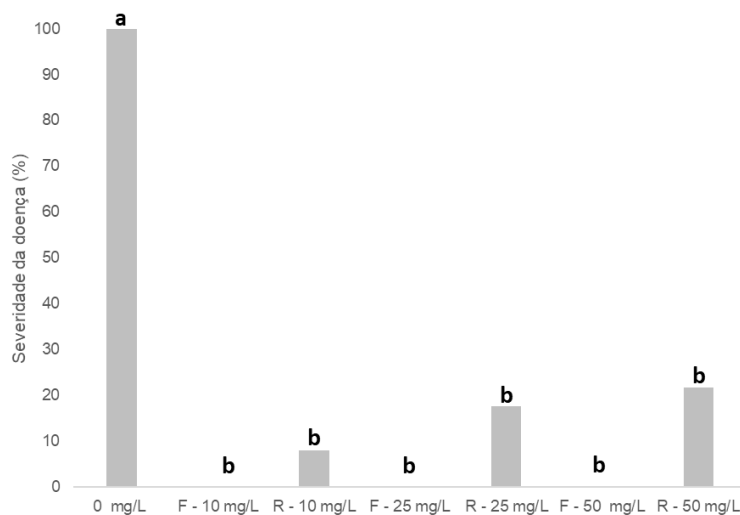
## **2.3 Análise estatística**

Os dados da última avaliação (19 d.a.i.) de cada experimento foram submetidos a uma análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

### 3 RESULTADOS

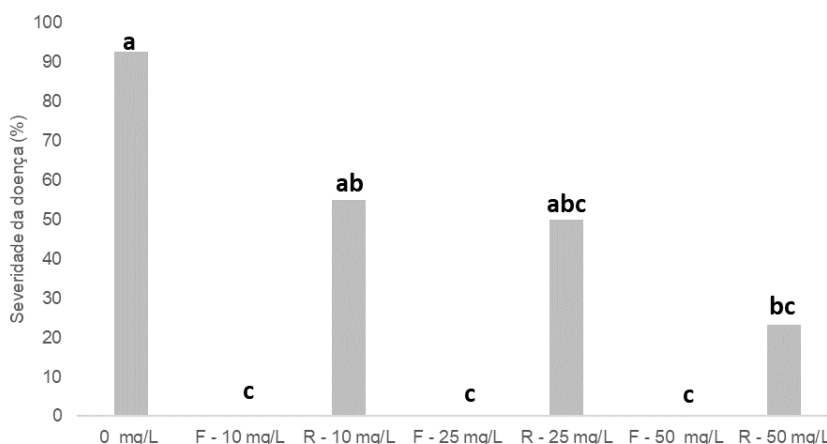
#### 3.1 Determinação da sensibilidade de um isolado de *Bremia lactucae* a três fungicidas

Na primeira etapa, utilizando o fungicida dimetomorfe e o isolado 622b de *B. lactucae*, não houve esporulação nas plântulas que receberam o composto pulverizado nas folhas cotiledonares (Figura 2). Já plântulas em que o fungicida foi aplicado nas raízes (R), houve esporulação em todas as doses avaliadas, chegando a 22% de severidade da doença (R – 50 mg L<sup>-1</sup>).



