

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE MÍLDIO NA CULTURA DA
ALFACE NA REGIÃO SUL E SUDESTE DO BRASIL

LAILA FELICIANO DA SILVA

Orientadora: Prof. Dra. Rita de Cássia Panizzi

Coorientadores: Prof. Dr. Pablo Forlan Vargas e Ma. Izabella Garbeline Okuma

Jaboticabal - SP

1º Semestre/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE MÍLDIO NA CULTURA DA
ALFACE NA REGIÃO SUL E SUDESTE DO BRASIL

LAILA FELICIANO DA SILVA

Orientadora: Prof. Dra. Rita de Cássia Panizzi

Coorientadores: Prof. Dr. Pablo Forlan Vargas e Ma. Izabella Garbeline Okuma

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para graduação em ENGENHARIA AGRÔNOMICA.

Jaboticabal - SP

1º Semestre/2023

S586i

Silva, Laila Feliciano da

Identificação de Raças de Míldio na Cultura da Alface na Região Sul e Sudeste Do Brasil / Laila Feliciano da Silva. -- Jaboticabal, 2023
34 p. : tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Rita de Cássia Panizzi

Coorientadora: Izabella Garbeline Okuma

1. *Bremia lactucae*. 2. *Lactuca sativa*. 3. Resistência. 4. Cultivares.
5. Genótipos. 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL



DEPARTAMENTO: Ciências da Produção Agrícola

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO **TRABALHO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

TÍTULO: Identificação de raças de Míldio da alface na região Sul e Sudeste do Brasil

ACADÊMICO: Laila Feliciano da Silva

CURSO: Engenharia agrônômica

ORIENTADORA: Prof. Dra. Rita de Cássia Panizzi

COORIENTADORES: Prof. Dr. Pablo Forlan Vargas e Ma. Izabella Garbeline Okuma

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

(Nomes)

Presidente: Prof. Dra. Rita de Cássia Panizzi

Membro: Ma. Vanessa Maria Dantas Pedrosa

Membro: Ma. Laura Matos Ribera

(Assinaturas)





Jaboticabal 16 / 01 / 2023

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 26/10/2023



Chefe do Departamento
Prof. Dr. Leonardo Bianco de Carvalho
Chefe do Depto. de Ciências da Produção Agrícola
FCAV/UNESP

“Sempre em frente!”

(Legião Urbana)

Ao meu pai Edvaldo Santana da Silva,
À minha mãe Leonice Aparecida Feliciano da Silva.

DEDICO

Ao meu irmão Thiago Feliciano da Silva.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Edvaldo Santana da Silva e Leonice Aparecida Feliciano da Silva, pelo incentivo, apoio e amor, vocês são essenciais na minha vida.

Ao meu irmão Thiago Feliciano da Silva, pela inspiração, incentivo e companheirismo, para sempre será meu melhor amigo e companhia.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Panizzi, pela disponibilidade e apoio.

Ao meu coorientador Prof^o. Dr^o. Pablo Forlan Vargas, pelas orientações, apoio e receptividade.

À minha coorientadora MSc. Izabella Garbeline Okuma, pelas orientações, amizade, apoio e dedicação, um exemplo de ética e conduta profissional.

A todos companheiros do Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento (NEOM), que de alguma forma me auxiliaram no desenvolvimento desse projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) durante a execução do meu projeto.

À minha República Sófadinhas, pela amizade, momentos vividos e por serem minha família em Jaboticabal.

Aos meus colegas de turma, amigos, familiares, e todos que contribuíram direta ou indiretamente com meu Trabalho de Iniciação Científica.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Coleta dos isolados.....	19
3.2 Multiplicação dos isolados	21
3.3 Diferenciação dos fenótipos de virulência e obtenção dos códigos sextetos	22
3.4 Determinação da frequência, diversidade e complexidade.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS.....	32

IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE MÍLDIO NA CULTURA DA ALFACE NA REGIÃO SUL E SUDESTE DO BRASIL

RESUMO - O míldio, *Bremia lactucae* Regel, é uma das principais doenças que afeta a cultura da alface mundialmente, principalmente em regiões com condições de alta umidade e baixa temperatura. O fato do aparecimento de novas raças do míldio tem sido motivo de estudo para programas de melhoramento, dos quais, buscam detectar novos genes de resistência. Para isso, faz-se necessário um constante monitoramento para que se possa avaliar a disseminação desse patógeno bem como o desenvolvimento de cultivares resistentes a partir de genótipos que possuem gene ou fatores de resistência. Assim, objetivou-se identificar raças de Míldio da alface na região Sul e Sudeste do Brasil durante o ano de 2021. As amostras de folhas com sintomas de *B. lactucae* foram coletados em áreas produtoras de alface e posteriormente multiplicadas em genótipo suscetível para início à fase de diferenciação. Os genótipos diferenciadores foram avaliados, atribuindo os seguintes sinais para interpretação dos resultados +, (+), - e (-), conforme a porcentagem de níveis de danos presentes nos genótipos de alface. As cultivares diferenciadoras 'RyZ2164', 'Balesta', 'Bartoli' e 'Kibrille', devem ser utilizadas em programas de melhoramento da cultura da alface visando introgressão de genes que confirmam resistência ao Míldio.

