

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Bremia lactucae*: MONITORAMENTO E ESTUDO DA
COMPATIBILIDADE SEXUAL EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS**

Larissa Nogueira de Souza

Ma. em Agronomia (Produção Vegetal)

Engenheira Agrônoma

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Bremia lactucae*: MONITORAMENTO E ESTUDO DA
COMPATIBILIDADE SEXUAL EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS**

Larissa Nogueira de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Leila Trevisan Braz

Coorientadores: Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi

Prof. Dr. Glauco de Souza Rolim

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Produção Vegetal).

S729b Souza, Larissa Nogueira de
Bremia lactucae: monitoramento e estudo da compatibilidade sexual em populações brasileiras / Larissa Nogueira de Souza.
-- Jaboticabal, 2021
72 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Leila Trevisan Braz
Coorientadora: Rita de Cássia Panizzi

1. heterotalismo. 2. homotalismo. 3. míldio da alface. 4. oósporo. 5. reprodução sexual. 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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: *Bremia lactucae*: MONITORAMENTO E ESTUDO DA COMPATIBILIDADE SEXUAL EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS

AUTORA: LARISSA NOGUEIRA DE SOUZA

ORIENTADORA: LEILA TREVISAN BRAZ

COORDINADORA: RITA DE CÁSSIA PANIZZI

COORDINADOR: GLAUCO DE SOUZA ROLIM

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LEILA TREVISAN BRAZ (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola (Produção Vegetal) / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. DANIEL RUFINO AMARAL (Participação Virtual)
Instituto Federal do Triângulo Mineiro / Uberaba/MG

Profa. Dra. RENATA CASTOLDI (Participação Virtual)
Universidade Federal de Uberlândia / UFU - Câmpus Monte Carmelo, MG

Profa. Dra. FERNANDA DIAS PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. HAMILTON CÉSAR DE OLIVEIRA CHARLO (Participação Virtual)
Instituto Federal do Triângulo Mineiro / IFTM - Uberaba/MG

Jaboticabal, 05 de abril de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Larissa Nogueira de Souza nasceu em 23 de julho de 1991, na cidade de Frutal, estado de Minas Gerais, filha de Luisa Helena de Souza. Ingressou no curso Técnico em Agricultura e Zootecnia, concomitante com o Ensino Médio, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM) - Câmpus Uberaba, em fevereiro de 2006. No mesmo Câmpus, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica, em fevereiro de 2009. Durante a graduação, foi bolsista voluntária de iniciação científica no ano de 2009, e bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), de 2010 a 2013. No ano de 2013, participou como rondonista da equipe de agricultura e meio ambiente, no projeto Rondon - Operação Canudos. Durante a graduação desenvolveu o Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado “Controle da ferrugem asiática da soja com diferentes épocas de aplicação de fungicidas e linhagens convencionais”, sob a orientação do Prof. Dr. Daniel Rufino Amaral. Em março de 2015, ingressou no curso de mestrado em Agronomia (Produção Vegetal), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP-FCAV), Jaboticabal-SP. Durante o mestrado desenvolveu a dissertação, intitulada “Complexo *Pestalotioid* associado a doenças em mangueiras e goiabeiras: abordagem filogenética e patogênica”, sob a orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes. No mesmo Câmpus, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal), sob a orientação da Profa. Dra. Leila Trevisan Braz, em março de 2017. Durante a sua formação acadêmica atuou em projetos de pesquisas concentrados na área de Fitopatologia.

“Assim resplandeça a vossa luz diante dos homens, para que vejam as vossas boas obras e glorifiquem o vosso Pai que está nos céus.”

(Jesus Cristo. Mateus, 5:16)

DEDICO

A Deus, o condutor do nosso caminho que concede todos os recursos necessários para ir adiante na jornada. Eu jamais lograria êxito na realização deste trabalho sem o amparo da providência divina, juntamente com a carinhosa assistência dos benfeitores espirituais, e a cooperação das mãos compassivas de Leila Trevisan Braz, Edgard Henrique Costa Silva, Marcus Vinícius, Carolina Andrade Franco e Rita de Cássia Panizzi.

OFEREÇO

À minha mãe Luisa Helena de Souza.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por meio do amparo do mestre Jesus e da assistência fraternal dos benfeitores espirituais, nos renovam a oportunidade de progredir cada dia.

Aos meus familiares e em especial minha mãe Luisa Helena de Souza pelos seus inestimáveis esforços no meu aprimoramento pessoal e profissional.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), pela minha formação acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e generosas contribuições.

À Profa. Dra. Leila Trevisan Braz, pela orientação que foi imprescindível na realização deste trabalho, bem como por todo apoio, generosidade, paciência e ensinamentos proporcionados ao longo do doutorado. Sou muito grata pela confiança que depositou em mim e por todo o seu empenho em me ajudar a transpor os desafios e tornar real esta conquista pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi, pelo carinho, paciência e acolhimento ao longo dos anos de pós-graduação, bem como os ensinamentos ofertados, os quais foram essenciais para a minha formação acadêmica e também pelas suas valiosas contribuições que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Glauco de Souza Rolim, pela confiança e valorosas sugestões científicas, bem como pelas paciosas explicações e ensinamentos transmitidos, que permitiram agregar novas possibilidades de investigação das informações contidas conjunto de dados desse trabalho, as quais contribuíram para ampliar as minhas competências acadêmicas.

Ao Prof. Dr. Rouverson Pereira da Silva, pelo apoio, por acreditar na minha capacidade e a me motivar a conquistar essa realização pessoal e profissional.

Aos meus amigos Carolina Andrade Franco, Edgard Henrique Costa Silva e Marcus Vinícius Marin, por todo o carinho e ajuda que me deram durante a pós-graduação. As contribuições de vocês ao longo dessa jornada foram essenciais para a realização deste trabalho e também foram muito importantes para o meu progresso pessoal e profissional.

Aos meus amigos Adão Felipe, Bruna, Everton, Gilmar, Kamila, Karita, Nádia, Maria Albertina, Stefany e Taynara, por todos os momentos de alegria que compartilhamos e por toda ajuda, carinho, acolhimento e incentivo que me deram ao longo da pós-graduação.

Aos integrantes do Grupo de estudo Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento (NEOM-FCAV), em especial ao Carlos Caprio, Livia Talita e Natáli por todo auxílio que me deram na condução dos experimentos e também pela boa convivência diária.

Aos integrantes do Departamento Ciências da Produção Agrícola, em especial ao Wagner, Sidneia e Rosane por toda ajuda, disponibilidade e boa convivência diária.

Aos funcionários do Setor de Olericultura e Plantas Aromático-Medicinais, Inauro e Reinaldo Aparecido (Tilápia) por toda ajuda e disponibilidade na condução dos experimentos de campo e também pela boa convivência.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Martins Soares e integrantes do laboratório de Nematologia, pelo suporte e empréstimo do microscópio para a captura de imagens das amostras dos isolados de *Bremia lactucae* analisadas neste trabalho.

Aos produtores de alface, por permitirem as coletas de amostras foliares de alface e de serralha com sintomas de míldio da alface, bem como ao Silvio Nakagawa por meio da empresa Agristar do Brasil Ltda, e também a Denise Takahashi e Irineu Hirata e por meio da empresa Enza Zaden Brasil, pela assistência fornecida nas coletas e envio dessas amostras foliares com sintomas de míldio da alface para o laboratório do Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento (NEOM-FCAV), as quais foram essenciais para realização deste trabalho.

Aos meus amigos do centro espírita Chico Xavier, pela assistência fraterna e ensinamentos, em nome de Jesus Cristo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e também colaboraram para minha progressão pessoal e profissional, embora seus nomes não tenham sido mencionados.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A alface	4
2.2 O míldio da alface	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Coleta e manutenção dos isolados	11
3.2 Incidência do míldio.....	13
3.3 Monitoramento dos fenótipos de <i>Bremia lactucae</i>	14
3.4 Ocorrência natural de oósporo em plantas de alface e serralha	15
3.5 Identificação do sistema de acasalamento e da compatibilidade sexual (“mating types” B ₁ e B ₂) entre os isolados	16
4 RESULTADOS	19
4.1 Monitoramento de <i>Bremia lactucae</i> e fenótipos de virulência identificados	19
4.2 Ocorrência natural de oósporo em plantas de alface e serralha	43
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	56
7 REFERÊNCIAS	56

***Bremia lactucae*: MONITORAMENTO E ESTUDO DA COMPATIBILIDADE SEXUAL EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS**

RESUMO – O fitopatógeno *Bremia lactucae* é o agente causal do míldio da alface. Essa é a principal doença foliar que incide sobre cultura da alface em condições de inverno. O monitoramento da variabilidade fenotípica dos isolados de *B. lactucae* contribui para a prospecção de cultivares resistentes. Assim, objetivou-se monitorar e estudar a compatibilidade sexual em populações brasileiras de *B. lactucae* e elucidar a ocorrência da reprodução sexual em alface (*Lactuca sativa*) e serralha (*Lactuca serriola*). Amostras foliares de alface e de serralha com esporulações visíveis de *B. lactucae* foram coletadas em 33 municípios de seis estados brasileiros e Distrito Federal. Os fenótipos de virulência das populações de monitoradas foram identificados com a inoculação da suspensão de 5×10^4 esporângios mL⁻¹ em cotilédones de cultivares do conjunto diferencial de do código sexteto EU-C. As populações dos isolados de *B. lactucae* dos estados de São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul compartilham seis dos 15 fatores de virulência avaliados. Foram encontrados 27 fenótipos de virulência e os códigos sextetos 31-00-02, 31-16-02, 31-24-02 e 31-01-02 foram os mais frequentes. 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 populações brasileiras avaliadas neste estudo. A predominância de alguns fenótipos de virulência, indica que a reprodução clonal é a principal forma de propagação de *B. lactucae*, no entanto a ocorrência natural de oósporos foi detectada em plantas de alface e serralha, na maioria dos locais amostrados. A variabilidade da virulência dos isolados brasileiros é resultado da flexibilidade do patógeno em se reproduzir sexualmente e assexuadamente, com alta incidência de isolados que foram considerados homotáticos secundários, sendo que a compatibilidade sexual B₂ predominante, foi a mais frequente na população brasileira de *B. lactucae*, seguido por B₁ predominante e B₁ = B₂.

Palavras-chave: heterotalismo, homotalismo, míldio da alface, oósporo, reprodução sexual

***Bremia lactucae*: MONITORING VIRULENCE AND SEXUAL COMPATIBILITY
IN BRAZILIAN POPULATIONS**

ABSTRACT - The phytopathogen *Bremia lactucae* is the causal agent of lettuce downy mildew. This is the central leaf disease that affects lettuce in winter conditions. Monitoring the phenotypic variability of *B. lactucae* results contributes to the prospect of resistant cultivars. Thus, the objective was to monitor and study sexual compatibility in Brazilian populations of *B. lactucae* and elucidate the occurrence of reproduction in sexual lettuce (*Lactuca sativa*) and milkweed (*Lactuca serriola*). Leaf samples of lettuce and milkweed with specific sporulation of *B. lactucae* were collected in 33 municipalities in seven Brazilian states. The virulence phenotypes of the monitored populations were identified with the inoculation of a suspension of 5×10^4 sporangia mL⁻¹ in cotyledons of cultivars of the EU-C sextet code differential set. The populations of *B. lactucae* from the states of São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, and the Rio Grande do Sul share six of the 15 virulence factors obtained. 27 virulence phenotypes were found, and the sextet codes 31-00-02, 31-16-02, 31-24-02, and 31-01-02 were the most frequent. The genes and resistance factors of the cultivars Argelès (*Dm38*), Balesta, and Bartoli can be selected as sources of resistance for genetic improvement. The predominance of some virulence phenotypes indicates that clonal reproduction is the main form of propagation of *B. lactucae*. However, oospore natural occurrence was detected in lettuce and milkweed plants in most of the sampled places. The variability of virulence in Brazilians is the result of the pathogen's flexibility to reproduce sexually and asexually, with a high rate of attainment that secondary homotálcs were analyzed, with the predominant B2 sexual compatibility being the most frequent in the Brazilian population of *B. lactucae*, followed by predominant B₁ and B₁ = B₂.

Keywords: heterothalism, homothalism, lettuce downy mildew, oospore, sexual reproduction

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça folhosa, com importância econômica mundial. No Brasil, a alface mobiliza em torno de R\$ 8 bilhões por ano em comercialização do setor de varejo e a produção nacional dessa folhosa é estimada em 1,5 milhão de tonelada por ano (ABCSEM, 2017). Dentre os principais produtores de alface do país destaca-se o Estado de São Paulo, que responde por 30% da produção total dessa hortaliça (AGRIANUAL, 2020). No entanto, o cultivo intensivo e contínuo da alface, especialmente nas condições ambientais de inverno, propiciam à incidência do míldio da alface nas áreas de cultivo (Subbarao et al., 2017).

A ocorrência de míldio nas áreas de cultivo de alface afeta o rendimento e a qualidade de produção da hortaliça. Sendo essa doença foliar considerada como a principal da cultura da alface no mundo. O míldio é causado pelo oomiceto *Bremia lactucae* Regel, esse fitopatógeno pode infectar as plantas de alface em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura (Michelmore e Wong, 2008).