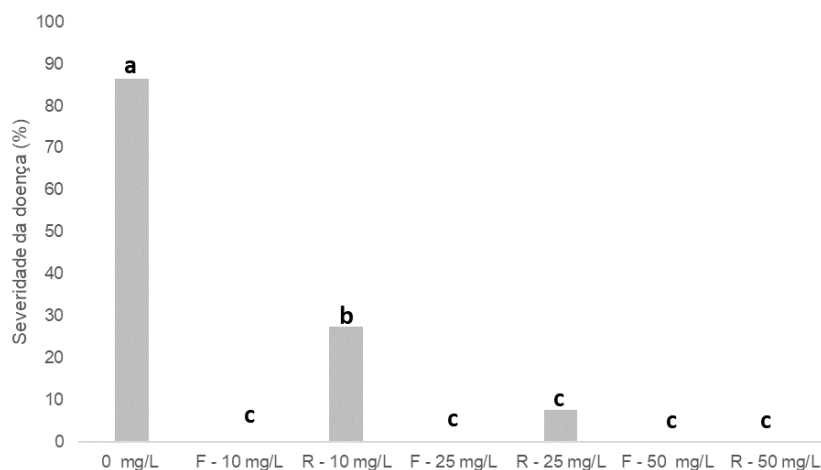
**Figura 2.** Severidade da doença causada pelo isolado 622b de *Bremia lactucae* em plântulas da cultivar Green Towers, 19 dias após a inoculação, submetidas às doses de 0 (controle), 10, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup> de dimetomorfe (DMM), aplicadas nas folhas (F) ou nas raízes (R). Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando o fungicida mandipropamida foi avaliado, o controle total da doença só foi obtido quando este foi aplicado diretamente nas folhas (F) (Figura 3). A severidade da doença observada nos tratamentos com o fungicida aplicado nas raízes (R) foi de 55 e 50% nas doses de 10 e 25 mg L<sup>-1</sup> do i.a, respectivamente, e de 23% na dose de 50 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Severidade da doença causada pelo isolado 622b de *Bremia lactucae* em plântulas da cultivar Green Towers, 19 dias após a inoculação, submetidas às doses de 0 (controle), 10, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup> de mandipropamida (MPD), aplicadas nas folhas (F) ou nas raízes (R). Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto ao fungicida oxathiapiprolin, o tratamento utilizando a dose de 50 mg L<sup>-1</sup> do i.a., quando aplicado nas raízes (R), foi eficiente, diferentemente do que houve com os outros fungicidas, causando controle total da infecção causada por *B. lactucae* (Figura 4). Além disso, a severidade da doença nas outras doses aplicadas nas raízes (R), foi menor que 30%.



**Figura 4.** Severidade da doença causada pelo isolado 622b de *Bremia lactucae* em plântulas da cultivar Green Towers, 19 dias após a inoculação, submetidas às doses de 0 (controle), 10, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup> de oxathiapiprolin (OXT), aplicadas nas folhas (F) ou nas raízes (R). Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim, foi possível observar que todos os fungicidas, quando aplicados na folha (F) apresentaram 100% de eficiência no controle do isolado 622b de *B. lactucae* (Figuras 2, 3 e 4). No entanto, com exceção de 50 mg L<sup>-1</sup> de OXT aplicados nas raízes (R), todos os outros fungicidas permitiram esporulação quando utilizaram este método de aplicação.

O isolado 622b poderia ser classificado como insensível pois, foi capaz de infectar as plântulas, mesmo que de forma reduzida em comparação ao controle, quando todos os fungicidas foram aplicados na raiz (R). No entanto, há que se ponderar esta classificação, já que quando os fungicidas foram aplicados nas folhas cotiledonares (F), a inibição da esporulação foi completa.

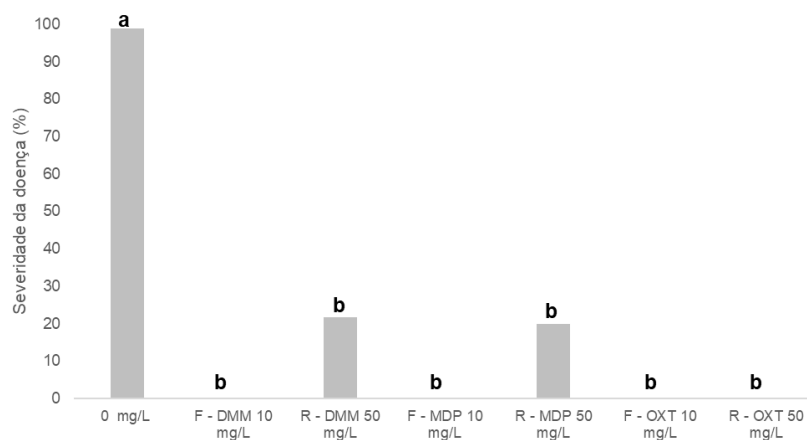
### **3.2 Determinação da sensibilidade de quatro isolados de *Bremia lactucae* a três fungicidas**

Na segunda etapa foram avaliados quatro isolados de *B. lactucae*, quanto à sensibilidade aos mesmos fungicidas avaliados anteriormente. Como na primeira etapa foi possível observar que a menor dose dos fungicidas, quando aplicados nas folhas cotiledonares (F), foi suficiente para suprimir o processo de infecção, optou-se por utilizar apenas a dose de 10 mg L<sup>-1</sup> dos i.a. aplicados nas folhas (F). Por outro lado, a maior dose, de 50 mg L<sup>-1</sup> de i.a. dos fungicidas avaliados, aplicados na raiz (R), em que na sua maioria, não suprimiram a doença. Assim, os dois extremos puderam ser avaliados para os novos isolados de *B. lactucae*.