Palavras-chave: *Bremia lactucae*; *Lactuca sativa*; resistência; cultivares.

IDENTIFICATION OF MILDUM IN THE CULTURE LETTUCE BREEDS IN THE SOUTHERN AND SOUTHEAST OF BRAZIL

ABSTRACT - Downy mildew, *Bremia lactucae* Regel, is one of the main diseases that affect lettuce, mainly in conditions of high humidity and low temperature. The emergence of new races has been a subject of study for breeding programs to detect new resistance genes. For this, constant monitoring is necessary to evaluate the spread of the pathogen as well as the development of resistant cultivars from genotypes that have genes or resistance factors. Thus, the objective was to identify races of Lettuce Mildew in the South and Southeast region of Brazil during the year 2021. Leaf samples with symptoms of *B. lactucae* were collected in lettuce producing areas and subsequently multiplied into a susceptible genotype to initiate the differentiation phase. The differentiating genotypes were evaluated, assigning the following signs for interpretation of the results +, (+), - and (-), according to the percentage of damage levels present in the lettuce genotypes. The differentiating cultivars 'RyZ2164', 'Balesta', 'Bartoli' and 'Kibrille' should be used in improvement programs for lettuce, aiming at crossings that confer resistance to downy mildew.

Keywords: *Bremia lactucae*; *Lactuca sativa*; resistance; cultivars.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) representa 49,9% da área total cultivada com folhosas no Brasil, ocupando o primeiro lugar em relação as hortaliças folhosas no cenário nacional dentro da olericultura brasileira, sendo esta, a mais consumida pela população brasileira (Pessoa e Junior, 2021).

Segundo a pesquisa realizada pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), nos Centros Estaduais de Abastecimento (CEASA) dos principais municípios do Brasil e suas respectivas microrregiões, a quantidade ofertada de alface em quilograma foi superior a 5,8 milhões somente no mês de janeiro de 2022 (CONAB, 2022).

Os principais estados produtores da alface estão localizados na região sul e sudeste do Brasil, No Brasil a produção chega a 350 mil toneladas anuais sendo a principal região plantada na região sul e sudeste do Brasil (CARVALHO, 2017). Nesse contexto, o estado de São Paulo é o maior produtor e o maior produtor de alface do Brasil cerca de 137 mil toneladas em 8 mil hectares plantados, seguidos de Paraná com 54 mil toneladas em 2.845 ha e Minas Gerais com 18 mil toneladas em 1.192 hectares (MAKISHIMA E MELO, 2005).

Dessa forma, cada vez mais tem-se buscado tecnologias que visam acréscimo de produtividade no cultivo de alface, que proporcionem vantagens para pequenos e grandes produtores. Entretanto, é válido ressaltar que o plantio da alface está sujeito ao ataque de inúmeras doenças fúngicas que possuem alto potencial destrutivo e podem comprometer seriamente a produtividade e a qualidade quando não controladas de forma adequada (TOFOLI E DOMINGUES, 2017).

Nesse contexto, uma das principais doenças que ocorre na alfacicultura mundial, é o míldio da alface, cujo agente causal é o oomiceto, *Bremia lactucae* Regel (IPM, 2001; Lebeda et al., 2002; Michelmores e Wong, 2014). Trata-se de um patógeno que se manifesta através de manchas foliares verde-claras ou amarelas, úmidas, angulares e de tamanho variável. Ao evoluírem se tornam necróticas, pardas e apresentam um crescimento branco na face inferior das lesões, constituído por esporângios e esporangióforos do agente causal. Em períodos favoráveis a doença pode causar intensa desfolha, comprometendo a produtividade e qualidade da produção (Revista Cultivar, 2020).

A utilização de cultivares resistentes é uma 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). Entretanto, a falta de informação sobre cultivares resistentes aos diferentes comportamentos (raças) de míldio encontrados nas regiões produtoras, ainda dificulta o seu uso.

Para isso, se faz necessário o entendimento da dinâmica populacional do míldio nas regiões produtoras, visto que a cada ano o patógeno apresenta novas adaptações ao hospedeiro e ao ambiente em que está inserido (VAN HESE et al., 2016). Portanto, é necessário avaliar periodicamente as populações de *B. lactucae* com o objetivo de identificar raças de míldio da alface (*Bremia lactucae*), nas principais áreas produtoras de alface da Região Sul e Sudeste do Brasil e assim, para recomendar os genes eficazes para o melhoramento genético da cultura da alface visando resistência às diferentes raças do patógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com FILGUEIRA (2013), a alface é uma planta do tipo herbácea, possuindo um caule diminuto que é responsável por prender as folhas em sua estrutura. As folhas são amplas e se desenvolvem entorno do caule, com algumas cultivares possuem folhas com texturas lisas ou crespas, podendo formar ou não um certo tipo de “cabeça”. A cultura poderá possuir vários tons de coloração, desde verde até roxa, isso vai depender do cultivar, além disso, é a hortaliça folhosa mais apreciada mundialmente, podendo ser consumida in natura ou em saladas (SALA E COSTA, 2012).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma espécie da família Asteraceae originária de regiões do Mediterrâneo, sendo atualmente a hortaliça folhosa mais consumida e economicamente importante em todo o mundo (PAIM et al., 2020). A cultura além de apresentar altos índices de brilho foliar, aroma, textura e sabor, caracterizando boas propriedades organolépticas, apresenta também qualidade nutricional, tais como, baixo valor calórico e elevada quantidade de fibras, minerais (cálcio, ferro, fósforo, magnésio, potássio, sódio e zinco) e vitaminas (vitamina C, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, vitamina A, vitamina E, vitamina K e ácido fólico) (USDA, 2018).