As medidas de controle do míldio têm sido uso de cultivares resistentes à *B. lactucae*, concomitante com aplicação de fungicidas (Parra et al., 2021). No entanto, o controle do patógeno por meio da resistência genética das cultivares torna-se efêmera, devido à alta variabilidade de virulência dos isolados de *B. lactucae*. Os isolados de *B. lactucae* são capazes de promover variações específicas na virulência, essas alterações decorrem em modificações da especificidade do fenótipo que pode proporcionar resistência a fungicidas, bem como suplantar a resistência genética das cultivares de alface (Michelmore e Wong, 2008).

A resistência genética em cultivares de alface é constituída pela relação gene-a-gene entre alface e *B. lactucae*, em que a resistência genética da planta é governada por genes *Dm* ou fatores *R*, os quais apresentam-se correspondente a fatores de avirulência (*Avr*) do fitopatógeno (van Hese et al., 2016). Portanto, para a estratégia de desenvolvimento de cultivares de alface com resistência genética a *B. lactucae* é essencial a identificação de fenótipos e da especificidade da virulência dos isolados (Parra et al., 2016).

A partir do monitoramento da variabilidade fenotípica dos isolados *B. lactucae* é possível elucidar a estrutura genética de virulência da população do fitopatógeno e também compreender quais mecanismos biológicos estão atuantes na ocorrência de variabilidade fenotípica dos isolados. Essas informações são úteis para os fitomelhoristas possam estabelecer a conexão de quais genes *Dm* e fatores *R* serão mais apropriados na introgressão em cultivares comerciais de alface a fim de conferirem a resistência à *B. lactucae* (Crandall et al., 2018).

As variações de virulência em isolados de *B. lactucae* pode ocorrer por meio de eventos da reprodução assexuada, como a anastomose (van Hese et al., 2016). No entanto, o processo mais significativo na geração de novos fenótipos de virulência nos isolados de *B. lactucae* é a reprodução sexual (Michelmore e Ingram, 1981). Os isolados de *B. lactucae* são predominantemente heterotáticos, com “mating types” B₁ e B₂ (Michelmore e Ingram, 1980). Embora o homotalismo secundário tenha sido relatado em alguns indivíduos (Michelmore e Ingram, 1982).

Na reprodução sexual, há a formação de oósporos no interior do tecido foliar do hospedeiro, que são estruturas que podem prolongar a sobrevivência do fitopatógeno em condições adversas (Michelmore e Ingram, 1981), além disso, os

oósporos também são considerados uma fonte de inóculo primário (Lebeda e Blok, 1990). Assim, outras plantas hospedeiras como a serralha (*Lactuca serriola*), infectadas por *B. lactucae* podem ser fonte inóculo para a cultura da alface (Subbarao et al., 2017). Como a serralha é uma planta daninha muito comum nas áreas de cultivo de alface, quando em condições adversas para a sobrevivência do fitopatógeno na cultura de importância econômica como a alface, as plantas de serralha podem servir de fonte de inóculo *B. lactucae* (Lebeda et al., 2008).

O monitoramento dos isolados brasileiros de *B. lactucae* tem relatado ampla diversidade fenotípica, até o momento foram identificados 27 fenótipos de virulência (Franco et al., 2021). Alguns fenótipos específicos de virulência têm sido registrados constantemente nos isolados ao longo dos anos, com ocorrência em diversos estados do país (Vargas et al., 2012; Franco et al., 2021).

Durante o monitoramento realizado no período de 2003 a 2015 no estado de São Paulo, foram identificados 17 fenótipos de virulência de *B. lactucae*. A avaliação da complexidade de virulência por fenótipo calculada pelo índice Rogers apresentou acréscimo de valores no intervalo de tempo, com variação de 0,64 a 2,53. Além disso, a população dos isolados apresentam o compartilhamento 12 fatores de virulência, que corresponde a um valor elevado de complexidade de virulência. Embora os fenótipos mais recorrentes no país terem apresentado um predomínio de menor valor em acúmulo de fatores de virulência, variando de 7 a 8 dos 27 fatores identificados (Marin et al., 2019). Embora o reconhecimento de modificações na taxa de diversidade genética do fitopatógeno é um indício de populações recombinantes (Andrivon, 1994). Os monitoramentos dos isolados brasileiros de *B. lactucae* se concentraram apenas no estudo dos fenótipos de virulência não foi até o momento

investigado a ocorrência da reprodução sexual em isolados brasileiros de *B. lactucae* (Franco et al., 2021).

Diante desses fatos e da importância da recombinação sexual como agente principal promotor de geração de variação nas populações, alguns aspectos relacionados à reprodução sexual em isolados brasileiros de *B. lactucae* não foram investigadas e precisam ser discutido, tais como, os tipos sexuais de “mating-type” presentes nos isolados e nos fenótipos de virulência mais frequentes no país e também, é questionável a ocorrência da reprodução sexual do fitopatógeno em plantas hospedeiras como *L. sativa* e *L. serriola* (Franco et al, 2021).

Nossa hipótese é que a ocorrência da reprodução sexual seja a explicação do aumento da variabilidade de fenótipos na população brasileira de *B. lactucae*, sugerindo que a ocorrência natural de oósporos é comum nos hospedeiros *L. sativa* e *L. serriola*. Assim os objetivos deste estudo foram (I) monitorar a população de *B. lactucae* em vários estados brasileiros; (II) investigar a ocorrência natural da reprodução sexual, (III) elucidar a ocorrência de oósporos em hospedeiros alternativos como fonte de inóculo primário em áreas comerciais de alface e (IV) identificar o sistema de acasalamento e determinar a frequência dos “mating types” B₁ e B₂ na população.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais importante no mundo, sendo a mais consumida nas últimas décadas (Sala e Costa, 2016). No Brasil, a alface é a hortaliça folhosa mais comercializada, com demanda crescente nos últimos anos, e a cultura gera no setor sementeiro um montante superior a R\$ 23

milhões/ano (ABCSEM, 2017). A alfacultura é um setor extremamente importante no quadro socioeconômico do país, a cultura da alface é cultivada em todo território brasileiro, propiciando diversos empregos diretos e indiretos (Carvalho e Kist, 2017).

A produção brasileira de alface está concentrada no Cinturão Verde, que são municípios produtores localizados no entorno do estado São Paulo, que é o principal Estado produtor e consumidor dessa hortaliça folhosa (AIA, 2017). O setor da alfacultura apresenta notável valor econômico para a produção agropecuária paulista. E o setor apresenta notável expansão, sendo evidenciada com a progressão do volume comercializado no Entrepasto do Terminal de São Paulo, em que foram comercializadas 49.880 toneladas em 2018 (AGRIANUAL, 2020).

No entanto, o incremento da produção de alface também traz dificuldades de manejo, principalmente durante o outono e inverno, em que as condições climáticas favorecem o míldio da alface, que pode afetar tanto plantas cultivadas em campo aberto, como em ambiente protegido (Silva, 2008). O míldio da alface é a doença foliar mais importante da cultura em nível mundial, a qual gera elevados prejuízos econômicos (Krause-Sakate et.al., 2016). Essa doença restringe a produção, especialmente sob as condições de baixa temperatura e de longos períodos de molhamento foliar (Lebeda et al., 2002; Michelmore e Wong, 2008; Lopes et al., 2010).

As cultivares de alface com resistência à *B. lactucae* são desenvolvidas em programas de melhoramento genético de plantas de alface (Michelmore; Wong, 2008). A introgressão de genes *Dm* ou fatores *R* em plantas de alface confere a resistência à *B. lactucae* (Braz et al., 2007). No entanto, a resistência permanece eficaz por um período de tempo limitado, em decorrência da alta variabilidade na

população de *B. lactucae* (Michelmore et al., 1988; Michelmore e Wong, 2008; Braz et al., 2016).

Ao passo que é permissível o estudo simultâneo da genética de resistência do hospedeiro e a virulência de *B. lactucae* (Michelmore et al., 1988). No Brasil, a maior parte da prospecção de cultivares de alface com resistência à *B. lactucae* têm sido provenientes do monitoramento de isolados realizado desde 2003, pelo Núcleo de Estudos em Olericultura e Melhoramento (NEOM-FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP-FCAV) (Braz et al., 2016; Tobar-tosse et al., 2017; Marin et al., 2019). O núcleo de estudos NEOM-FCAV foi pioneiro no desenvolvimento da investigação dos fenótipos de virulência dos isolados brasileiros de *B. lactucae*, e, desde então vem relatando a emergência de novos fenótipos de virulência provenientes de plantas de alface (*L. sativa*) (Braz et al, 2016). Até o momento já foram caracterizados a emergência de 27 fenótipos de virulência (Franco et al.,2021).

2.2 O míldio da alface

As condições brasileiras durante o período de inverno favorecem ao cultivo de alface, tendo o volume maior de produção dessa folhosa, porém, esse aumento de oferta do produto acarreta a redução do preço comercializado. A sazonalidade do preço da alface durante o inverno afeta o custo de produção e os prejuízos tornam-se com a incidência do míldio, devido as condições de inverno também serem propícias ao agente causal *Bremia lactucae* Regel (Silva et al., 2017).

O fitopatógeno *B. lactucae* Regel, pode infectar plantas selvagens da família Asteraceae, como: serralha (*L. serriola*), a qual se desenvolve naturalmente em áreas de cultivo da folhosa (Lebeda et al., 2008). Este fitopatógeno danifica os tecidos foliar e os efeitos deletérios deste oomiceto decorrentes das alterações no

metabolismo primário da planta, e há também o comprometimento da fotossíntese, através da colonização da área foliar pelas hifas intercelulares, que favorecem a inibição de elétrons nos parâmetros fotossintéticos (Lebeda e Petrželová, 2010).

Os alfacicultores tendem a controlar o míldio da alface com o uso de cultivares resistentes e de aplicações com produtos químicos. As aplicações com fungicida exacerbam os custos de produção e podem gerar inconvenientes como, o risco de contaminar do meio ambiente e acarretar a intoxicação humana (Johnson e Crute, 1975; Brown et al., 2004). Porquanto, presença de vários ingredientes ativos acima do limite permitido foram detectados em amostras nacionais de alface (ANVISA, 2016). Além disso, o controle pode ser ineficaz, devido ao surgimento de novos fenótipos de *B. lactucae* insensíveis à fungicidas (Gisi e Sierotzki, 2008). Todas estas questões impulsionam e culminam no uso atuante de cultivares resistentes à míldio, visando a sustentabilidade econômica e ambiental (Yuri et al., 2004).

O desenvolvimento de cultivares com resistência à *B. lactucae* são obtidas por meio das atividades dos programas de melhoramento da alface (Michelmore; Wong, 2008). Os genes *Dm* ou fatores *R* conferem resistência ao fitopatógeno (Braz et al., 2007), porém, permanecem eficazes por período de tempo limitado em decorrência da alta variabilidade na população do fitopatógeno (Braz et al., 2016; (Michelmore et al., 1988; Michelmore e Wong, 2008). Ao passo que é permissível o estudo simultâneo da genética da resistência do hospedeiro e a virulência do fitopatógeno (Michelmore et al., 1988), a maior parte da prospecção dessas cultivares está correlacionada com o monitoramento de raças de *B. lactucae* no estado de São Paulo. O programa de melhoramento genético de alface da UNESP-

FCAV, foi o pioneiro no desenvolvimento dessa investigação no País, a qual iniciou-se na década de 2000 e, desde então vem relatando a emergência de novas raças provenientes de *L. sativa* (Braz et al, 2016), totalizando 27 fenótipos de virulência (Franco et al.,2021).

A variação da virulência em isolados de *B. lactucae* promove novos indivíduos com capacidade de superar os genes de resistência presente em cultivares de alface resistente (Lebeda e Schwinn, 1994). Os processos de mutação pontual espontânea, recombinação sexual, hibridação somática com ou sem fusão e recombinação nuclear subsequentes (Petrželová e Lebeda, 2004a), mas a principal causa é a reprodução sexual (Drenth e Goodwin, 1999).

O processo mais significativo na geração de novos fenótipos de virulência de *B. lactucae* é a reprodução sexual (Michelmore e Ingram, 1981). Mas também, pode haver variações de virulência em isolados de *B. lactucae* por meio de eventos da reprodução assexuada, como a anastomose (van Hese et al., 2016). Diferenças fenotípicas associadas ao processo de anastomose em isolados de *B. lactucae* foram observadas na Califórnia, e a população apresentou uma alta incidência de isolados heterocarióticos (Schettini e Michelmore,1991). A anastomose em isolados heterocarióticos pode gerar variabilidade fenotípica, mas também, pode promover um aumento da capacidade de esporulação do isolado em hospedeiros suscetíveis (Fletcher et al., 2019).

Bremia lactucae é predominantemente heterotática, isso é, os indivíduos são autoestéreis, a reprodução sexuada ocorre somente por meio do contato entre hifas de dois indivíduos com talos de compatibilidade sexual oposta, denominados “mating types” B₁ e B₂ (Michelmore e Ingram, 1980). No entanto, alguns isolados

apresentam homotalismo secundário, ou seja, os indivíduos são autocompatíveis ou apresentam compatibilidade com outros indivíduos que possuem o mesmo “mating type” (Michelmore e Ingram, 1982). No ciclo sexual, há a formação de oósporos no interior do tecido foliar do hospedeiro. O oósporo é uma estrutura de sobrevivência a longo prazo (Michelmore e Ingram, 1981) e é também uma fonte de inóculo primário (Lebeda e Blok, 1990).