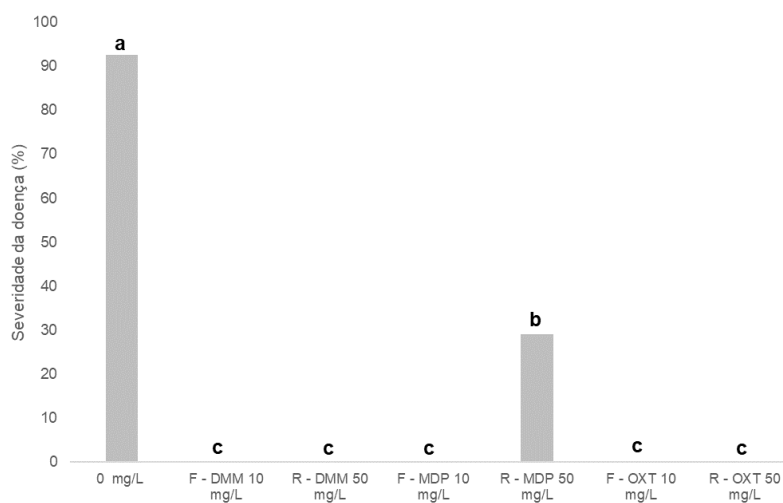
O isolado 622b de *B. lactucae* apresentou esporulação apenas nos tratamentos aplicados nas raízes. No entanto, este isolado apresentou sensibilidade no tratamento de 50 mg/L – R para o fungicida OXT (Figura 5). Apesar de observada esporulação nos demais tratamentos aplicados nas raízes, observa-se que o isolado apresentou sensibilidade aos fungicidas avaliados, já que a doença não avançou mais que 30%.

O isolado SF5 foi o mais sensível aos fungicidas avaliados e não esporulou quando dimetomorfe e oxathiapiprolin foram aplicados, independentemente do método (Figura 6). No entanto, este isolado apresentou 29% de esporulação na dose R - 50 mg/L para o fungicida MDP. Tal evento poderia significar insensibilidade por parte do isolado. No entanto, quando o mesmo fungicida foi aplicado nas folhas

(F - MDP 10 mg/L), foi observada inibição total da esporulação, contradizendo a afirmação anterior.



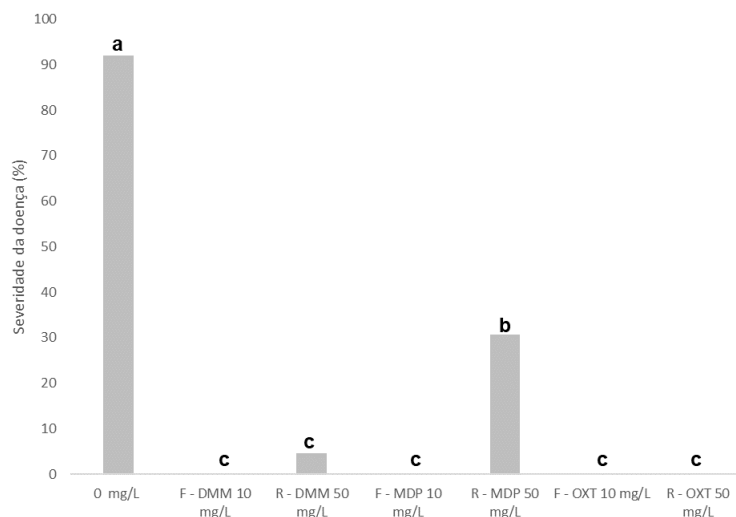
**Figura 5.** Severidade da doença causada pelo isolado 622b de *Bremia lactucae* em plântulas da cultivar Green Towers, 19 dias após a inoculação, submetidas aos fungicidas dimetomorfe (DMM), mandipropamida (MDP) e oxathiapiprolin (OXT), nas doses de 0 (controle), 10 mg L<sup>-1</sup> aplicados nas folhas cotiledonares (F) e 50 mg L<sup>-1</sup> aplicados nas raízes (R). Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 6.** Severidade da doença causada pelo isolado SF5 de *Bremia lactucae* em plântulas da cultivar Green Towers, 19 dias após a inoculação, submetidas aos fungicidas dimetomorfe (DMM), mandipropamida (MDP) e oxathiapiprolin (OXT), nas doses de 0 (controle), 10 mg L<sup>-1</sup> aplicados nas folhas cotiledonares (F) e 50 mg L<sup>-1</sup> aplicadas nas raízes (R). Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Na Figura 7 é possível observar que ocorreu doença apenas nos tratamentos R - MDP 50 mg/L e R - DMM 50 mg/L, não atingindo mais que 30% de doença para o isolado 1485. Os demais tratamentos foram completamente eficientes no controle deste isolado.