Segundo a Tabela Brasileira de Composição e Alimentos (TBCA, 2021), em 100g de folha crua existem 96,4g de umidade, 8,0kcal, 1,76g de carboidratos, 1,01 g de proteínas, 1,87 g de fibras, e 37,5, 0,75, 26,0 e 311,0 mg de cálcio, ferro, fósforo e potássio, respectivamente, além das vitaminas A (364µg) e C (18,5 µg), importantes na dieta alimentar.

No Brasil, existem aproximadamente 108,4 mil estabelecimentos que cultivam alface, com produção de 671,5 mil toneladas anualmente, em que 82,2% são classificados como agricultores familiares, onde, 80,3% da produção nacional se concentram na Região Sul e Sudeste do Brasil. (IBGE, 2020). As cultivares mais presentes em território nacional são agrupadas em crespas, lisas ou frisadas, sub agrupadas em repolhuda crespa ou americana, repolhuda lisa, solta crespa, solta lisa e tipo romana, com coloração das folhas que variam do verde, vermelho ao roxo, sendo, as cultivares, o sistema de produção e o manejo variados de acordo com a região e com o nível tecnológico da propriedade, podendo-se adotar os sistemas convencional, orgânico ou agroecológico de produção, em cultivos protegidos (túneis cobertos com malhas, telados, estufas) ou aqueles em nível de campo. (HENZ E SUINAGA, 2009).

O estado de São Paulo possui a maior área de produção de alface no Brasil com 12,35 mil hectares, o que representa 31% da produção nacional, com um total comercializado de 52.080 toneladas entre janeiro e dezembro de 2018 (AGRIANUAL, 2020; IEA, 2020). Em São Paulo, as maiores regiões produtoras estão localizadas no Cinturão Verde, cujos municípios de Sorocaba, São Paulo e Mogi das Cruzes foram responsáveis por 85% do montante de alface em 2019 (IEA, 2020). Assim, além do valor econômico e alimentar, o cultivo de alface

também tem grande importância social, na geração de empregos diretos e indiretos, pois demanda grande quantidade de mão-de-obra, desde o cultivo até a comercialização.

Sofrendo bastante influência das condições ambientais (AIRES, 2019), a cultura da alface se adapta melhor em condições de temperaturas amenas, sendo que o ideal ao seu crescimento e desenvolvimento está entre 15,5 e 18,3 °C, embora possa tolerar, por alguns dias, temperaturas entre 26,6 e 29,4 °C, desde que as temperaturas durante à noite sejam baixas (FILGUEIRA, 2013).

Segundo Lopes et al. (2010) as doenças da parte aérea que mais afetam a alface durante o ciclo produtivo são: Míldio (*Bremia lactucae* Regel); Mancha bacteriana [*Xanthomonas campestris* pv. *Vitians* (Brown) Dye]; Septoriose (*Septoria lactucae* Passerini); Mancha de cercóspora [*Cercospora longissima* (Cugini.) Sacc.]; Podridão de botrytis (*Botrytis cinerea* Pers); Rizoctoniose (*Rhizoctonia solani* Kuhn); Mosaico (*Lettuce mosaic virus*-LMV); Vira-cabeça [várias espécies: (*Tomato spotted wilt virus* –TSWV), (*Tomato chlorotic spot virus* – TCSV) e (*Groundnut ringspot virus* – GRSV)]; Mosqueado (*Lettuce mottle virus* – LMoV); Engrossamento-das-nervuras [(*Big-vein-Lettuce big vein virus* – LBVV) e (*Mirafiori lettuce big-vein virus* – MLBVV)]; Lettuce Dieback [*Tomato bushy stunt virus* – TBSV e *Lettuce necrotic stunt virus* – LNSV] e outras viroses [(*Cucumber mosaic virus* – CMV) e (*Turnip mosaic virus* – TuMv)], onde, o Míldio, (*Bremia lactucae* Regel), é a principal doença que acomete a cultura da alface, coincidindo com a principal época de cultivo.

As condições climáticas durante o período do inverno brasileiro, favorecem o desenvolvimento do patógeno *Bremia lactucae* Regel durante o cultivo de alface, acarretando grandes perdas econômicas e produtivas ao alfacicultor. A maior incidência de míldio ocorre em regiões de temperatura amena, que corresponde com as principais regiões produtoras de alface (SOUZA, 2009). A esporulação de *B. lactucae*, é bastante influenciada por fatores abióticos, como a umidade relativa do ar e temperatura, sendo um mínimo requerido de 80% e variação de 4°C à 20°C, respectivamente (CAPRIO, 2021).