A ocorrência da reprodução sexual é uma questão crítica no manejo do míldio da alface (Fletcher, 1976; Yuen e Lorbeer, 1987; Lebeda e Blok, 1990; Subbarao et al., 2017). No Brasil, o míldio impacta severamente a produção de alface e nas áreas de cultivos é comum encontrar a infecção de *B. lactucae* em plantas daninhas pertencentes à família Asteraceae (Vieira e Barreto, 2006). A serralha (*Lactuca serriola*) é uma planta daninha muito comum em áreas de cultivo de alface e serve como hospedeiro alternativo de *B. lactucae*, sendo esse patossistema provável fonte de inóculo (Gustafsson et al., 1983, 1985; Petrželová e Lebeda, 2004). A recombinação sexual entre isolados oriundos de hospedeiros alternativos e de alface pode ocorrer e afetar o ciclo da doença (Petrželová e Lebeda, 2003).

O processo da reprodução sexual é caracterizado pela formação de oósporos, estruturas de paredes grossas formadas no interior do tecido hospedeiro e asseguram a sobrevivência a longo prazo do oomiceto em condições adversas. Para o acasalamento, é necessário a colonização da mesma zona do tecido hospedeiro por micélios de tipos de compatibilidade sexual opostas (Lebeda e Blok, 1990; Michelmore et al., 1988), já que *B. lactucae* é predominantemente heterotático, isto é, necessita de dois talos compatíveis para completar seu ciclo de vida, designados como B₁ e B₂ (Petrželová e Lebeda, 2003.). Em populações de *B. lactucae* em

alface, ambos os tipos de acasalamento (B_1 e B_2) são reportados (Gustafsson et al., 1985). Além da ocorrência de isolados que demonstram homotalismo secundário, ou seja, autossuficientes na reprodução sexual (Michelmores et al., 1998).

No entanto, se desconhece a ocorrência da reprodução sexual em populações de *B. lactucae* no país (Vieira e Barreto, 2006), bem como a interação de patossistemas em plantas selvagens (*L. serriola*), a qual comumente pode hospedar o fitopatógeno e desenvolver-se naturalmente em áreas de cultivo de alface (Lebeda et al., 2008).

Os estudos concentraram-se em alface (*L. sativa*), assim, a variação de virulência e a origem dessa variação não é bem definida até o momento, requerendo-se informações sobre a distribuição de tipos de compatibilidade sexual para inferir na ocorrência de hibridação e/ou a recombinação entre isolados de *B. lactuca* provenientes da cultura (*L. sativa*) e a influência de hospedeiro silvestre, a serralha (*L. serriola*), como fonte de inóculo na sobrevivência do fitopatógeno na forma sexual em populações de *B. lactucae*. Por conseguinte, é provável que plantas de selvagens da família Asteraceae infectadas, sirvam como fonte de inóculo para infecções em *L. sativa* (Lebeda et al., 2002, 2008; Voglmayr et al., 2004). Apesar de estudos anteriores demonstrarem que os isolados de *B. lactucae* a partir de *L. serriola* serem significativamente mais patogênicos para *L. serriola* do que para *L. sativa*, e diante dessa afinidade genética entre as espécies hospedeiras de *Lactuca* para *B. lactucae*, deve considerar-se no planejamento de experimentos focados na pesquisa de mecanismos de resistência. (Lebeda et al., 2008).

Os estudos populacionais analisando os genes “mating-type” podem inferir sobre a estratégia reprodutiva adotada pelo fitopatógeno *B. lactucae*, na prevalência

de apenas um dos talos para a reprodução assexual (Gustaffsson, 1985), além de suportar comparações entre populações, quando se objetiva avaliar a coevolução entre fitopatógeno e hospedeiro entre duas ou mais localidades. Na Bélgica, por exemplo, a frequência de isolados B₁ é maior do que B₂ (Hese et al., 2016). Enquanto que nos estudos na República Tcheca o oposto é relatado, ou seja, há predomínio de isolados B₂ (Petrželová e Lebeda, 2003). Fatores ambientais como temperatura, umidade relativa (UR), velocidade do vento, radiação solar e duração da umidade nas folhas foram identificados como fatores que determinam a extensão da produção, dispersão e sobrevivência de conídios, bem como os processos de infecção (Fall; Van Der-Heyden e Carisse, 2016). Estudos semelhantes a esses nunca foram feitos no Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e manutenção dos isolados

Amostras foliares de alface e de serralha com esporulação visível de *B. lactucae* foram coletadas durante o inverno de 2017 e de 2018, em áreas comerciais de produção de alface, no Distrito Federal (1 município) e nos estados brasileiros de Goiás (1 município), Minas Gerais (1 município), Paraná (2 municípios), Rio de Janeiro (1 município), Rio Grande do Sul (3 municípios) e São Paulo (17 municípios).

Adicionalmente, foram incluídos oito isolados representantes de fenótipos de virulência mais frequentes ocorridas no Brasil, os quais encontravam-se na coleção de isolados de *B. lactucae* armazenados pelo NEOM (UNESP-FCAV) (Marin et al., 2019). Esses isolados foram incluídos para maximizar a diversidade genética do estudo e fornecer contexto histórico do modo de reprodução e “mating type” do

oomiceto. Os isolados selecionados foram coletados durante o inverno de 2015 e de 2016, em áreas comerciais de produção de alface, nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo.

Foi considerado como população de *B. lactucae*, o conjunto de isolados provenientes de um mesmo estado. A população de cada estados foram analisadas separadamente. E também foi realizado uma análise conjunta com as diferentes populações para obter uma visão geral dos fenótipos nas populações brasileiras de *B. lactucae*.

As amostras foliares coletadas nas áreas comerciais de produção de alface foram acondicionadas individualmente em potes plásticos com tampa, devidamente identificado com os seguintes dados: número da amostra, local da coleta, nome da espécie vegetal, em caso de plantas de alface o nome da cultivar, nome da propriedade e nome do produtor. Em seguida as amostras foram revestidas por sacos plásticos e acomodados em caixas térmicas com gelo, e, transportadas até o laboratório de Genética e Melhoramento de Hortaliças da UNESP-FCAV. E, em caso da necessidade de estocagem das amostras por curto prazo, foram armazenadas no freezer a -20°C, enquanto, que por longo prazo, em freezer a -80°C.

As amostras foliares conduzidas ao laboratório e a partir de cada amostra foliar, selecionou-se lesões únicas com esporulação visível para a extração de isolados de *B. lactucae*. Quando necessário presença de isolados de *B. lactucae* foram confirmadas por meio de exames visuais das esporulações, com observações em microscopia de luz, em paridade com as características descritas por Krause-Sakate et al., (2016), e por Lebeda (2008).

Os isolados foram extraídos a partir da suspensão de esporângios provenientes da lavagem de cada amostra foliar. Foram acrescentadas quatro gotas de surfactante (Tween 20) na suspensão de esporângios de cada isolado, em seguida a suspensão de cada isolado foi inoculada individualmente, em cotilédones totalmente desenvolvido de alface ‘Solaris’, que é um genótipo suscetível a todos os fenótipos de virulência identificados no Brasil (ILOTT et al.,1987).

Após as inoculações os isolados foram incubados em B. O. D. (Biochemical Oxygen Demand) por 15 dias, sob condições favoráveis ao desenvolvimento e esporulação. Todos os preparos de suspensões e inoculações foram feitos em capela de ar de fluxo laminar para evitar contaminação cruzada. Realizou-se quatro ou cinco ciclos de multiplicação para obter a quantidade de suspensão com o nível de esporângios na concentração de 5×10^4 esporângios mL⁻¹, as quais foram utilizadas nas análises de identificação do sistema de acasalamento, determinação da compatibilidade sexual (“mating types” B₁ e B₂) e identificação dos fenótipos de virulência.

3.2 Incidência do míldio

Durante as coletas de amostras foliares realizadas em áreas comerciais de produção de alface, registrou-se o nível de incidência da doença, considerando a proporção de esporulações visíveis de míldio, presente nas folhas e a quantidade de plantas de alface e/ou serralha naturalmente infectadas por *B. lactucae*. O nível de incidência de míldio foram classificada em: baixa, moderada ou alta, conforme descrito por Mieslerová et al. (2013).

3.3 Monitoramento dos fenótipos de *Bremia lactucae*

A inoculação dos isolados identificação dos fenótipos de virulência dos isolados *B. lactucae* foi realizada para a foi realizada de acordo com Michelmore e Crute (1982), modificado por Marin et al. (2019), com concentração de 5×10^4 esporângios mL⁻¹.

A suspensão e cada isolados foi individualmente inoculada de em cotilédones totalmente expandida de cultivares do conjunto diferencial EU-C, com 16 genótipos de alface elegidas pelo consórcio de empresas e instituições que desenvolvem cultivares de alface na Europa (IBEB) em 2018. A série diferencial de genótipos de alface do conjunto EU-C consiste em dois grupos com seis genótipos (sexteto) e um grupo diferencial com quatro genótipos. Cada posição ocupada pelo genótipo de alface dentro do grupo diferencial representa um valor do código EU-C sexteto, com valores formados em potências ascendentes de 2 (1,2,4,8,16 ou 32). Os valores do código sexteto são formados pela soma do genótipo com suscetibilidade a isolados de *B. lactucae* e são avaliados como suscetíveis aqueles que recebem os símbolos + ou (+), enquanto os genótipos resistentes recebem - e (-), conforme descrito por van Ettekoven e van Arend (1999).

As avaliações foram realizadas aos 7, 11 e 15 dias após a inoculação, marcando as plântulas com: +, quando havia esporulação abundante, (+), quando havia esporulação esparsa superior a 50%, (-), quando havia esporulação esparsa inferior a 50% e -, quando havia ausência de esporulação (ISF, 2020). Os genótipos do conjunto diferencial e seus genes *Dm* e fatores *R* são apresentados na Tabela 2.

Os dados foram analisados com base nas reações de suscetibilidade ou resistência das cultivares, conforme a metodologia proposta por van Ettekoven e van

Der Arend (1999), com a designação de sinais referente aos danos nos tecidos cotiledonares das cvs. de alface do Código “Sextet”. E a partir dos valores somados dentro de cada grupo dos conjuntos de cultivares identificou-se os fenótipos de virulência dos isolados de *B. lactucae*.

Após a determinação dos fenótipos de virulência, foi calculada a complexidade da diversidade e frequência de fenótipos de *B. lactucae*.

A complexidade da virulência por isolados (C_i) foi calculada pela fórmula $C_i = \sum p_j v_j$, onde $j = 1 \dots N_p$, N_p é o número de fenótipos identificados, p_j é a frequência do fenótipo j e v_j é o número de fatores de virulência presentes no fenótipo j . A complexidade da virulência por fenótipo (C_p) foi calculada pela fórmula $C_p = (\sum v_j) / N_p$, onde o número de fatores de virulência (v) era o número de genes *Dm* ou fatores *R* que conferem resposta suscetível ao fenótipo j . (Andrison, 1994; van Hese et al., 2016). A diversidade populacional, que reflete a riqueza fenotípica, foi obtida por meio do índice de Gleason (I_g) pela fórmula $I_g = (N_p - 1) / \ln(N_i)$, onde N_i é o número de isolados avaliados (Andrison, 1994). Além disso, a frequência dos fenótipos identificados foi calculada por estado e pelo número total de isolados. A frequência de cada fator de virulência foi obtida somando-se o número de vezes de sua respectiva cultivar com resposta suscetível.

3.4 Ocorrência natural de oósporo em plantas de alface e serralha

Amostras foliares de alface e serralha coletadas durante o inverno de 2017 e de 2018, com infecções visíveis de *B. lactucae* foram analisadas para detectar a presença de oósporo nas folhas. Selecionaram-se tecidos foliares que apresentavam maiores possibilidades de formação de oósporo, tais como lesões amarelas ou marrons com esporulações esparsas, conforme Micheltore e Ingram, 1982. Dez fragmentos (aprox. 1,5 cm) foram retirados de cada amostra foliar e em

seguida um subconjunto de cinco fragmentos foram imersos em álcool absoluto e o outro subconjunto foi imerso em água destilada, sendo preservados em recipientes Eppendorf (2 mL). Essas amostras foram armazenadas a 5°C para descoloração. Após a descoloração, foram examinadas microscopicamente, verificando a presença ou ausência de oósporo nos fragmentos foliares de cada amostra. A intensidade de produção de oósporo foi avaliada usando a escala adaptada de Petrzellová e Lebeda 2003, onde: 0 = ausência de oósporos, 1 = formação esparsa de oósporos, 2 = formação abundante de oósporos e 3 = formação muito abundante de oósporos. Foi considerada a nota mais frequente nas observações dos dez fragmentos analisados, como resultado representativo da amostra. Para o registro da presença de oósporo nos tecidos foliares foi utilizado, microscópio equipado com câmera para captura de imagens e sistema de medições – Olympus modelo BX50, com software de análise de imagens CellSens-Standard da Olympus.

3.5 Identificação do sistema de acasalamento e da compatibilidade sexual (“mating types” B₁ e B₂) entre os isolados

Três pares de cotilédones excisados de plântulas de ‘Solaris’ (com sete dias após emergência) e três discos foliares com diâmetro de 10 mm de folhas jovens completamente expandidas de mudas de cultivares suscetíveis (‘Green Towers’ e ‘Cobham Green’) foram utilizadas as análises de identificação do sistema de acasalamento e da determinação da compatibilidade sexual (“mating types” B₁ e B₂). Os cotilédones destacados e os discos foliares foram dispostos com a parte abaxial para cima, sobre a superfície de duas lâminas para microscopia e as lâminas foram colocadas em placas de Petri com papel filtro umedecido, preparadas 24 horas antes da inoculação (Figura 1).