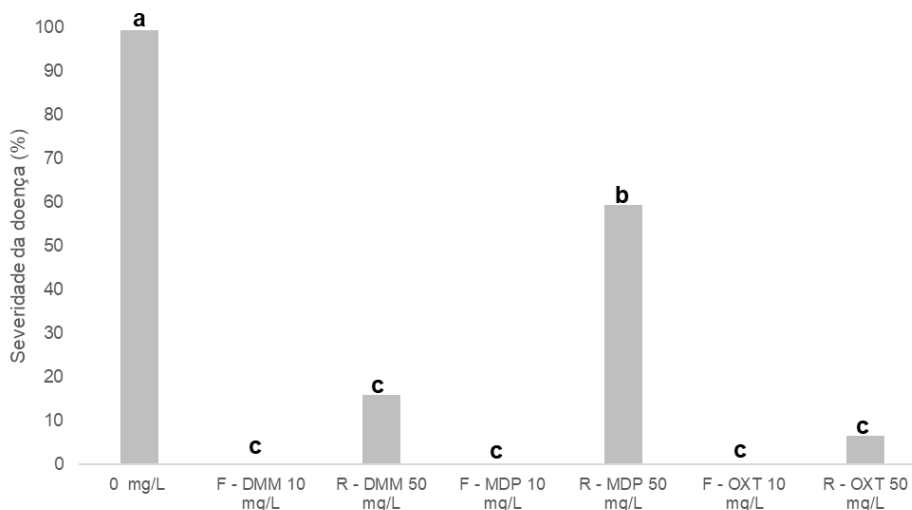


**Figura 7.** Severidade da doença causada pelo isolado 1485 de *Bremia lactucae* em plântulas da cultivar Green Towers, 19 dias após a inoculação, submetidas aos fungicidas dimetomorfe (DMM), mandipropamida (MDP) e oxathiapiprolin (OXT), nas doses de 0 (controle), 10 mg L<sup>-1</sup> aplicados nas folhas cotiledonares (F) e 50 mg L<sup>-1</sup> aplicadas nas raízes (R). Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O isolado 1486 foi o único que apresentou esporulação em todas as doses aplicadas nas raízes. Em relação ao R - MDP 50 mg/L, a severidade da doença chegou a 59% (Figura 8).

De um modo geral não houve infecção causada pelos isolados avaliados de *B. lactucae*, quando as folhas cotiledonares foram tratadas diretamente com os fungicidas (F) testados.

Já quando os fungicidas foram aplicados na raiz (R - 50 mg/L), os resultados obtidos variaram. Quando o OXT foi aplicado, o controle da doença não foi completo apenas para o isolado 1486. Para os demais isolados, este foi o único fungicida que foi eficiente nos dois tratamentos (F - 10 mg/L e R - 50 mg/L).