Este patógeno tem a capacidade de infectar a planta desde a produção de mudas até a colheita, danificando os tecidos foliares, o que compromete a taxa fotossintética da planta (SOUZA, 2021). Suas lesões têm colorações cloróticas características, passando para amarela ou necrótica após a esporulação do patógeno (VAN BRUGGEN et. al, 1997). Sob condições ambientais ótimas, os esporângios ficam visíveis após uma semana, principalmente na face abaxial das folhas.

Os esporângios podem ser transportados pelo ar ou pela água, advindos de outras plantas de alface doentes ou hospedeiros alternativos do gênero *Lactuca*, como a Serralha, ademais de restos de cultura infectados (CARVALHO, 2021).

Os sintomas e sinais característicos da doença são manchas cloróticas na face adaxial, tornando-se necróticas com o desenvolvimento do patógeno, enquanto na face abaxial, simultaneamente, tem-se eflorescências

esbranquiçadas pulverulentas do oomiceto. Contando com temperatura, umidade relativa do ar, velocidade do vento, radiação solar e duração do molhamento foliar, para induzir a esporulação e sobrevivência do fungo (MARIN, 2018). Com a ampla variabilidade genética de Míldio, é imprescindível a identificação e monitoramento anual dos comportamentos nas principais regiões produtoras da alface para que os programas de melhoramento possam desenvolver linhagens com genes de resistência mais eficazes no manejo da doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos isolados

O monitoramento das raças de Míldio nas principais áreas produtoras de alface dos estados da região Sul e Sudestes do Brasil consistiu na coleta de folhas de alface contendo sintomas e esporulações do patógeno em diferentes municípios dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, no inverno de 2021. Essas localidades foram selecionadas considerando a distribuição da produção em cada estado e a importância econômica da região. Para tanto, como nos anos anteriores, a etapa de coleta conta com a colaboração de empresas de melhoramento de hortaliças e que comercializam sementes de alface, as quais possuem representantes nas diversas áreas de produção.

As amostras foram embaladas individualmente em potes coletores identificados e acondicionados em caixa térmica com gelo para o transporte até

o Laboratório de Genética e Melhoramento de Olerícolas, do Departamento de Ciências de Produção Agrícola (UNESP-FCAV), onde ficaram armazenadas em freezer a -20°C.

Ao término das coletas, procedeu-se a partir das amostras armazenadas do material vegetal (tecido foliar com a doença míldio da alface), o processamento para isolamento do patógeno, do qual derivou-se de cada amostra um único isolado de *B. lactucae* nomeado de acordo com o estado, a ordem e o ano de coleta, respectivamente (por exemplo, RJ01/20), para determinação dos fenótipos de virulência pelo teste de diferenciação.

Dessa forma, foram diferenciados 15 isolados de *B. lactucae* coletados nos estados do Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR) (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos isolados de folhas de alface coletadas em 2021 para identificação dos fenótipos de *Bremia lactucae* no Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.

Isolados	Local	Grupo de Alface	Cultivar
RJ70/21	Sumidouro	Crespa	Samira
RJ96/21	Nova Friburgo	Americana	Romana offtype de AA0065
RJ101/21	Nova Friburgo	Americana	Ironwood
SP462/21	Jaboticabal	Crespa	-
SP07/21	Piedade	Crespa Roxa	-
SP308/21	Campinas	Lisa	-
RS159/21	Feliz	Lisa	TPX 29423
RS170/21	Maquiné	Americana	Raider Plus
RS184/21	Maquiné	Crespa verde	Thaís
SC193/21	Antônio Carlos	Lisa	TPX 29423
SC202/21	Antônio Carlos	Americana	Lucy Brown
SC203/21	Antônio Carlos	Crespa verde	Valentina
PR36/21	São José dos Pinhais	Americana	AA0067
PR56/21	São José dos Pinhais	Americana	Piedade
PR62/21	São José dos Pinhais	Crespa Roxa	-

3.2 Multiplicação dos isolados

Com o intuito de se obter quantidades suficientes de esporângios para utilização no teste de diferenciação, realizou-se a inoculação dos esporângios, coletados nos distintos municípios dos estados produtores, em plântulas de alface da cultivar Solaris (suscetível).

A cultivar Solaris foi semeada em caixas plásticas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), forradas com papel germitest umedecido, onde as sementes foram divididas em três partes iguais e em cada uma das partes foram semeadas aproximadamente 20 sementes e tiveram suas tampas fechadas. Posteriormente, as caixas gerbox foram incubadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro a 18°C, irrigadas quando necessário com água deionizada e autoclavada, por uma semana. Após este período, todos os cotilédones estavam totalmente expandidos, e então, aptos à inoculação dos isolados.

As amostras vegetais com os isolados de *B. lactucae* foram lavadas e agitadas, obtendo-se uma suspensão de esporângios. A partir disso, procedeu-se a inoculação da suspensão nos cotilédones totalmente desenvolvidos de alface com pipetas do tipo Pasteur até o ponto de escoamento (ILOTT et al., 1987).

As caixas plásticas gerbox então foram incubadas em B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com fotoperíodo de 12h/12h a 13°C por 15 dias. Este processo foi repetido por quatro ciclos consecutivos para multiplicar a

quantidade de esporângios. Obtendo-se quantidades suficientes de esporângios, foi realizado o teste de diferenciação.