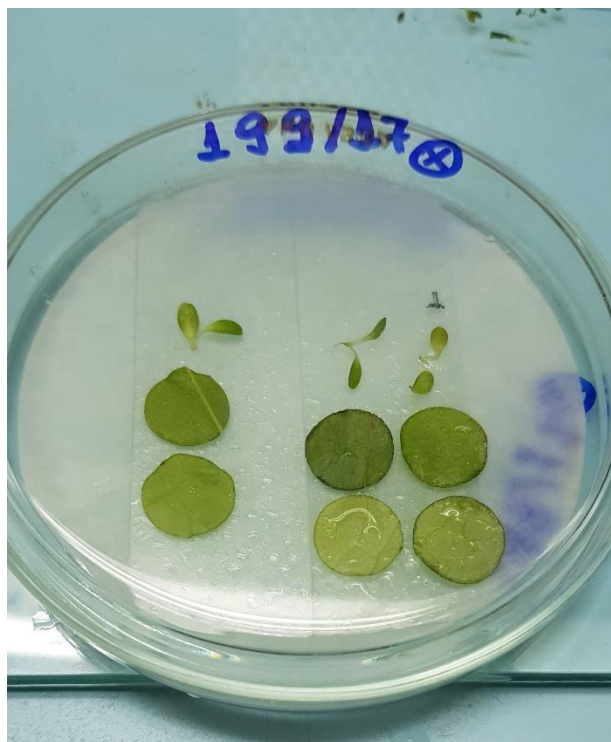


Figura 1. Inoculação da suspensão esporângios de isolados de *B. lactucae* para a identificação do sistema de acasalamento e da compatibilidade sexual.

Para avaliar a reprodução sexual foi investigado o sistema de reprodução dos isolados e determinado os “mating types” dos isolados. O sistema de acasalamento dos isolados foram investigados testando a capacidade de formação de oósporos de 42 isolados submetidos a autocruzamento e a compatibilidade sexual foi determinada por meio de cruzamentos combinados em pares com os isolados dos tipos B₁ e B₂.

Inicialmente, dois isolados foram selecionados como “mating types” B₁ e B₂, os quais apresentaram maior formação de oósporos e boa esporulação assexuada. Os isolados sexualmente compatíveis, B₁ e B₂, foram determinados a partir de cruzamentos aleatoriamente combinados entre pares de doze isolados, sendo oito representativos da coleção do grupo NEOM e quatro coletados em 2017.

Para identificação do sistema de acasalamento e determinação do “mating type”, os 42 isolados foram inoculados individualmente em três tratamentos: 1 - Autocruzamento, 2 - Cruzamento com “mating type” B₁ e 3 - Cruzamento com “mating type” B₂. Os cruzamentos 2 e 3 foram realizados como controle para correta determinação dos “mating type” dos isolados homotáticos.

A suspensão de cada isolado foi preparada e ajustada na concentração 5×10^4 esporângios mL⁻¹, conforme os procedimentos descritos por Marin et al. (2019). Uma gota (aprox. 30 µl) da suspensão foi individualmente depositada em cada tecido foliar que estavam contidos em placa de Petri, conforme descrito anteriormente. Todos os preparos de suspensões e inoculações foram feitos em bancada de ar de fluxo laminar para evitar contaminação cruzada. Após as inoculações as placas de Petri foram acondicionadas em câmara de incubação do tipo “Biochemical Oxygen Demand” (B. O. D.), com temperatura de 16°C e com as primeiras horas em ausência de luz de fotoperíodo de 12h.

A presença de oósporos em cada cruzamento foi determinada microscopicamente nos tecidos foliares após 20 dias de incubação. O isolado que formou oósporo quando autocruzado foi classificado como autofértil, com sistema de acasalamento homotalismo secundário. Isolados autocruzados que não formaram oósporos foram classificados como autoestéreis e com sistema de acasalamento heterotalismo, conforme descrito por Michelmores e Ingram, (1982).

A intensidade de produção de oósporos de cada isolado homotático foi avaliada usando escala proposta por Petrzalová e Lebeda (2003), com adaptações, conforme previamente descrito na etapa de identificação de presença de oósporos

no campo. Considerou-se como resultado representativo a nota com maior frequência nas observações de cada amostra avaliada.

Os resultados de intensidade de produção de oósporos foram considerados na análise de determinação da compatibilidade sexual (“mating types” B₁ e B₂) dos isolados homotáticos. A classificação do sistema de acasalamento e do “mating type” dos isolados foi realizada conforme Michelmore e Ingram (1982). Os isolados autoestéreis, ou seja, aqueles que quando autocruzados não formam oósporos, são classificados como heterotáticos, podendo ser apenas B₁ ou apenas B₂. Os isolados autoférteis, ou seja, aqueles que quando autocruzados formam oósporos, são classificados como homotáticos. Dentre os homotáticos, aqueles que produzem mais oósporos quando cruzados com B₁ do que com B₂ são classificados como B₂ predominante (B₁<B₂); se mais oósporos forem verificados quando o cruzamento for com B₂ do que com B₁, os isolados são B₁ predominante (B₁>B₂); se o número de oósporos forem os mesmos em cruzamento com B₁ e B₂, os isolados serão B₁=B₂.

4 RESULTADOS

4.1 Monitoramento de *Bremia lactucae* e fenótipos de virulência identificados

Neste estudo, 116 isolados foram caracterizados fenotipicamente, provenientes de coletas em seis estados brasileiros e no Distrito Federal. Coletaram-se cinco isolados em 2015, dois isolados em 2016, 57 isolados em 2017, 51 isolados em 2018 e um isolado não foi especificado o ano de coleta. Dentre os 116 isolados, 73 foram coletados no estado de São Paulo, por ser o principal produtor nacional de alface.

A incidência do míldio em plantas de alface e de serralha nas áreas comerciais de produção de coletadas durante o inverno de 2017 e de 2018, apresentaram alta incidência do míldio em 67% das áreas, enquanto, que o nível de incidência classificado como média foi observado em 23 % das áreas e apenas 10 % das áreas coletadas apresentaram baixa incidência da doença (Tabelas 1 e 2).

Os fenótipos de virulência dos isolados de *Bremia lactucae* foram identificados a conforme a resposta de reação de suscetibilidade do conjunto diferencial, com 16 genótipos de *Lactuca* spp. Ao todo foram identificados 25 fenótipos de virulência dos isolados coletados em 2017 e 2018 (Tabela 2). Dentre os isolados de *B. lactucae* oriundos de *L. serriola*, apenas um isolado apresentou viabilidade de cultivo em laboratório e foi capaz de infectar a cultivar suscetível padrão Solaris.

TABELA 1. Relação dos isolados de *Bremia lactucae* em alface utilizados no estudo para identificação dos fenótipos de virulência através do código sexteto EU-C e da compatibilidade sexual ("Mating type"). Incidência do míldio e a ocorrência natural de oósporo nas áreas comerciais amostradas em 2017 e 2018, no Distrito Federal e nos estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo.

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto EU-C	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto
B05 ^c	-	-	-	09-01-00					
253/17	Planaltina, Brasília-DF	Média	2	-	346/18	Planaltina, Brasília-DF	Alta	0	23-00-06
254/17	Planaltina, Brasília-DF	Média	-	23-00-06					
337/18	Nova Gama-GO	Alta	-	31-00-02					
01/18	Fronteira-MG	Alta	2	31-00-00	44/18	Boa Esperança-	Alta	1	-
45/18	Boa Esperança-MG	Alta	1	-	46/18	Boa Esperança-	Alta	1	-
47/18	Santana da Vargem-MG	Média	3	-					
270/17	Colombo-PR	Alta	-	31-00-06	269/18	Colombo-PR	Alta	3	31-24-02

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto EU-C	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto
279/17	Colombo-PR	Alta	-	31-01-06	175/18	São José dos Pinhais-	-	0	63-08-06
282/17	Colombo-PR	Alta	-	63-01-00	177/18	São José dos Pinhais-	Alta	1	63-01-02
275/17	Colombo-PR	Alta	-	31-16-02	159/18	Colombo-PR	Alta	2	63-01-02
271/17	Colombo-PR	Alta	-	31-01-02	180/18	Colombo-PR	Alta	2	31-17-06
281/17	Colombo-PR	Alta	-	63-01-02	182/18	Colombo-PR		0	63-01-00
273/17	Colombo-PR	Alta	-	31-09-06	268/18	Colombo-PR	Alta	3	31-17-06
179/18	Colombo-PR	Baixa	1	31-16-02	174/18	São José dos Pinhais-	Alta	1	63-00-00
181/18	Colombo-PR	Alta	2	31-01-06	176/18	São José dos Pinhais-	-	0	63-00-00
183/18	Colombo-PR	Alta	1	31-01-06	178/18	São José dos Pinhais-	Alta	1	—
189/18	Nova Friburgo-RJ	-	-	31-09-06	191/18	Nova Friburgo-RJ	-	0	31-09-06

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto EU-C	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto
194/18	Nova Friburgo-RJ	-	-	31-09-06	196/18	Nova Friburgo-RJ	-	0	31-09-06
202/18	Nova Friburgo-RJ	Baixa	2	31-01-06	207/18	Nova Friburgo-RJ	-	0	31-01-06
RS 03/15 ^c	Terra de Areia-RS	-	-	51-08-00	71/18	Maquiné-RS	Alta	1	31-01-02
RS 05/15 ^c	Terra de Areia-RS	-	-	50-01-00	265/18	Terra de Areia-RS	Alta	2	-
257/17	Garibaldi-RS	Alta	2	-	68/18	Maquiné-RS	Alta	2	31-01-02
260/17	Maquiné-RS	Alta	3	-	70/18	Maquiné-RS	Alta	1	31-01-02
66/18	Maquiné-RS	Alta	3	31-01-02	72/18	Maquiné-RS	Alta	1	31-01-02
69/18	Maquiné-RS	Alta	1	31-01-02					
Bar 05/15 ^c	Barretos-SP	-	-	31-08-02	04/16 ^c	Campinas-SP	-	0	63-00-00
140/15 ^c	Bauru-SP	-	-	31-01-02	214/17	Bauru-SP	Alta	3	31-01-02

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto EU-C	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto
22/15 ^c	Salesópolis-SP	Alta	-	26-08-00	215/17	Bauru-SP	Alta	3	31-24-02
181/16 ^c	Biritiba-Mirim-SP	-	-	63-08-02	60/17	Biritiba-Mirim-SP	Alta	2	-
167/17	Biritiba-Mirim-SP	Alta	-	31-08-02	41/17	Jaboticabal-SP	Média	0	31-16-02
169/17	Biritiba-Mirim-SP	Alta	-	51-05-00	43/17	Jaboticabal-SP	Média	2	-
219/17	Botucatu-SP	Alta	3	63-08-02	45/17	Jaboticabal-SP	Alta	3	31-16-02
220/17	Botucatu-SP	Alta	-	63-01-02	47/17	Jaboticabal-SP	Alta	0	-
221/17	Botucatu-SP	Alta	-	51-08-00	48/17	Jaboticabal-SP	Alta	0	31-16-02
22/17	Ibiúna-SP	Alta	1	-	50/17	Jaboticabal-SP	Alta	2	-
23/17	Ibiúna-SP	Média	1	31-00-02	227/17	Jaboticabal-SP	Baixa	0	31-16-02
24/17	Ibiúna-SP	Média	-	31-00-02	228/17	Jaboticabal-SP	Média	0	31-00-02

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto EU-C	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto
25/17	Ibiúna-SP	Média	-	31-01-02	232/17	Jaboticabal-SP	Baixa	0	31-16-02
30/17	Ibiúna-SP	Média	-	31-00-02	233/17	Jaboticabal-SP	Baixa	3	31-16-02
33/17	Ibiúna-SP	Média	-	31-00-02	217/17	Marília-SP	Alta	0	31-09-02
133/17	Ibiúna-SP	Média	-	63-05-02	218/17	Marília-SP	Alta	2	31-09-02
134/17	Ibiúna-SP	Média	-	31-00-02	14/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	-
140/17	Itapira-SP	Alta	3	31-09-02	15/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	31-01-00
142/17	Itapira-SP	Alta	2	31-01-02	16/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	-
40/17	Jaboticabal-SP	Média	-	31-00-02	17/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	-
18/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	-	289/17	Monte Alto-SP	Alta	2	-
19/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	-	136/17	Piedade-SP	Alta	-	31-01-02

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto EU-C	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto
20/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	-	31-01-00	74/17	Ribeirão Preto-SP	Alta	-	31-24-02
21/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	-	91/17	Ribeirão Preto-SP	Alta	-	31-24-02
66/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	-	63-00-00	213/17	Ribeirão Preto-SP	Média	1	31-24-02
149/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	-	256/17	Ribeirão Preto-SP	Alta	2	-
180/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	51-09-00	143/17	Salesópolis-SP	Alta	-	31-00-02
181/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	51-01-02	145/17	Salesópolis-SP	Alta	-	63-08-02
182/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	-	146/17	Salesópolis-SP	Alta	-	31-16-02
186/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	51-09-00	147/17	Salesópolis-SP	Alta	3	-
188/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	-	112/17	São José do Rio Preto-SP	Baixa	-	-
189/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	-	118/17	São José do Rio Preto-SP	Alta	-	63-01-02