**Figura 8.** Severidade da doença causada pelo isolado 1486 de *Bremia lactucae* em plântulas da cultivar Green Towers, 19 dias após a inoculação, submetidas aos fungicidas dimetomorfe (DMM), mandipropamida (MDP) e oxathiapiprolin (OXT), nas doses de 0 (controle), 10 mg L<sup>-1</sup> aplicados nas folhas cotiledonares (F) e 50 mg L<sup>-1</sup> aplicadas nas raízes (R). Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Considerando que houve esporulação quando os fungicidas foram aplicados nas raízes (R), mesmo que em baixa porcentagem, os quatro isolados poderiam ser classificados com insensíveis ao MDP; os isolados 622b, 1485 e 1486 ao DMM; e o 1486, ao OXT. No entanto, como não houve esporulação dos isolados quando os fungicidas foram aplicados na folha (F - 10 mg/L), não é possível afirmar que estes isolados são realmente insensíveis/resistentes aos fungicidas avaliados neste trabalho.

#### 4 DISCUSSÃO

O controle do míldio da alface foi realmente efetivo apenas quando os fungicidas foram aplicados diretamente nas folhas cotiledonares. Quando os compostos foram aplicados próximos às raízes para serem absorvidos e transportados sistemicamente, a eficiência foi reduzida.

O dimetomorfe, pertencente ao grupo químico das amidas de ácido cinâmico (CAA), age de modo parcialmente sistêmico e de contato, com efeito profilático, curativo e erradicante contra oomicetos (Cohen et al., 1995). Este composto é prontamente translocado no xilema, mas não pelo floema (Cohen et al., 1995).

Portanto, quando o composto foi aplicado próximos às raízes, esperava-se controle parcial da doença.

Na Figura 9, pode se observar a ocorrência de esporulação de *B. lactucae* apenas na parte mais distal das folhas cotiledonares em oito plântulas, indicando que não houve transporte efetivo do fungicida em todas as plântulas. Em apenas duas plântulas houve inibição total da doença.



**Figura 9.** Esporulação do isolado 622b de *Bremia lactucae* em plântulas da cultivar Green Towers, tratadas com 50 mg L<sup>-1</sup> de dimetomorfe na raiz.

A ocorrência de esporulação nas plântulas tratadas na raiz era esperada, quando o fungicida mandipropamida foi utilizado, já que este composto não tem boa eficiência em se translocar pelo sistema vascular. Esse fungicida tem apresentado grande eficácia no controle de oomicetos, no entanto, foi desenvolvido para o tratamento da parte aérea de plantas, com modo de ação translaminar (de contato e profundidade), com baixa eficiência sistêmica (Cohen et al., 2008).

Pode ser visualizado na Figura 10, plântulas de alface 'Green Towers' tratadas com mandipropamida na raiz. Em quatro plântulas houve esporulação de *B. lactucae*. Nas outras seis houve controle total da doença.

Mesmo oxathiapiprolin sendo o fungicida mais eficiente entre os avaliados, sua capacidade de translocar o composto para toda plântula também não foi eficiente, quando aplicado na raiz. Na Figura 11 pode se observar que metade das plântulas apresentaram esporulação parcial de *B. lactucae* enquanto na outra metade a doença foi erradicada.



**Figura 10.** Esporulação do isolado 622b de *Bremia lactucae* em plântulas da cultivar Green Towers, tratadas com 50 mg L<sup>-1</sup> de mandipropamida na raiz.

O fungicida oxathiapiprolin, do grupo químico piperidinil-tiazole-isoxazolina, é localmente sistêmico, de ação translaminar, e move-se sistematicamente pelo xilema (Cohen, 2020). Segundo Cohen et al. (2008), mesmo pequena quantidade desse composto quando absorvida pelo sistema radicular é suficiente para suprimir o desenvolvimento de doenças foliares. No entanto, nas condições de plântula, a eficiência em translocar o composto não foi alta.



**Figura 11.** Esporulação do isolado 1486 de *Bremia lactucae* em plântulas da cultivar Green Towers, tratadas com 50 mg L<sup>-1</sup> de oxathiapiprolin na raiz.

A alta eficiência de mandipropamida e dimetomorfe no controle do míldio da alface, quando aplicados nas folhas condiz com as observações de Cohen et al. (2008), ao avaliarem a atividade de fungicidas do grupo CAA, entre eles, mandipropamida e dimetomorfe.