3.3 Diferenciação dos fenótipos de virulência e obtenção dos códigos sextetos

Para as cultivares diferenciadoras foi empregada a mesma metodologia descrita anteriormente (item 3.2), com as modificações em semeio de cultivares diferenciadoras do código “sextet” conjunto EU-C (Quadro 1). Sementes das cultivares diferenciadoras de alface foram semeadas separadamente em caixas plásticas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm), forradas com papel germitest umedecido, dividido em seis partes iguais. Em cada uma das partes foram semeadas 20 sementes de cada cultivar diferenciadora, sendo estas: Green Tower, Dandie, R4T57D, UC DM14, Nun DM15, CG DM16, Colorado, FrRsal-1, Argeles, RYZ2164, RYZ910457, Bedford, Balesta, Bartoli, Design e Kibrille.

Estas foram mantidas por 10 dias em câmara de crescimento na temperatura de 18°C e fotoperíodo de 12h/12h. Transcorrido esse período foi realizada a inoculação com os isolados coletados, de acordo com a técnica de Illott et al. (1987), utilizando-se de esporângios lavados de tecidos infectados do hospedeiro e agitados em água destilada. A suspensão foi ajustada para a concentração de 5×10^4 esporângios mL⁻¹, em Câmara de Neubauer, e aplicada nas plântulas das diferenciadoras com pipetas do tipo Pasteur até o ponto de escorrimento.

Quadro 1. Cultivares diferenciadoras do conjunto EU-C estabelecidas pelo IBEB.

	Grupo A						Grupo B						Grupo C					
	Green Tower	Dandie	R4T57D	UC DM 14	Nun DM 15	CG DM 16	Colorado	FrRsal-1	Ninja	Discovery	Argeles	RYZ2164	RYZ 910457	Bedford	Balesta	Bartoli	Design	Kibrille
Dm ou R*	0	3	4	14	15	16	18	??	36	37	38	??	??	??	??	??	??	??
EU-C	0	1	2	4	8	16	32	1			2	4	8	16	32	1	2	4

*Dm ou R: Gene de resistência à *Bremia lactucae*. (??): Gene ainda não identificado.

Após a inoculação, as caixas foram colocadas em câmara de incubação tipo B.O.D com temperatura de 13°C, sendo que durante as seis primeiras horas, foram deixadas em câmara escura e, após esse tempo, o fotoperíodo foi ajustado para 12 horas.

As avaliações foram realizadas aos 10 dias após a inoculação e repetiu-se a avaliação aos 15 dias após a inoculação para confirmar os dados da primeira avaliação, conforme metodologia proposta por VAN ETTEKOVEN E VAN DER AREND (1999). Tal metodologia baseia-se na colocação de sinais +, (+), - ou (-), de acordo com a porcentagem de níveis de danos nos tecidos vegetais de alface, sendo: +, quando mais de 80% das plântulas apresentam lesões esporulantes; (+), quando mais de 80% das plântulas apresentam pontos necróticos e com muitas lesões esporulantes; -, quando menos de 5% das plântulas apresentam lesões esporulantes; e (-), quando as plântulas apresentam pontos necróticos e com poucas lesões esporulantes (Quadro 2).

A determinação dos fenótipos de virulência presentes nas populações dos estados avaliados foram obtidos através das respostas de suscetibilidade no conjunto diferencial EU-C. Os materiais que se mostraram suscetíveis a

determinado isolado tiveram seus valores somados dentro de cada grupo e obteve-se o código sexteto (por exemplo, 31/00/02).

Quadro 2. Exemplo da identificação do fenótipo de virulência (raça) de *Bremia lactucae* conforme metodologia van Ettehoven & van der Arend (1999).

	Grupo A						Grupo B						Grupo C						Código Sextet
	Green Tower	Dandie	R4T57D	UC DM 14	Nun DM 15	CG DM 16	Colorado	FrRsal-1	Ninja	Discovery	Argeles	RYZ2164	RYZ 910457	Bedford	Balesta	Bartoli	Design	Kibrille	
Dm ou R	0	3	4	14	15	16	18		36	37	38								
EU-C	0	1	2	4	8	16	32	1			2	4	8	16	32	1	2	4	
Isolado																			
X/21	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	(-)	(-)	-	+	+	-	31/00/03

*Dm ou R: Gene de resistência à *Bremia lactucae*.

3.4 Determinação da frequência, diversidade e complexidade

A determinação da frequência, diversidade e complexidade foi realizada com base nos autores Andrivon (1994) e van Hese et al (2016).

Estimou-se a frequência relativa (fr) dos fatores de virulência identificados nos isolados amostrados, $fr = \sum fv/N$, em que: fv são os fatores de virulência, e N é o número total de fatores de virulência observados.

A diversidade da população foi obtida por meio do índice de Gleason (Ig), que reflete quão diversa é a população avaliada, $Ig = (Nf - 1)/\ln(Ni)$ em que: Ni é o número de isolados avaliados e Nf é o número de fenótipos de virulência identificados.