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto EU-C	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto
193/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	-	120/17	São José do Rio Preto-SP	Alta	-	31-00-02
194/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	63-01-02	241/17	Taquaritinga-SP	Alta	-	31-24-02
199/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	31-09-02	246/17	Taquaritinga-SP	Alta	-	31-24-02
200/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	51-00-00	251/17	Taquaritinga-SP	Alta	2	31-17-06
252/17	Taquaritinga-SP	Alta	3	31-24-02	116/18	Monte Alto-SP	Média	-	31-00-02
262/18	Biritiba-Mirim-SP	Média	1	51-05-00	117/18	Monte Alto-SP	Média	1	31-00-02
329/18	Biritiba-Mirim-SP	Alta	0	31-00-02	118/18	Monte Alto-SP	Média	1	-
377/18	Biritiba-Mirim-SP	Alta	0	31-08-02	119/18	Monte Alto-SP	Média	1	31-00-02
48/18	Botucatu-SP	Média	1	-	268/17	Pitangueiras-SP	Média	1	-
23/18	Ibiúna-SP	Alta	0	31-00-02	63/18	Ribeirão Preto-SP	Alta	1	31-24-02

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto EU-C	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto
24/18	Ibiúna-SP	Alta	2	31-00-02	245/18	Ribeirão Preto-SP	Alta	-	31-24-02
41/18	Itapira-SP	Alta	1	-	61/18	São José do Rio Preto-SP	Alta	-	63-01-02
42/18	Itapira-SP	Alta	1	31-01-02	115/18	São José do Rio Preto-SP	Média	-	23-00-06
43/18	Itapira-SP	Alta	0	31-01-02	118/18	São José do Rio Preto-SP	Média	-	63-01-02
292/18	Guariba-SP	Alta	0	63-01-02	75/18	São Roque-SP	Alta	-	63-00-00
159/18	Matão-SP	Média	2	-	27/18	Sorocaba-SP	Alta	2	31-01-00
266/18	Mogi das Cruzes-SP	Média	1	31-01-02	28/18	Sorocaba-SP	Alta	1	31-17-06
331/18	Mogi das Cruzes-SP	Alta	0	31-09-02	29/18	Sorocaba-SP	Alta	-	31-17-06
37/18	Mogi-Mirim-SP	Alta	0	23-00-06	313/18	Taiúva-SP	Alta	-	31-00-02
115/18	Monte Alto-SP	Média	2	31-00-02	92/18	Taquaritinga-SP	Alta	-	31-17-06

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto EU-C	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Código Sexteto
103/18	Taquaritinga-SP	Alta	-	31-17-06					

^a Incidência de *B. lactucae* nos locais onde foram coletadas amostras foliares, classificada conforme a intensidade de esporulação na folha e número de plantas de alface e/ou serralha naturalmente infectadas, usando a escala adaptada de Mieslerová et al. (2013): Alta incidência, média incidência e baixa incidência.

^b Intensidade de produção de oósporo nos fragmentos foliares, avaliada usando a escala adaptada de Petrzalová e Lebeda (2003): 0 = ausência de oósporos, 1 = formação esparsa de oósporos, 2 = formação abundante de oósporos e 3 = formação muito abundante de oósporos. O resultado representativo da amostra é a nota mais frequente nas observações dos dez fragmentos analisados.

^c Isolados oriundos da coleção-NEOM.

-: não determinadoabela.

TABELA 2. Resposta de resistência/suscetibilidade de cultivares de alface diferenciadoras à *Bremia lactucae* e códigos sextetos EU-C, de 116 isolados coletados em 2015, 2016, 2017 e 2018, no Distrito Federal e nos municípios dos estados do Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo.

Green Towers	Dandie	R4T57D	UC Dm14	NunDm15	CGDm16	Colorado	FrRsal-1	Argelès	RYZ 2164	RYZ9104 ⁵⁷	Bedford	Balesta	Bartoli	Design	Kibrille	Nº de fatores de virulência ^b	Código sexteto
Gene <i>Dm</i> ou R-Fatores (<i>RF</i>)																	
0	3	4	14	15	16	18	Rsal-1	38	25	? ^a	?	?	?	?	?		
Valor no conjunto sexteto																	
0	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4		
+	+	(-)	-	+	-	-	+	-	-	(-)	-	-	(-)	-	-	5	09-01-00
+	+	+	+	(-)	+	-	-	(-)	-	-	(-)	-	-	+	(+)	6	23-00-06
+	+	+	+	+	+	-	-	(-)	-	-	(-)	-	-	-	-	5	31-00-00
+	+	+	+	+	+	-	(-)	-	-	(-)	(-)	-	(-)	+	(-)	6	31-00-02
+	+	+	(+)	(+)	+	-	-	(-)	-	(-)	-	-	-	+	+	7	31-00-06
+	+	+	+	+	+	-	(+)	(-)	-	(-)	-	-	(-)	(-)	(-)	6	31-01-00
+	+	+	+	+	+	-	(+)	(-)	-	(-)	(-)	-	(-)	(+)	(-)	7	31-01-02
(+)	+	+	+	(+)	(+)	-	(+)	(-)	-	-	(-)	-	-	(+)	(+)	8	31-01-06

Green Towers	Dandie	R4T57D	UC Dm14	NunDm15	CGDm16	Colorado	FrRsal-1	Argelès	RYZ 2164	RYZ9104 ⁵⁷	Bedford	Balesta	Bartoli	Design	Kibrille	Nº de fatores de virulência ^b	Código sexteto
Gene Dm ou R-Fatores (RF)																	
0	3	4	14	15	16	18	Rsal-1	38	25	? ^a	?	?	?	?	?		
Valor no conjunto sexteto																	
0	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4		
+	+	+	+	+	+	-	(-)	(-)	-	+	-	-	-	(+)	(-)	7	31-08-02
+	+	+	(+)	(+)	+	-	(+)	(-)	-	(+)	(-)	-	-	+	(-)	8	31-09-02
(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)	-	+	-	(-)	(+)	(-)	-	-	(+)	(+)	9	31-09-06
+	+	+	+	+	+	-	(-)	(-)	-	(-)	(+)	-	(-)	+	(-)	7	31-16-02
+	(+)	(+)	+	+	+	-	+	-	-	(-)	+	-	(-)	(+)	(+)	9	31-17-06
+	+	+	(+)	(+)	+	-	(-)	-	-	(+)	(+)	-	(-)	(+)	-	8	31-24-02
+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	(-)	(-)	-	-	-	(-)	4	50-01-00
(+)	+	+	-	-	+	(+)	-	-	-	-	(-)	-	-	(-)	-	5	51-00-00
+	+	+	-	-	+	(+)	(+)	-	-	-	(-)	-	-	(+)	(-)	7	51-01-02
+	+	+	-	(-)	+	+	+	(-)	+	(-)	-	-	-	(-)	-	7	51-05-00
+	+	+	-	-	+	(+)	(-)	-	-	(+)	-	-	-	-	-	6	51-08-00

Green Towers	Dandie	R4T57D	UC Dm14	NunDm15	CGDm16	Colorado	FrRsal-1	Argelès	RYZ 2164	RYZ9104 ⁵⁷	Bedford	Balesta	Bartoli	Design	Kibrille	Nº de fatores de virulência ^b	Código sexteto
Gene Dm ou R-Fatores (RF)																	
0	3	4	14	15	16	18	Rsal-1	38	25	? ^a	?	?	?	?	?		
Valor no conjunto sexteto																	
0	1	2	4	8	16	32	1	2	4	8	16	32	1	2	4		
+	+	+	-	-	+	(+)	(+)	(-)	-	(+)	-	-	-	(-)	-	7	51-09-00
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	(-)	-	7	63-00-00
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	(-)	(-)	(-)	-	-	(-)	8	63-01-00
+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	-	(-)	-	-	-	(+)	(-)	9	63-01-02
+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	+	(-)	(-)	-	(-)	+	(-)	10	63-05-02
+	+	+	+	(+)	(+)	+	-	-	-	(+)	-	-	(-)	+	+	9	63-08-02
+	+	+	+	(+)	(+)	+	-	-	-	(+)	-	-	(-)	+	+	9	63-08-06
+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	(-)	-	-	(+)	(-)	10	63-09-02

^a As linhagens que possuem “?” ainda não tiveram o gene claramente identificado, mas possuem fator de resistência (FR) confirmado na literatura (Parra et al. 2016).

^b 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.

No monitoramento dos isolados identificados durante o inverno de 2017 e de 2018, a frequência geral dos fenótipos de virulência foi calculada considerando a quantidade total de isolados coletados, no Distrito Federal e nos estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. No entanto, apenas os estados do Paraná e São Paulo, tiveram variação fenotípica com quantidade representativa de isolados para o cálculo de frequência por estado em 2017 e 2018. Os fenótipos de virulência mais frequentes identificados foram 31-00-02 (14%), 31-16-02 (12%), 31-24-02 (14%) e 31-01-02 (9%). Enquanto que em 2018, os comportamentos de virulência mais frequentes foram 31-00-02 e 31-01-02 com alta frequência como em 2017, porém o código 31-17-06 ocorreu em aproximadamente 10% em 2018. Os fenótipos de virulência correspondentes aos códigos sextetos 31-00-02 e 31-01-02 foram identificados em mais de um estado. Já os demais fenótipos de virulência ocorreram apenas em um estado.

Em 2017, no Distrito Federal, apenas uma amostra foi avaliada e o código sexteto encontrado foi 23-00-06. Em São Paulo, 18 fenótipos foram encontrados, sendo os mais frequentes os códigos 31-00-02, 31-24-02 e 31-16-02. No estado do Paraná, nove isolados foram avaliados, sendo todos diferentes, apresentando os códigos 31-00-06, 31-01-02, 31-01-06, 31-09-06, 31-16-02, 31-17-06, 31-24-02, 63-01-00 e 63-01-02 (Tabela 3).

Em 2018, um total de sete estados foram monitorados. Em São Paulo, 26 isolados foram coletados e 12 fenótipos foram encontrados, sendo os mais frequentes 31-00-02, 31-17-06, e 31-01-02. Dos seis isolados coletados no Rio Grande do Sul, apenas um fenotipo de virulência foi identificado. Neste mesmo ano, no estado do Rio de Janeiro, dois códigos sexteto foram observados nos isolados

amostrados, que corresponde aos valores 31-01-06 e 31-09-06. No estado do Paraná, dez isolados foram coletados e sete fenótipos de virulência foram verificados, sendo 31-01-06, 31-16-02, 31-17-06, 63-00-00, 63-01-00, 63-01-02 e 63-08-06 (Tabela 3). No Distrito Federal e nos estados de Goiás e Minas Gerais, apenas um isolado de cada localidade foi diferenciado e os códigos encontrados foram 23-00-06, 31-00-02 e 31-00-00, respectivamente.

Os isolados de *B. lactucae* avaliados apresentaram de quatro a dez fatores/genes de virulência, identificados conforme as reações de suscetibilidade + ou (+) dos genótipos de *Lactuca* spp. da série diferencial (Tabela 2). Os códigos sextetos que apresentam o máximo de fatores de virulência são 63-09-02 e 63-05-02. O número máximo de fatores de virulência identificados neste estudo, foram de 10 fatores. Além disso, cinco fenótipos de virulência foram identificados com nove fatores de virulência, correspondentes aos códigos sextetos 63-08-06, 63-08-02, 63-01-02, 31-17-06 e 31-09-06. No entanto, os fenótipos mais frequentes apresentaram de seis a oito fatores de virulência (Tabela 2).

TABELA 3. Frequência geral dos fenótipos de virulência identificados em 2017 e 2018, no Distrito Federal (DF) e nos estados do Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo (SP) e frequência dos fenótipos de virulência identificados por estado.

Código Sexteto ^a	Frequência por estado (%)						Frequência geral (%) ^b		Local
	SP		PR		Outros		2017	2018	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018			
							3,51	3,92	
23-00-06	2,13	3,85	-	-					Mogi-Mirim-SP, São José do Rio Preto-SP
					100 ^c	100 ^c			Brasília-DF
31-00-00		-		-		100 ^d	-	1,96	Fronteira-MG
							14,04	17,65	
31-00-02	17,02	30,77	-	-					Biritiba-Mirim-SP, Ibiúna-SP, Jaboticabal-SP, Monte Alto-SP, Salesópolis-SP, São José do Rio Preto-SP, Taiuva-SP
						100 ^e			Nova Gama-GO
31-00-06	-		11,11	-			1,75	-	Colombo-PR
31-01-00	4,26	3,85	-	-			3,51	1,96	Mogi das Cruzes-SP, Sorocaba-

Código Sexteto ^a	Frequência por estado (%)						Frequência geral (%) ^b		Local
	SP		PR		Outros		2017	2018	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018			
									SP
							8,77	17,65	
31-01-02	8,51	11,54	11,11	-		100 ^f			Bauru-SP, Ibiúna-SP, Itapira-SP, Mogi das Cruzes-SP, Piedade-SP Colombo-PR, Maquiné-RS
31-01-06	-		11,11	20,00			1,75	7,84	
						33,33 ^g			Colombo-PR Nova Friburgo-RJ
31-08-02	2,13	3,85	-	-	-	-	1,75	1,96	Biritiba-Mirim-SP
31-09-02	8,51	3,85	-	-	-	-	7,02	1,96	Itapira-SP, Marília-SP, Mogi das Cruzes-SP
31-09-06	-	-	11,11	-	-	-	1,75	7,84	
	-	-	-	-	-	66,67 ^g	-	-	Colombo-PR Nova Friburgo-RJ
					-	-	12,28	1,96	
31-16-02	12,77	-	11,11	10,00	-	-			Colombo-PR
							-	-	Jaboticabal-SP, Salesópolis-SP

Código Sexteto ^a	Frequência por estado (%)						Frequência geral (%) ^b		Local
	SP		PR		Outros		2017	2018	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018			
31-17-06	2,13	15,38	11,11	10,00	-	-	3,51	9,80	Sorocaba-SP, Taquaritinga-SP
					-	-	-	-	Colombo-PR
31-24-02	14,89	7,69	11,11	-	-	-	14,04	3,92	Bauru-SP, Ribeirão Preto-SP, Taquaritinga-SP Colombo-PR
51-00-00	2,13	-	-	-	-	-	1,75	-	Mogi das Cruzes-SP
51-05-00	-	3,85		-	-	-	-	1,96	Biritiba-Mirim-SP
51-01-02	2,13	-	-	-	-	-	1,75	-	Mogi das Cruzes-SP
51-05-00	2,13	-	-	-	-	-	1,75	-	Biritiba-Mirim-SP
51-08-00	2,13	-	-	-	-	-	1,75	-	Botucatu-SP
51-09-00	4,26	-	-	-	-	-	3,51	-	Mogi das Cruzes-SP
63-00-00	2,13	3,85	-	20,00	-	-	1,75	5,88	Mogi das Cruzes-SP, São Roque- SP
					-	-			São José dos Pinhais-PR
63-01-00	-	-	11,11	10,00	-	-	1,75	1,96	Colombo-PR
63-01-02	6,38	7,69			-	-	7,02	7,84	Botucatu-SP, Guariba-SP, Mogi

Código Sexteto ^a	Frequência por estado (%)						Frequência geral (%) ^b		Local
	SP		PR		Outros				
	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	
									das Cruzes-SP, São José do Rio Preto-SP
			11,11	20,00	-	-			Colombo-PR, São José dos Pinhais-PR
63-05-02	2,13	-	-	-	-	-	1,75	-	Ibiúna-SP
63-08-02	4,26	-	-	-	-	-	3,51	-	Botucatu-SP, Salesópolis-SP
63-08-06	-	-	-	10,00	-	-	-	1,96	São José dos Pinhais-PR
63-09-02	-	3,85	-	-	-	-	-	1,96	Botucatu-SP

^a Código Sexteto EU-C conforme “The International Bremia Evaluation Board (IBEB)” (ISF 2020).