De acordo com Cohen et al. (2008), quando plântulas de alface foram tratadas borrifando os fungicidas nas folhas cotiledonares até o ponto de escorrimento, houve alta eficiência no controle da doença, sendo isto observado pela supressão da germinação dos esporângios de *B. lactucae*. Também identificaram que quando os fungicidas CAA são aplicados nas superfícies superiores das folhas de alface, há movimentação translaminar dos mesmos, inibindo a germinação de *B. lactucae* na superfície inferior. Concluíram que a distribuição sistêmica foi afetada, mesmo quando o fungicida avaliado deveria agir desse modo. Provavelmente, devido as plântulas ainda estarem em processo de formação dos tecidos vasculares, a distribuição do fungicida para todas as folhas cotiledonares não foi completamente eficaz.

Oxathiapiprolin é um dos mais novos fungicidas desenvolvidos para controle de doenças causadas por oomicetos e sua eficiência foi comprovada para *Phytophthora citrophthora*, *P. hibernalis*, *P. infestans*, *P. nicotianae*, *P. syringae* e *Pseudoperonospora cubensis* (Ji et al., 2014; Qu et al., 2016; Cohen et al., 2018; Gray et al., 2018). Esses mesmos estudos determinam metodologias para monitoramento de resistência a esses patógenos, e não identificaram sensibilidade nas populações avaliadas. Porém, esses mesmos autores advertem que seu uso contínuo pode promover o desenvolvimento de mutantes resistentes.

Os estudos de resistência ao oxathiapiprolin em *B. lactucae* ainda são poucos e necessários devido a característica de alta adaptabilidade desse patógeno. Olaya et al. (2019) determinaram a dose mínima de oxathiapiprolin necessária para controlar efetivamente *B. lactucae*. Os testes de sensibilidade foram conduzidos em plantas de alface com 3 a 4 semanas após a semeadura, pulverizadas com oxathiapiprolin. A dose mínima e máxima para provocar 50% de morte dos isolados de *B. lactucae* foi de 0,000115 e 0,003318 mg i.a. L<sup>-1</sup>, respectivamente. Apesar da dose utilizada neste trabalho ter sido muito mais alta que a dose determinada por esses autores, as condições avaliadas foram diferentes. Entretanto, avaliar doses menores para condições “in vitro” desse fungicida também é fundamental para o programa de monitoramento de resistência a fungicidas para *B. lactucae*.

Apesar de apresentarem alto risco de resistência aos fungicidas, não houve identificação de insensibilidade dos isolados de *B. lactucae* avaliados. Vários autores avaliaram a sensibilidade do míldio da alface a dimetomorfe,

mandipropamida e oxathiapiprolin e tiveram resultados similares aos obtidos neste trabalho (Wicks et al., 1994; Cohen et al., 2008; Rubin et al., 2010; Olaya et al., 2019). Entretanto, Wicks et al. (1994) advertem que se compostos como dimetomorfe forem usados amplamente são necessários monitoramentos frequentes para garantir que a redução na sensibilidade de *B. lactucae* em baixas proporções, desenvolva insensibilidade generalizada.

A ocorrência de insensibilidade a fungicidas, muitas vezes é causada por mutações ou outro mecanismo de variabilidade, que ocorrem devido ao aumento da pressão de seleção nos indivíduos de uma população (Ghini e Kimati, 2000). Rubin et al. (2011) induziram mutação em *B. lactucae* e conseguiram tornar isolados sensíveis em insensíveis a cinco fungicidas do grupo CAA, entre eles dimetomorfe e mandipropamida. Apesar de isolados terem se tornado resistentes, na avaliação de suas progênies, a sensibilidade tornou a ser observada, levando a conclusão que as mutações que causam resistência aos fungicidas desse grupo não são estáveis. Fungicidas desse grupo têm sido aplicados há muitos anos para controlar o míldio da alface, entretanto, ainda não foram detectados isolados de *B. lactucae* resistentes, como também observado neste trabalho.

A alta variabilidade em oomicetos tem sido observada por vários autores, assim como o desenvolvimento de isolados resistentes aos principais fungicidas utilizados após uso prolongado (Brown et al., 2004; Cohen et al., 2007; Jackson et al., 2012; Saville et al., 2015; Cohen et al., 2018). A maioria dos fungicidas utilizados mais recentemente, atuam em sítios específicos do patógeno e por isso, o risco do desenvolvimento de resistências aumenta (Gisi e Sierotzki, 2008). Assim, é essencial monitorar as populações desses patógenos.