A complexidade de virulência por isolado (Ci) e por fenótipo de virulência (Cf) foram calculadas. $Ci = \sum j(pj.vj)$ e $Cf = (\sum jvj)/Nf$, em que: j = é uma

constante podendo variar de 1 até N_f ; p_j = é a frequência do fenótipo de virulência j , e v_j = é o número de fator de virulência do fenótipo j .

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).

Com base na codificação encontrada, verificou-se se o código já foi identificado no Brasil e/ou no exterior, tendo como referência a literatura disponível. Se o código fosse inédito, caracterizaria-se a possibilidade de uma nova raça caso a mesma tenha se repetido em anos anteriores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível determinar 11 fenótipos de virulência dentre todos os estados amostrados, a partir de 15 isolados (Tabela 2).

Tabela 2. Resposta de resistência/suscetibilidade à *Bremia lactucae* e códigos sextetos identificados no Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná em 2021.

	Grupo A						Grupo B						Grupo C						Código Sextet
	Green Tower	Dandie	R4T57D	UC DM 14	Nun DM 15	CG DM 16	Colorado	FrRsal-1	Ninja	Discovery	Argeles	RYZ2164	RYZ 910457	Bedford	Balesta	Bartoli	Design	Kibrille	
Dm ou R	0	3	4	14	15	16	18		36	37	38								
EU-C	0	1	2	4	8	16	32	1			2	4	8	16	32	1	2	4	
Isolado																			
SP07	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SP462	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
SP308	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RJ70	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RJ96	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RJ101	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	(+)	-	
SC193	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	(+)	-	-	-	-	-	+	-	
SC202	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SC203	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
RS159	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	
RS170	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RS184	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PR36	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
PR56	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PR62	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	

Os fenótipos de virulência do código sexteto 31/00/00, encontrado em São Paulo e no Rio de Janeiro, 32/00/00, encontrado no Rio Grande do Sul e Paraná, e 51/00/00, encontrado no Rio de Janeiro, Santa Catarina e no Paraná, foram os isolados mais frequentes durante a avaliação, tendo uma frequência de 13,33%, 13,33% e 20%, respectivamente.

Os demais isolados apresentaram frequência de 6,67%, mostrando o quão diversificada está a população de isolados de míldio avaliada neste ano, comparada ao monitoramento realizado em 2019 por CARVALHO (2021), onde a maior frequência no nível de diversidade observado foi de 6,69% (CARVALHO, 2021).

Em relação a agressividade, estabelecida pela quantidade de fatores de virulência presentes [atribuição dos sinais + e (+)], os fenótipos de virulência dos sextetos 63/08/02 (RJ101/21) e 31/09/00 (PR62/21) foram os mais agressivos, com 8 fatores de virulência.

Enquanto, o comportamento 32/00/00 (RS170/21 e PR56/21) foi o menos agressivo, com apenas um fator de virulência.

O míldio da alface vem sendo monitorado no Rio Grande do Sul e no Paraná desde 2015 e 2016, respectivamente (FRANCO, 2020). Já no Rio de Janeiro e Santa Catarina, o monitoramento teve início em 2019, e em São Paulo, desde 2003 (PANIZZI et. al., 2012).

O monitoramento do míldio era baseado no conjunto EU-A e EU-B, até os anos de 2013 e 2015 respectivamente. A partir de 2016 foi estabelecido o conjunto EU-C, conceituando os fatores de virulência que foram mais proeminentes ao decorrer dos monitoramentos realizados ao longo dos anos,

conforme surgimento nas populações do patógeno. A partir de 2014, teve-se a avaliação da reação as cultivares RYZ2164, RYZ910457, Bedford e Balesta. Já as cultivares FRsal-1, Bartoli e Kibrille, só foram inseridas ao conjunto de diferenciadoras a partir de 2016 (Isf, 2021).

Nas populações avaliadas de cada estado, encontrou-se os seguintes fatores de virulência: v3, v4, v14, v15, v16, v18, vFRsal-1, v38, vRYZ910457, vBedford e vDesing (Figura 1).

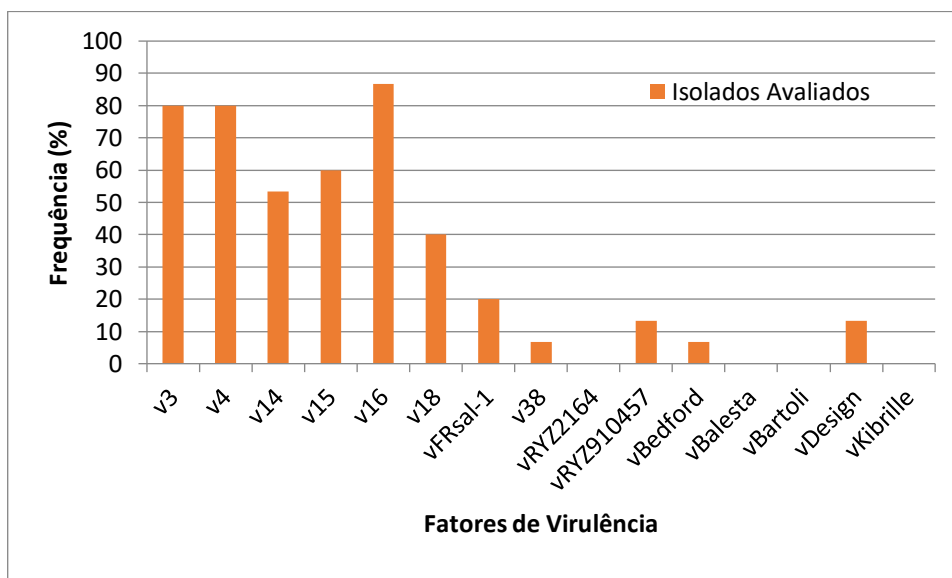


Figura 1. Frequência dos fatores de virulência observados nas populações de *Bremia lactucae* nos estados do Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo.