^b Frequência geral calculada considerando o número total de isolados coletados no Distrito Federal e nos estados do Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo.

^c Isolados oriundos do DF em 2017 e em 2018.

^d Isolados oriundos de MG em 2018

^e Isolados oriundos do GO em 2018.

^f Isolados oriundos do RJ em 2018.

^g Isolados oriundos do RS em 2018.

Em todas as populações avaliadas, os fatores de virulência v3, v4, v14, v15, v16, v18, vRsal-1 e o correspondente a linhagem RYZ910457 foram identificados (Figura 2).

Além disso, quase todos os isolados avaliados compartilham v3, v4 e v16 em todos os estados avaliados. Os fatores de virulência que variaram dentre os estados amostrados foram v18 que foi alto no Paraná, vRsal-1 foi 100% no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, 60% no Paraná e 50% em São Paulo. O fator de virulência RYZ 910457 foi sempre baixo na maioria dos estados, mas no Rio de Janeiro teve uma incidência de aproximadamente 70%. O vDesign mostrou-se mais comum no estado do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul do que em São Paulo e Paraná. O vKibrille mostrou-se variável dentre os monitoramentos realizados nos estados de São Paulo e Paraná, no entanto no estado do Rio de Janeiro apareceu em 100% dos isolados. De maneira geral, os genes de virulência que ocorreram na população brasileira em menor frequência foram v18 e os correspondentes as linhagens RYZ 2164, RYZ 910457, Bedford, Design e Kibrille (Figura 2).

Dentre as populações de isolados de *B. lactucae* avaliadas, não houve fatores de virulência correspondentes aos de genes de resistência das cultivares *Dm38* da ‘Argelès’ e os fatores de resistência da ‘Balesta’ e ‘Bartoli’ (Figura 2). Essas cultivares mostram-se promissoras como fonte de resistência aos isolados de *B. lactucae* avaliados neste trabalho.

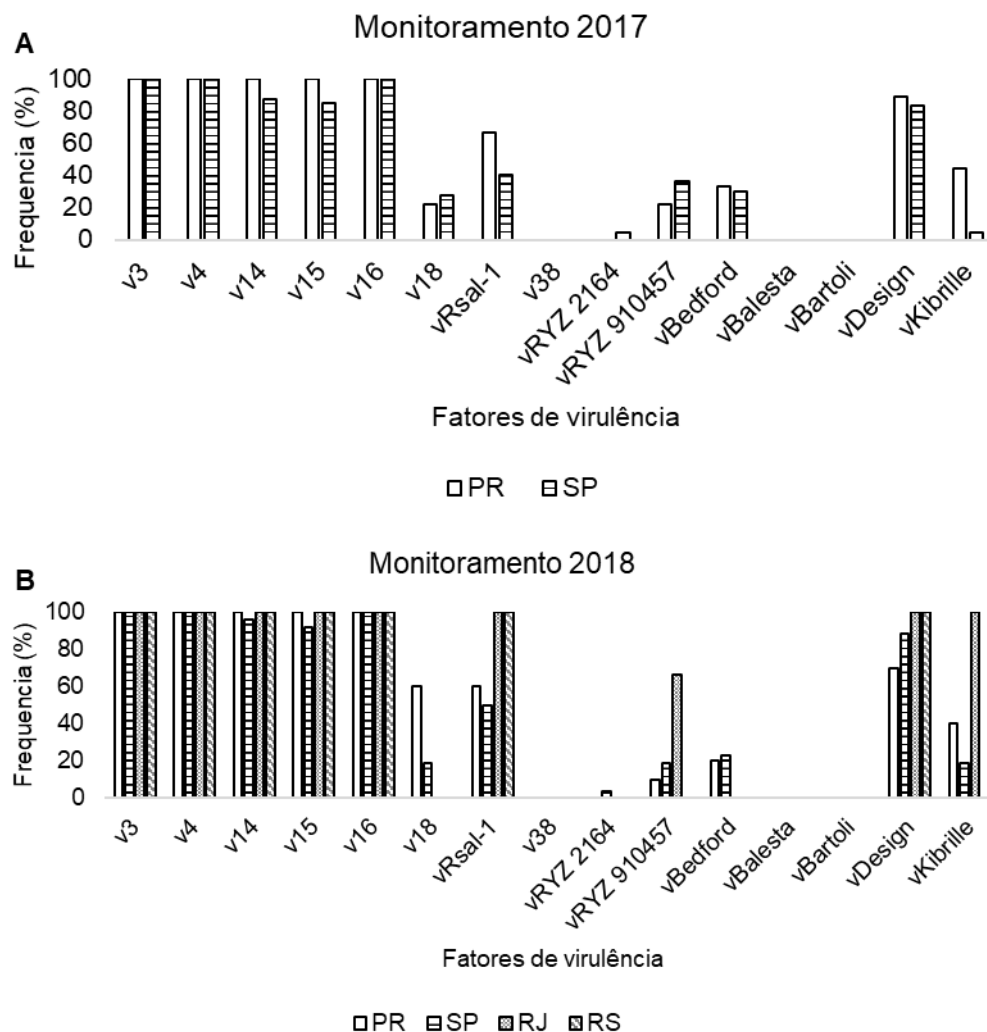


Figura 2. Frequência dos fatores de virulência observados em monitoramento os isolados de *Bremia lactucae* no ano de 2017 em **A** e no ano de 2018 em **B**.

Os valores de complexidade de virulência por isolado (C_i) calculado para todos os estados foram semelhantes entre os monitoramentos de 2017 e 2018.

Já no cálculo de C_i para cada estado, em 2017, apenas os estados do Paraná e São Paulo, tiveram quantidade representativa de isolados para o cálculo de C_i , sendo o estado de São Paulo ($C_i=6,98$) menos complexo que o estado do Paraná

($C_i = 7,78$). Enquanto, que em 2018, apenas os estados do Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo, tiveram quantidade representativa de isolados para o cálculo de (C_i), sendo que o estado do Rio de Janeiro ($C_i = 8,67$) apresentou maior complexidade, enquanto os demais estados amostrados apresentaram valores semelhantes, variando de 7 a 7,6 (Tabela 4). Os cálculos foram realizados apenas para os estados que apresentaram quantidade representativa de total de isolados coletados.

Os fenótipos de virulência identificados (C_f) foram semelhantes entre os monitoramentos de 2017 e 2018, quando considerado todos os estados. No entanto em 2017, o estado do São Paulo ($C_f = 6,78$) foi menos complexo que Paraná ($C_f = 7,78$). Em 2018, o Rio de Janeiro ($C_f = 8,50$) foi o estado que apresentou maior complexidade enquanto os demais estados amostrados apresentaram valores semelhantes, variando de 7 a 7,71 (Tabela 4).

O índice de Gleason (I_g) mostrou diferentes níveis de diversidade nos isolados amostrados nos anos de 2017 e 2018. De maneira geral, em 2017 ($I_g = 5,19$), a população teve mais diversidade do que em 2018 ($I_g = 4,32$). O estado que apresentou maior diversidade em ambos os monitoramentos foi o estado de São Paulo, apresentando I_g de 4,42 em 2017 e I_g de 3,38 em 2018. O estado do Paraná foi segundo maior estado no ranking de diversidade populacional com I_g de 3,64 em 2017 e I_g de 2,61 em 2018 (Tabela 4).

TABELA 4. Caracterização da diversidade e complexidade dos fenótipos de virulência de *Bremia lactucae*, obtidos nos estados do Paraná (2017 e 2018), São Paulo (2017 e 2018), Rio de Janeiro (2018) e Rio Grande do Sul (2018) e o total geral de isolados amostrados.

Ano	Estado	N _i ^a	N _f ^a	I _g ^a	C _i ^a	C _f ^a
2017	Paraná	9	9	3,64	7,78	7,78
	São Paulo	47	18	4,42	6,98	6,78
	Geral Estados ^b	57	22	5,19	7,09	6,95
2018	Paraná	10	7	2,61	7,60	7,71
	Rio de Janeiro	6	2	0,56	8,67	8,50
	Rio Grande do Sul	6	1	0,00	7,00	7,00
	São Paulo	26	12	3,38	7,12	7,17
	Geral Estados ^b	51	18	4,32	7,57	7,33

^a 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).

^b calculada considerando o número total de isolados coletados no Distrito Federal (DF) e nos estados do Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo (SP).

4.2 Ocorrência natural de oósporo em plantas de alface e serralha

A presença de oósporo foi investigada em 91 amostras foliares naturalmente infectadas por *B. lactucae*. Verificou-se reprodução sexuada em condições de campo, pois a presença do oósporo foi detectada em 94% das amostras coletadas nas áreas de cultivo comerciais de alface (Tabela 5). A presença de oósporo foi registrada em 72 amostras foliares de alface e em 14 amostras foliares de serralha. Apenas uma amostra foliar de serralha não apresentou oósporo (Tabela 5).

TABELA 5. Relação de amostras foliares de alface (*Lactuca sativa*) e de serralha (*Lactuca serriola*) utilizados no estudo para identificação de presença oósporo. Incidência do míldio e a ocorrência natural de oósporo nas áreas comerciais amostradas em 2017 e 2018, no Distrito Federal (DF) e nos estados de Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo (SP).

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Hospedeiro	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Hospedeiro
253/17	Planaltina, Brasília-DF	Média	2	<i>L. sativa</i>					
257/17	Garibaldi-RS	Alta	2	<i>L. sativa</i>	265/17	Terra de Areia-RS	Alta	2	<i>L. sativa</i>
260/17	Maquiné-RS	Alta	3	<i>L. sativa</i>					
60/17	Biritiba-Mirim-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>	15/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
219/17	Botucatu-SP	Alta	3	<i>L. sativa</i>	16/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
22/17	Ibiúna-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>	17/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>
23/17	Ibiúna-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>	18/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>
24/17	Ibiúna-SP	Alta	0	<i>L. sativa</i>	19/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>
140/17	Itapira-SP	Alta	3	<i>L. sativa</i>	20/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	0	<i>L. sativa</i>
142/17	Itapira-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>	21/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>
43/17	Jaboticabal-SP	Baixa	2	<i>L. sativa</i>	149/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
45/17	Jaboticabal-SP	Baixa	3	<i>L. sativa</i>	180/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
47/17	Jaboticabal-SP	Baixa	0	<i>L. sativa</i>	181/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
50/17	Jaboticabal-SP	Baixa	2	<i>L. sativa</i>	182/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>
233/17	Jaboticabal-SP	Baixa	3	<i>L. sativa</i>	186/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
218/17	Marília-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>	188/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>
1/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. serriola</i>	189/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>
2/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. serriola</i>	193/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
3/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. serriola</i>	194/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Hospedeiro	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Hospedeiro
4/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	0	<i>L. serriola</i>	199/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
5/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. serriola</i>	200/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
6/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. serriola</i>	202/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. serriola</i>
7/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. serriola</i>	208/17	Mogi das Cruzes-SP	Média	1	<i>L. serriola</i>
8/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	3	<i>L. serriola</i>	289/17	Monte Alto-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
9/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. serriola</i>	213/17	Ribeirão Preto-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>
10/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. serriola</i>	256/17	Ribeirão Preto-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
11/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. serriola</i>	147/17	Salesopolis-SP	Alta	3	<i>L. sativa</i>
12/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. serriola</i>	112/17	São José do Rio Preto-SP	Baixa	0	<i>L. sativa</i>
13/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	2	<i>L. serriola</i>	251/17	Taquaritinga-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
14/17	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>	252/17	Taquaritinga-SP	Alta	3	<i>L. sativa</i>
44/18	Boa Esperança-MG	Alta	1	<i>L. sativa</i>	01/18	Fronteira-MG	Alta	2	<i>L. sativa</i>
45/18	Boa Esperança-MG	Alta	1	<i>L. sativa</i>	47/18	Santana da Vargem-MG	Média	3	<i>L. sativa</i>
46/18	Boa Esperança-MG	Alta	1	<i>L. sativa</i>					
179/18	Colombo-PR	Baixa	1	<i>L. sativa</i>	174/18	São Jose dos Pinhais-PR	Alta	1	<i>L. sativa</i>
180/18	Colombo-PR	Baixa	1	<i>L. sativa</i>	177/18	São Jose dos Pinhais-PR	Alta	1	<i>L. sativa</i>
181/18	Colombo-PR	Alta	2	<i>L. sativa</i>	178/18	São Jose dos Pinhais-PR	Alta	1	<i>L. sativa</i>
183/18	Colombo-PR	Alta	1	<i>L. sativa</i>					
202/18	Nova Friburgo-RJ	Baixa	2	<i>L. sativa</i>					
66/18	Maquiné-RS	Alta	3	<i>L. sativa</i>	70/18	Maquiné-RS	Alta	1	<i>L. sativa</i>
68/18	Maquiné-RS	Alta	2	<i>L. sativa</i>	72/18	Maquiné-RS	Alta	1	<i>L. sativa</i>
69/18	Maquiné-RS	Alta	1	<i>L. sativa</i>					
262/18	Biritiba-Mirim-SP	Média	1	<i>L. sativa</i>	117/18	Monte Alto-SP	Média	1	<i>L. sativa</i>
48/18	Botucatu-SP	Média	1	<i>L. sativa</i>	118/18	Monte Alto-SP	Média	1	<i>L. sativa</i>

Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Hospedeiro	Isolado/Ano	Local	Míldio ^a	Oósporo ^b	Hospedeiro
24/18	Ibiúna-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>	119/18	Monte Alto-SP	Média	1	<i>L. sativa</i>
41/18	Itapira-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>	268/18	Pitangueiras-SP	Média	1	<i>L. sativa</i>
42/18	Itapira-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>	63/18	Ribeirão Preto-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>
159/18	Matão-SP	Média	2	<i>L. sativa</i>	27/18	Sorocaba-SP	Alta	2	<i>L. sativa</i>
266/18	Mogi das Cruzes-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>	28/18	Sorocaba-SP	Alta	1	<i>L. sativa</i>
115/18	Monte Alto-SP	Média	2	<i>L. sativa</i>					

^a Incidência de *B. lactucae* classificados por meio de adaptação do método descrito por Mieslerová et al. (2013), em incidência baixa, moderada ou alta, conforme esporulação na folha e número de plantas de alface e/ou serralha naturalmente infectadas nos locais onde foram coletadas amostras foliares em áreas comerciais de produção de alface.

^b Intensidade de produção de oósporo nos fragmentos foliares, avaliada usando a escala adaptada de Petrzalová e Lebeda (2003): 0 = ausência de oósporos, 1 = formação esparsa de oósporos, 2 = formação abundante de oósporos e 3 = formação muito abundante de oósporos. Foi considerada a nota mais frequente nas observações dos dez fragmentos analisados, como resultado representativo da amostra, -: não determinado.

A formação de oósporo com intensidade abundante foi mais comum em áreas com alta incidência do míldio, uma vez que a alta incidência de esporulação favorece a formação de oósporo. A ocorrência natural de oósporo foi registrada em 25 municípios localizados, no Distrito Federal e nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo, indicando que a reprodução sexual não está restrita a limites geográficos e possui ampla distribuição de ocorrência (Tabela 2).

Dois métodos foram utilizados na descoloração do tecido foliar para a visualização dos oósporos, imersão em álcool ou em água destilada. Ambos os métodos se mostraram viáveis. A descoloração por imersão em álcool foi mais rápida, porém os tecidos ficaram mais quebradiços, prejudicando as observações microscópicas. Embora o processo utilizando água não promova nenhuma alteração que inviabilize ou diminua a eficiência da avaliação microscópica, verificou-se necessidade de maior tempo para descoloração. Observou-se que os tecidos foliares da serralha requerem maior tempo para descoloração e a coloração do tecido dificulta a visualização do oósporo no microscópio.

A maioria dos isolados ($n=41$) mostraram ser capazes de formar oósporos quando autocruzados (Figura 3), demonstrando serem autoférteis, com predominância do sistema de reprodução homotalismo secundário. Apenas o isolado B05 apresentou comportamento heterotático (autoestéril). A compatibilidade sexual dos isolados foi determinada por meio da intensidade de formação de oósporos no autocruzamento. Dentre os isolados avaliados, 14 foram identificados como $B_1 > B_2$ (B_1 predominante), 19 como $B_1 < B_2$ (B_2 predominante), oito como $B_1 = B_2$ e um como B_2 (Figura 3). Os isolados autoférteis, ou seja, aqueles que quando autocruzados

formam oósporos, são classificados como homotáticos. Dentre os homotáticos, aqueles que produzem mais oósporos quando cruzados com B_1 do que com B_2 são classificados como B_2 predominante ($B_1 < B_2$); se mais oósporos forem verificados quando o cruzamento for com B_2 do que com B_1 , os isolados são B_1 predominante ($B_1 > B_2$); se o número de oósporos forem os mesmos em cruzamento com B_1 e B_2 , os isolados serão $B_1 = B_2$. Apenas um isolado foi classificado como autoestéril, que quando autocruzado não formou oósporo (intensidade igual a 0), sendo classificado como heterotático, podendo ser apenas B_1 ou apenas B_2 .

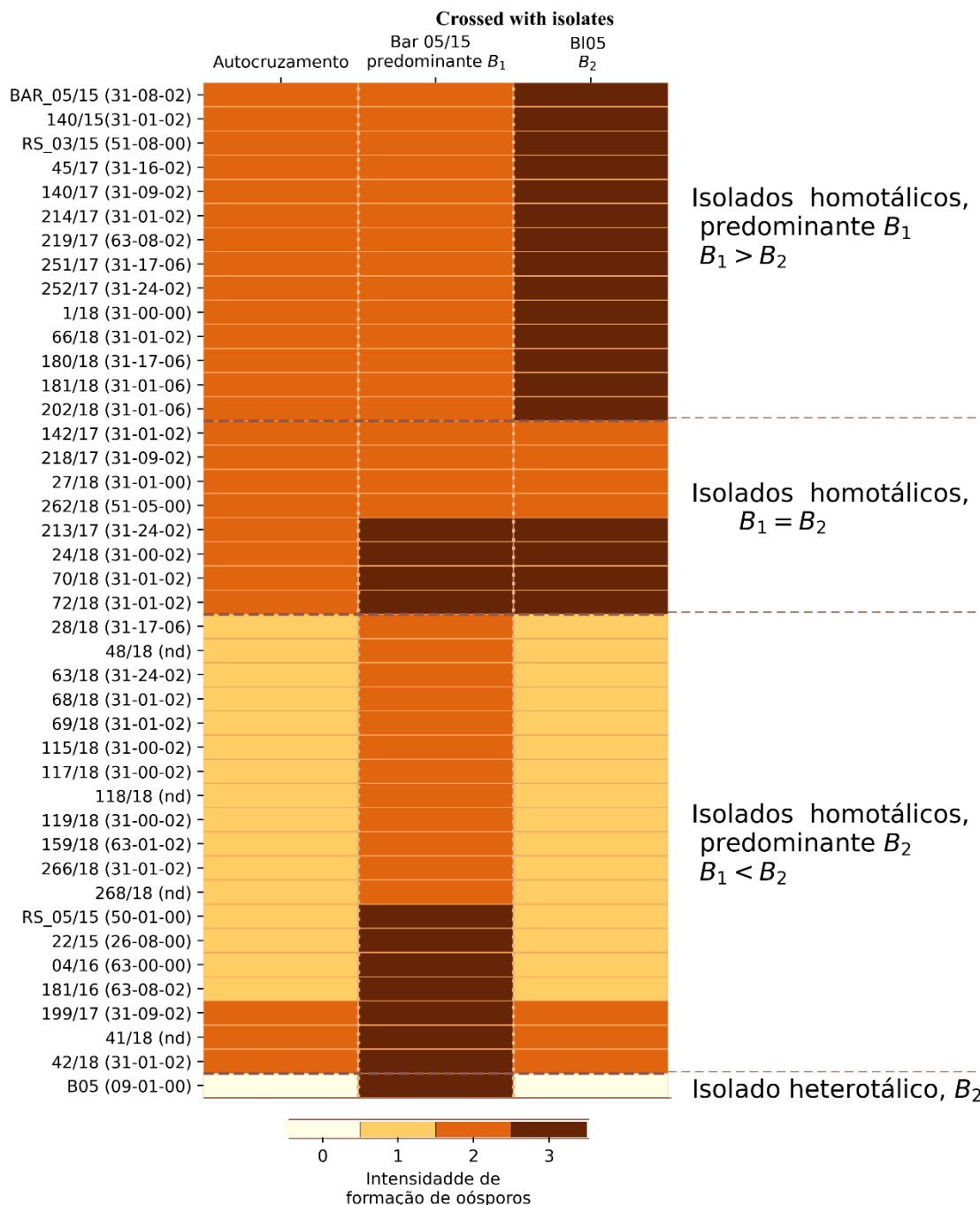


Figura 3. Representação gráfica (heatmap) da composição do sistema de acasalamento e a compatibilidade sexual dos isolados de *Bremia lactucae*, com os seus respectivos fenótipos de virulência do código sexteto EU-C. As cores apresentam a intensidade de formação de oósporo resultante dos cruzamentos dos isolados, em autocruzamento, com isolados de compatibilidade sexual do tipo B_1 predominante e B_2 . nd: Não determinado código sexteto EU-C.

5 DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro monitoramento de isolados de *Bremia lactucae* com maior abrangência territorial de coletas no Brasil, com evidências de ocorrência de

reprodução sexual em serralha e alface, bem como, determinação da compatibilidade sexual de isolados de *B. lactucae*. Ainda, este é o primeiro estudo registrando alta incidência de isolados autoférteis com compatibilidade sexual B₁ predominante, uma vez que trabalhos anteriores reportaram isolados autoférteis com compatibilidade sexual limitada ao tipo B₂ predominante (Micheltore e Ingram, 1982). Além disso, os resultados deste estudo, melhoram a compreensão dos fenótipos de virulência vigentes e a distribuição dos fatores de virulência nas populações brasileiras de *B. lactucae*. Essas informações são essenciais para programas de melhoramento genético de alface visando resistência ao míldio (van Hese et al., 2016). Embora vários fenótipos de virulência tenham sido identificados no monitoramento de isolados coletados em 2017 e 2018, apenas quatro desses fenótipos foram predominantes 31-00-02, 31-16-02, 31-24-02 e 31-01-02. 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 (Vargas et al., 2012; Marin et al., 2019), portanto esses fatores não devem ser recomendados como fontes para o melhoramento visando à resistência ao míldio da alface. Os isolados apresentaram alta frequência de gene virulência correspondente a cultivar Design (Figura 2). O gene de resistência presente na 'Design' não deve ser indicado como fonte de resistência a isolados brasileiros de *B. lactucae*.

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. Os genes/*FR* que conferem resistência a todos os isolados brasileiros de *B. lactucae* testados pertencem as cultivares Argelès (*Dm38*), Balesta (*FR*) e Bartoli (*FR*).

Isolados brasileiros de *B. lactucae* tem alta capacidade reprodutiva e capacidade de recombinação genética (Figura 3). A alta taxa de reprodução sexuada verificada neste estudo pode explicar a diversidade fenotípica de comportamentos de *B. lactucae* no Brasil. Esta afirmação se sustenta pela verificação de ocorrência natural de oósporos em campos de produção, pelo fato que os isolados apresentam sistema de acasalamento do tipo homotalismo secundário e por ocorrer os dois tipos de compatibilidade sexual (B_1 e B_2).

A variabilidade em *B. lactucae* pode ser explicada de várias formas. Variação somática e heterocariótica ou poliploidia, como relatadas em populações de *B. lactucae* dos EUA e de outros países (Hulbert e Michelmores, 1985; Michelmores e Wong, 2008). 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 (Michelmores e Ingram, 1980).

Comumente, quando se verifica homotalismo, há predominância do tipo B_2 (Michelmores e Ingram, 1982). Em estudos análogos não se detectou B_1 predominante. Todavia, a população brasileira apresenta o tipo B_1 predominante,

além de B₂ predominante e B₁=B₂. Isolados que apresentam compatibilidade sexual do tipo B₁ produzem oósporos mais abundantemente, portanto a ocorrência da reprodução sexual entre indivíduos B₁, favorece a presença de maiores quantidades de oósporos em campo e isso implica em aumento nos riscos de ocorrência de infecções primárias. Além disso, as raças mais frequentes no Brasil (SPBI:01 e SPBI:03) são do tipo B₁ predominante, o que pode justificar a prevalência destas raças ao longo do tempo, pois são compatíveis sexuadamente com isolados de ambos tipos de compatibilidade sexual e com alta formação de oósporos resultante dos cruzamentos o que favorece a chance de germinação de indivíduos e a manutenção destas raças ao longo do tempo. Ainda, outra raça-chave (SPBI:02) na população brasileira é do tipo B₂ predominante, “mating type” oposto e compatível para cruzamento sexual, possibilitando novas recombinações e surgimento de novos fenótipos de virulência raças ao longo do tempo.