Após isolados de *Phytophthora infestans* apresentarem insensibilidade ao metalaxil, sua sensibilidade tem sido monitorada e, até o momento não apresentou sensibilidade ao mandipropamida e oxathiapiprolin (Cohen et al., 2007; Saville et al., 2015; Cohen et al., 2018; Cohen, 2020). Cohen et al. (2007) ainda observaram que o risco de desenvolvimento de resistência desse patógeno a fungicidas do grupo CAA no campo é baixa, principalmente por terem sido utilizados por tanto tempo e não terem apresentado resistência. Além disso, mutações que venham a ocorrer gerando resistência ao mandipropamida não são prontamente estabilizadas (Cohen et al., 2007; Rubin et al., 2011).

Populações de *Pseudoperonospora cubensis*, *Peronospora belbahrii*, *Phytophthora capsici*, *P. nicotinae* e *P. parasitica* também têm sido monitoradas quanto a sensibilidade de dimetomorfe, mandipropamida e/ou oxathiapiprolin e também não apresentaram resistência (Jackson et al., 2012; Wang et al., 2013; Qu et al., 2016). No entanto, esses mesmos autores advertem que monitoramentos devem ser constantes e ainda determinam padrões para essas avaliações.

Apesar dos isolados de *B. lactucae* não terem manifestado insensibilidade nesse trabalho, há que se monitorar continuamente sua sensibilidade a dimetomorfe, mandipropamida e oxathiapiprolin, uma vez que são fungicidas que atuam em sítios específicos, com alto risco de adquirirem resistência, podendo tornar ineficiente o controle de míldio da alface.

## 5 CONCLUSÕES

- A dose de 10 mg L<sup>-1</sup> de dimetomorfe, mandipropamida e oxathiapiprolin pulverizada diretamente nas folhas foi suficiente para evitar o processo de infecção de *B. lactucae*;
- A dose de 50 mg L<sup>-1</sup> de dimetomorfe, mandipropamida e oxathiapiprolin aplicada nas raízes não impediu a infecção de *Bremia lactucae*;
- Não foi constatada insensibilidade dos isolados de *B. lactucae* aos fungicidas dimetomorfe, mandipropamida e oxathiapiprolin;
- Aplicar os fungicidas diretamente nas folhas é mais confiável para avaliar a sensibilidade de *B. lactucae* a fungicidas.

## 6 REFERÊNCIAS

Agrianual 2020: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2020. p. 110-112.

Crute IR, Dixon GR (1981) Downy mildew diseases caused by the genus *Bremia* Regel. In: Spencer DM (Eds.) **Downy Mildews**. London: Academic Press, p. 423-455.

Gisi U, Sierotzki H (2008) Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology** 122:157–167.

Crute IR (1992) The role of resistance breeding in the integrated control of downy mildew (*Bremia lactucae*) in protected lettuce. **Euphytica** 63:95102.

Schettini TM, Legg EJ, Michelmore RW (1991) Insensitivity to metalaxyl in California populations of *Bremia lactucae* and resistance of California lettuce cultivars to downy mildew. **Phytopathology** 81:64-70.

Cohen Y (2008) Activity of carboxylic acid amide (CAA) fungicides against *Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology* 122:169-183.

Harp T, Cloud G, Minton B, Cochran A. (2006). Mandipropamid: A new fungicide for control of late blight and downy mildews. **Phytopathology** 96:185.

Huggenberger F, Kuhn PJ (2006). Biological and physicochemical properties of mandipropamid, a new fungicide for the control of oomycete pathogens. **Phytopathology** 96:S51.

Huggenberger F, Lamberth C, Iwanzik W (2005) Mandipropamid a new fungicide against Oomycete pathogens. Proceedings of the BCPC International Congress Crop Science & Technology, Glasgow, UK, 1, 93–98.