Os genes de virulência que ocorreram em menor frequência foram vFRsal-1, v38, vRYZ910457 e vDesign. Os genes vRyZ2164, vBalesta, vBartoli, vKibrille e vBedford, não ocorreram em nenhum dos estados estudados. Os fatores de virulência que apresentaram maior variação entre os isolados avaliados foram v3, v4, v14, v15, v16 e v18.

O Índice de Gleason (Ig) representa o nível de diversidade nos isolados amostrados dentro da população estudada, ressaltando que todos os estados

apresentaram mesmo Ig devido a mesma quantidade de isolados avaliados (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização da diversidade e complexidade dos fenótipos de virulência de *Bremia lactucae*, obtidos nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e do total de isolados amostrados em 2021.

Estados	Ni	Nf	Ig	Ci	Cf
Rio de Janeiro	3	3	1,82	5,66	5,67
São Paulo	3	3	1,82	4,32	4,33
Rio Grande do Sul	3	3	1,82	3,33	3,33
Santa Catarina	3	3	1,82	5,66	5,67
Paraná	3	3	1,82	4,32	4,33
Total Amostrado	15	11*	9,10	23,31	23,34

Número de isolados identificados (Ni), número de fenótipos de virulência identificados (Nf), índice de Gleason (Ig), Complexidade de virulência por isolado (Ci) e complexidade de virulência por fenótipo (Cf).

* Têm-se 11 fenótipos de virulência devido a compatibilidade de fenótipos entre os estados avaliados.

A complexidade de virulência por isolado (Ci) e a complexidade de virulência por fenótipo (Cf) foram maiores em Santa Catarina e São Paulo. A similaridade dos resultados de Ci e Cf, indicam que cada fenótipo ocorreu na mesma frequência, como pode ser visto entre todos os estados avaliados.

Quando a complexidade de virulência por fenótipo (Cf) é maior do que por isolado (Ci), tendem a predominar fenótipos de virulência simples (ANDRIVON, 1994; LEBEDA E ZINKERNAGEL, 2003), como foi observado no presente estudo quando se realizou a avaliação por estado.

Pode-se observar alta diversidade entre as populações estudadas, o que faz com que a introdução de novas cultivares seja mais complexa. Segundo Carvalho (2021), a dispersão do patógeno por reprodução clonal indica a principal causa da alta diversidade observada, ocasionando na migração dessa população para as demais regiões produtoras.

Dos 11 fenótipos de virulência encontrados em 2021, dois são equivalentes a códigos sextetos (EU-C) já identificados na Europa. O código 19/00/00, que corresponde à raça BI:EU16, encontrado em São Paulo, e o código 51/00/00, correspondente à BI:EU20, encontrado em Santa Catarina, Rio de Janeiro e Paraná.

Os fatores de resistência presente nas cultivares ‘RyZ2164’, ‘Balesta’, ‘Bartoli’ e ‘Kibrille’, comum em todos os estados estudados, concedem resistência aos isolados de *B. lactucae*.

5. CONCLUSÕES

As cultivares diferenciadoras 'RyZ2164', 'Balesta', 'Bartoli' e 'Kibrille', devem ser utilizadas em programas de melhoramento da cultura da alface visando a introgressão de genes que confirmam resistência a *Bremia lactucae* Regel.

Os isolados RJ101/21 e PR62/21, apesar de fenótipos de virulência distintos, devem ser estudados com maior profundidade por apresentarem maior agressividade em relação aos demais isolados avaliados, relacionada a suscetibilidade às cultivares diferenciadoras.

Assim como deve-se ser analisada a resistência presente nos isolados RS170/21 e PR56/21, por apresentarem apenas um fator de virulência.

6. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL - Anuário estatístico da agricultura brasileira. **Consultoria e Agroinformativos**. São Paulo, p. 110-112, 2020.

AIRES, E. S. **Cultivares de alface americana em função de épocas de produção e ambientes de cultivo no Submédio do Vale São Francisco**. Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, 2019.

ANDRIVON, D. **Race structure and dynamics in populations of *Phytophthora infestans***. Canadian Journal of Botany, 72:1681–1687, 1994.

CAPRIO, C. H. **Genômica populacional de *Bremia lactucae* e variação fenotípica para resistência em alface no Brasil**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2021.

CARVALHO, G. R. **Atividade de inseticida em diferentes modalidades de aplicação, no controle de insetos vetores de viroses, na cultura da alface**, Uberlândia – Mg, 2017.