Wang H, Shuangjian Y, Maosheng W, Xia H, Wenhong L, Zhang H, Cao Yi, Lu N, Shang S, Shi J (2013) Sensitivity of *Phytophthora parasitica* to mandipropamid: In vitro determination of baseline sensitivity and in vivo fungitoxicity. **Crop Protection** 43: 251-255.

Blum M, Boehler M, Randall E, Young V, Csukai, Kraus S, Moulin F, Scalliet G, Avrova AO, Whisson SC, Fonne-Pfister R (2010) Mandipropamid targets the cellulose synthase-like PiCesA3 to inhibit cell wall biosynthesis in the oomycete plant pathogen, *Phytophthora infestans*. **Mol Plant Pathol** 11:227-243.

Hewitt EJ (1952) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Techn Commun* 22, Commonwealth Bureau Horticulture Plantation Crops, East Malling, Maidstone, Kent

Osara K, Crute IR (1981) Variation for specific virulence in the Finnish *Bremia lactucae* populations. **Annales Agriculture Fenniae** 20:198-209.

Cohen Y (2020) Root treatment with oxathiapiprolin, benthiavalicarb or their mixture provides prolonged systemic protection against oomycete foliar pathogens. **PLoS One** 15 (1): e0227556. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0227556>.

Olaya G, Linley R, Edlebeck K, Humann R, Rapicavoli J (2019) Baseline sensitivity distribution of *Bremia lactucae* isolates to the fungicide oxathiapiprolin. In: **Annual Meeting da American Phytopathological Society**. Resumo... Cleveland, Ohio, EUA. Disponível em: <https://apsnet.confex.com/apsnet/2019/meetingapp.cgi/Paper/14647>.

Wicks TG, Hall B, Pezzaniti P (1994) Fungicidal control of metalaxyl-insensitive strains of *Bremia lactucae* on lettuce. **Crop Protection** 13:617-623.

Cohen Y (2015) The Novel Oomycide Oxathiapiprolin Inhibits All Stages in the Asexual Life Cycle of *Pseudoperonospora cubensis* - Causal Agent of Cucurbit



Downy Mildew. **PLoS One** 10 (10) e0140015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4599937/>>.

Cohen Y (2018) Oxathiapiprolin-based fungicides provide enhanced control of tomato late blight induced by mefenoxam-insensitive *Phytophthora infestans*. **PLoS One** 13(9): e0204523. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6160094/>>.

Qu T, Shao Y, Csinos AS, Ji P (2016) Sensitivity of *Phytophthora nicotianae* from tobacco to fluopicolide, mandipropamid, and oxathiapiprolin. **Plant Disease** 10:2129-2125.

Ghini R, Kimati H (2000) **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa – Meio Ambiente. 78p.

Cohen Y, Rubin E, Hadad T, Gotlieb D, Sierotzki, Gisi U (2007) Sensitivity of *Phytophthora infestans* to mandipropamid and the effect of enforced selection pressure in the field. **Plant Pathology** 56:836-842

Rubin AR, Werdiger AC, Blum M, Gisi U, Sierotzki H, Hermann D, Cohen Y (2011) EMS and UV irradiation induce unstable resistance against CAA fungicides in *Bremia lactucae*. **European Journal Plant Pathology** 129:339-351.

Ji P, Csinos AS, Hickman LL, Hargett U (2014) Efficacy and application methods of oxathiapiprolin for management of black shank on tobacco. **Plant Disease** 98:1551-1554.

Gray MA, Hao W, Forster H, Adaskaveg JE (2018) Baseline sensitivities of new fungicides and their toxicity to selected life stages of *Phytophthora* species from citrus in California. **Plant Disease** 102:734-742.

Saville A, Graham K, Grunwald NJ, Myers K, Fry WE, Ristaino JB (2015) Fungicide sensitivity of U.S. genotypes of *Phytophthora infestans* to six oomycete-targeted compounds. **Plant Disease** 99:659-666.

Jackson KL, Yin J, Ji P (2012) Sensitivity of *Phytophthora capsici* on vegetable crops in Georgia to mandipropamid, dimethomorph, and cyazofamid. **Plant Disease** 96:1337-1342.

Brown S, Koike ST, Ochoa OE, Laemmlen F, Michelmore RW (2004) Insensitivity to the fungicide fosetyl-aluminum in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. **Plant Disease** 88:502-508.