CARVALHO, L. T. S. **Monitoramento de fenótipos de virulência e fatores de resistência à *Bremia lactucae* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2021.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim Hortigranjeiro**. Brasília,v. 8, n. 2. 2022.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Universidade Federal de Viçosa, 2013.

FRANCO, C. ***Bremia lactucae*: Monitoramento, Dinâmica Populacional E Sensibilidade À Fungicidas**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2020.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alface cultivados no Brasil**. Embrapa Hortaliças. p. 7, Brasília, 2009. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 75).

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. **Censo Agropecuário**. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/>. Acesso em: 07 março de 2021.

IEA – Instituto de Economia Agrícola, 2020. **Área e produção dos principais produtos da agropecuária**. Disponível em: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?codsis=1&idioma>. Acesso em: 10 setembro de 2022.

ILOTT, T. W.; DURGAN, M.E.; MICHELMORE, R.W. **Genetics of virulence in California populations of *Bremia lactucae* (Lettuce Downy Mildew)**. Phytopathology, Saint Paul, v. 77, n. 10, p. 1381-1386, 1987.

IPM – Integrated Pest Management. **The International Bremia Evaluation Board**. Crop Profile for Lettuce in California, 2001. Disponível em: <https://www.worldseed.org/our-work/plant-health/other-initiatives/ibeb/>. Acesso em: 19 de setembro de 2022.

ISF – Federação Internacional de Sementes. **The International Bremia Evaluation Board**. Crop Profile for Lettuce in California, 2021. Disponível em: <https://www.worldseed.org/our-work/plant-health/other-initiatives/ibeb/>. Acesso em: 17 de novembro. 2021.

LEBEDA, A.; ZINKERNAGEL, V. **Evolution and distribution of virulence in the German population of *Bremia lactucae***. Plant Pathology, v. 52, n. 1, p. 41-51, 2003.

LEBEDA, A.; PINK, D. A. C.; ASTLEY, D. **Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*)**. Kluwer Academic Publishers, p.85–117, 2002.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 68p, 2010.

MAKISHIMA, N.; MELO, W. F. **O rei das hortaliças**. Revista Cultivar HF. Pelotas, v. 5, n. 29, p. 28-32, dez. 2004/jan. 2005.

MARIN, M. V. **Monitoramento de raças de *Bremia lactucae* em alface e distribuição dos fatores de virulência no estado de São Paulo em 2014 e 2015**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2018.

PAIM, B. T.; CRIZEL, R. L.; TATIANE, S. J.; RODRIGUES, R.; ROMBALDI, C. V.; GALLI, V. **Mild drought stress has potential to improve lettuce yield and quality**. Scientia Horticulturae, 272:109578, 2020.

PANIZZI, R.; BRAZ, L.; CASTOLDI, R.; GALATTI, F. **Monitoramento de raças de *Bremia lactucae* em 2010 e 2011 no Estado de São Paulo**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2012.

REVSITA CULTIVAR. **Medidas de manejo do míldio em alface**, v. 18, n. 123, p. 10, setembro de 2020. Disponível em: <https://www.grupocultivar.com.br/materias/622>. Acesso em: 20 de novembro de 2021.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. **Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira**. Horticultura Brasileira, UFRPE – Recife, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.

SOUZA, J. O. **Identificação de raças de *Bremia lactucae* no Estado de São Paulo e desenvolvimento de linhagens de alface-crespa resistentes**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2009.

SOUZA, L. N. ***Bremia lactucae*: monitoramento e estudo da compatibilidade sexual em populações brasileiras**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2021.

TBCA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2021. **Composição Química (Informação Estatística)**. Disponível em: http://www.tbca.net.br/base-dados/int_composicao_estatistica.php?cod_produto=C0009B. Acesso em: 02 novembro de 2021.

TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. **Manejo e métodos de controle de doenças fúngicas na cultura da alface**. Programa De Sanidade Em Agricultura Familiar – PROSAF, 2017. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/pdf/prosaf/apostilas/doencas_alface.pdf. Acesso em: 20 de novembro de 2022.

USDA – Department of Agriculture, 2020. **Vegetables Annual Summary**. Disponível em: https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays_Reports/reports/vegean20.pdf. Acesso em: 09 março de 2022.

VAN B.; A. H. C.; SCHERM, H.; DOWNY, I. N.; DAVIS, R. M.; SUBBARAO, K. V.; RAID, R. N.; KURTS, E. A. **Compendium of lettuce diseases**. Saint Paul, American Phytopathological Society. p. 17-19.

VAN E. K.; VAN D. A. **Identification and denomination of “new” races of *Bremialactucae***. Eucarpia meeting on leafy vegetables genetics and breeding, Olomuc: Czech Republic, Proceeding. p. 105 – 107, 1999.

VAN, H. N; HUANG, C. J.; VLEESSCHAUWER, D.; DELARE, I.; PAUWELYN, E.; BLEYAERT, P.; HOFTE, 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, P. F.; TÚLIO, F. A.; ANDRADE, M. A. P. **Monitoramento de raças de *Bremia Lactucae* em alface no Estado de Minas Gerais em 2010**. Ciência et Praxis 5:7–10, 2012.