Atenção especial foi dada a alguns estados-chave que apresentam importância econômica destacada, sendo São Paulo e Paraná em 2017 e 2018 e Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro em 2018. Ocorrência natural de oósporos foi verificada em todos os estados amostrados, sugerindo reprodução sexuada na população brasileira de *B. lactucae*. No entanto, 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. Principalmente quando desencadeada por fatores estressantes,

como hospedeiros resistentes (novas cultivares) ou fungicidas, induzindo a via sexual e gerando variabilidade genética. Em condições adequadas de desenvolvimento do fitopatógeno, a via assexual seria preferencial, sem que ocorra variabilidade.

Apesar de ter bastante isolados com alta capacidade de reprodução sexual e com alto índice de isolados autoférteis e os dois tipos de “mating type” ocorrendo nos mesmos locais e evidência de oósporos ocorrendo nos campos de produção, os níveis de complexidade de fenótipos não foram tão altos. Isso indica que a reprodução sexual possa estar ocorrendo dentro da mesma população. Se a recombinação estivesse ocorrendo em nível interpopulacional, por exemplo, entre indivíduos com composição genética divergente, a variabilidade genética resultante seria bem mais significativa. Todavia, a capacidade da população brasileira de *B. lactucae* reproduzir-se sexuadamente representa risco potencial caso os cruzamentos passem a ocorrer com outras populações com estrutura genética diferente. Este fato pode explicar a quebra de resistência comumente verificada em cultivares comerciais de alface.

São Paulo é o maior produtor nacional de alface e teve a maior variabilidade fenotípica observada, sendo amplamente monitorado quanto a ocorrência de fenótipos do fitopatógeno, mas este é o primeiro relato de ocorrência de reprodução sexual. 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 fenótipos de virulência 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 do fitopatógeno e

favorecendo a prevalência de poucos fenótipos de virulência. Entretanto, nos últimos anos, a oferta de cultivares resistentes a *B. lactucae* tem aumentado no Brasil e o uso contínuo de novas cultivares pode provocar a evolução mais rápida do fitopatógeno por desencadear a reprodução sexual. O mesmo cenário pode ser esperado para as demais localidades, à medida que cultivares resistentes são adotadas.

Embora a maioria dos isolados avaliados apresentem “mating type” B₂ predominante, isto é 46%, pouco mais de 34% são B₁ predominante. Isolados homotáticos com “mating type” B₁ predominante produzem mais oósporos e tem maior probabilidade de recombinação em condições de campo. O oósporo é fonte de inóculo primário e permanece viável por longo período (Morgan 1978). Assim, por produzirem mais oósporos, isolados homotáticos com “mating type” B₁ predominante representam maior risco de infecção primária.

Comumente, ao colher a alface, realiza-se a prática de toalete, que consiste em eliminar as folhas mais externas que apresentem padrão não comercial. A eliminação de resíduos de alface fresca no solo em áreas de produção contribui para as infecções primárias de *B. lactucae* (Fletcher, 1976). A redução de restos culturais provenientes do toalete das plantas comerciais de alface, assim como, o controle de plantas daninhas (como a serralha), são práticas importantes de manejo para o controle de fonte de inóculo primário por mais de quatro anos (Morgan, 1978). A presença de oósporo nas lesões pode ser observada por até 12 meses em amostras armazenadas em água destilada e até seis meses em amostras imersas em álcool, ambas armazenadas a 7°C. Em um novo plantio de alface, e se as condições

ambientais forem favoráveis, estes oósporos podem germinar e reinstalar o patossistema (Morgan, 1978; Blok, 1981).

A serralha pertence à mesma família botânica da alface e é uma planta invasora comumente encontrada nos locais de cultivo. A presença de oósporo em serralha é frequentemente relatada (Petrzelová e Lebeda, 2003), sendo possível fonte de inóculo primário. O manejo de plantas invasoras limitou a disponibilidade de plantas de serralha incluídas neste estudo, mas, mesmo assim, boa parte do material foliar de serralha amostrado apresentou abundante presença de oósporo. Este resultado corrobora a importância do controle de serralha para manejo eficiente do míldio da alface. Ainda, há possibilidade de recombinação entre os isolados de alface e de serralha (Lebeda e Blok, 1990), aumentando a possibilidade de maior variabilidade genética de *B. lactucae*.

As populações de *B. lactucae* dos estados de São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul compartilham seis dos 15 fatores de virulência avaliados. Foram encontrados 27 fenótipos de virulência e os códigos sextetos 31-00-02, 31-16-02, 31-24-02 e 31-01-02 foram mais frequentes. Embora haja evidências de ocorrência da reprodução sexual no campo, bem como a presença de oosoporo em folhas de serralha e de alface, assim como a alta incidência de isolados com homotalismo secundário e a presença simultânea de “mating types” opostos (B_1 e B_2), no entanto houve a 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 (*Dm* 38), Balesta e Bartoli podem ser recomendados como fontes de resistência para o melhoramento genético visando

resistência ao míldio da alface para as populações brasileiras avaliadas neste estudo.

6 CONCLUSÕES

Ocorre reprodução sexual dos isolados nas populações brasileiras de *B. lactucae*, com formação de oósporos em plantas de alface e de serralha. Os dois tipos de “mating type” B₁ e B₂ estão presentes nas populações brasileiras de *B. lactucae* e os isolados apresentam homotalismo secundários, com alta incidência de compatibilidade sexual B₂ predominante. A variabilidade fenotípica dos isolados brasileiros é resultante da flexibilidade do fitopatógeno em se reproduzir sexuadamente e assexuadamente.

7 REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2020: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativo, 2020. p. 110-112.

AIA 2017: Análises e Indicadores do Agronegócio. Valor da Produção Agropecuária Paulista por Região: estimativa final 2016. v. 12, n. 5.

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

ANVISA (2016) **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Relatório de Atividades de 2013 a 2015. p.78. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acesso em: 24 de jun. 2020

Braz, LT, Dalpian, T, Pissardi, MA (2007). Identification of races of *Bremia lactucae* in São Paulo, Brazil. **Acta Horticulturae** 760:317-321.

Braz, LT, Diniz, GMM, Castoldi, R, Nunes, RC, Galatti, FS, Camargo, M, Marin, MV, Dalpian, T, Souza, JO, Gomes, RF, Rabelo, H. O (2016) Monitoring races of *Bremia lactucae* in the State of São Paulo from 2003 to 2012. **Acta Horticulturae** 1127:325–

329.

Blok, I. (1981) A procedure to infect lettuce seedlings with oospores of *Bremia lactucae*. Netherlands J. **Plant Pathol.** 87:159–162.

Carvalho, C, Kist, BB (2017) Anuário brasileiro de hortaliças. **Gazeta Santa Cruz**.56 p.

Crandall, SG, Rahman, A, Quesada-Ocampo, LM, Martin, FN, Bilodeau, GJ, and Milest, TD (2018) Advances in diagnostics of downy mildews: Lessons learned from other oomycetes and future challenges. **Plant Disease** 102:265–275.

Crute, IR; Dixon, GR (1981) Downy mildew diseases caused by the genus *Bremia* Regel. **The downy mildews**, p. 421-460.

Crute, I. R (1992) The role of resistance breeding in the integrated control of downy mildew (*Bremia lactucae*) in protected lettuce. In: Breeding for **Disease Resistance**. Springer Netherlands, p. 95-102.

Fall, ML, Van Der Heyden, H, Carisse, O (2016) A quantitative dynamic simulation of *bremia lactucae* airborne conidia concentration above a lettuce canopy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3.

FAOSTAT (2021) Lettuce and chicory crop production. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Division. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV/visualize>>. Acesso em: 04 jun. 2021.

Fletcher, JT (1976) *Bremia lactucae*, oospores, sporangial dissemination and control. **Ann. Appl. Biol.** 84:294–298.

Fletcher, K, Gil, J, Bertier, L. D, Kenefick, A, Wood, K. J, Zhang, L, Reyes-Chin-Wo, S, Cavanaugh, K, Tsuchida, C, Wong, J, Micheltore, R. (2019) Genomic signatures of heterokaryosis in the oomycete pathogen *Bremia lactucae*. **Nat. Commun.** 10:2645.

Franco, C.A e Marin, M, et al., (2021) Monitoring virulence of *Bremia lactucae* as a breeding tool against lettuce downy mildew from south and southwest Brazilian regions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 159, n. 1, p. 179-189.

Gisi, U, Sierotzki, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, n. 1, p. 157-167, 2008.

Gustafsson, M, Arhammer, M, Gustavsson, I (1983) Linkage Between Virulence Genes, Compatibility Types and Sexual Recombination in the Swedish Population of *Bremia lactucae*. **J. Phytopathol.** 108:341–354.

Gustafsson, M, Liljeroth, E, Gustafsson, I (1985). Pathogenic variation and sexual reproduction in Swedish populations of *Bremia lactucae*. **Theoretical and Applied Genetics** 70:643–649.

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

IBEB 2017: International *Bremia* Evaluation Board. Disponível em: <<http://www.worldseed.org/our-work/plant-health/other-initiatives/ibeb/>>. Acesso em: 10 mai. 2020

IEA 2017: Instituto de Economia Agrícola. **Área e produção dos principais produtos da agropecuária.** Disponível em: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1>. Acesso em: 10 mai. 2020

Ilott, TW, Durgan, ME, Michelmore, RW (1987) Genetics of virulence in California populations of *Bremia lactucae* (Lettuce Downy Mildew). **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 10, p. 1381-1386.

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

Krause-Sakate, R, Pavan, MA, Moura, MF, Kurozawa, C (2016). Doenças da Alface. Cap 6. p.33. In: AMORIM, L, REZENDE, J.A.M, BERGAMIM FILHO A, CAMARGO, L.E.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia** Vol.2 - 5ª edição.

Lebeda, A, Blok, I (1990) Sexual compatibility types of *Bremia lactucae* isolates originating from *Lactuca serriola*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**. 96:51–54.

Lebeda, A, Petrželová, I (2010) Screening for resistance to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In: MIRANDA, M, LEBEDA, A. (Ed.). **Mass screening techniques for selecting crops resistant to disease**, Vienna: IAEA, p. 245–256

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**, v. 122, n. 1, p. 71-89.

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

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.

J. Plant Pathol.

Michelmore, RW, Iltott, TW, Hulbert, SH, Farrara, BF (1988) The downy mildews. **Genetics of Plant Pathogenic Fungi**, v. 6, p. 53-79.

Michelmore, R, Ochoa, O, WONG, J (2008) *Bremia lactucae* and lettuce downy mildew. **Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions, and Research Tools**, p. 241-262.

Michelmore, RW, Crute, I R (1982) A method for determining the virulence phenotype of *Bremia lactucae* isolates. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 79:542–546.

Michelmore, RW, Ingram, DS (1980). Heterothallism in *Bremia lactucae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 75:47–56.

Michelmore, RW, Ingram, DS (1981). Recovery of progeny following sexual reproduction of *Bremia lactucae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 77:131–137.

Michelmore, RW, Ingram, DS (1982) Secondary homothallism in *Bremia lactucae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 78:1–9.

Michelmore, R, Wong, J (2008) Classical and molecular genetics of *Bremia lactucae*, cause of lettuce downy mildew. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122:19–30.

Mieslerová, B, Lebeda, A, Petrželová, I, Korbelová, P (2013). Incidence of lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) and powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum*) in natural populations of prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Plant Prot. Sci.* 49.

Morgan, W. M. (1978) Germination of *Bremia lactucae* oospores. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 71:337–340.

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.

Parra, L, Simko, I, Michelmore, RW, (2021). Identification of Major Quantitative Trait Loci Controlling Field Resistance to Downy Mildew in Cultivated Lettuce (*Lactuca sativa*). **Phytopathology**. 111:541-547.

Petrželová, I, Lebeda, A (2003) Distribution of compatibility types and occurrence of sexual reproduction in natural populations of *Bremia lactucae* on wild *Lactuca serriola* plants. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**. 38:43–52.

Petrželová, I, Lebeda, A (2004a) Occurrence of *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. **Journal of Phytopathology**.152:391–398.

Petrželová, I, Lebeda, A (2004b) Temporal and spatial variation in virulence of natural populations of *Bremia lactucae* occurring on *Lactuca serriola*. **DEVELOPMENTS IN PLANT PATHOLOGY**, p. 141-164.

Sala, FC, Costa, P (2016) MELHORAMENTO DE ALFACE. In: MELHORAMENTO DE HORTALIÇAS ed.Carlos Nick, Aluízio Borém.ed.UFV. Viçosa: ISBN: 9788572695510. P.95-127.

Silva, MC, Moreira, MM, Silva, LRL (2017) Alface. Hortifruti Brasil. **São Paulo**, n.168.p.30.

Silva, RR, Gomes, L. AA, Monteiro, AB, Maluf, WR, Carvalho Filho, JLS, Massaroto, JA (2008) Linhagens de alface-crespa para o verão resistentes ao *Meloidogyne javanica* e ao vírus mosaico-da-alface. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v.43, n.10, p. 1347-1356.

Schettini, TL, Michelmore, R (1991) Insensitivity to Metalaxyl in California Populations of *Bremia lactucae* and Resistance of California Lettuce Cultivars to Downy Mildew. *Phytopathology*. 81:64.

Subbarao, KV, Davis, RM, Gilbertson, RL, Raid, RN (2017) Downy Mildew. In *Compendium of Lettuce Diseases and Pests, Second Edition*, eds. K. V. Subbarao, R. M. Davis, R. L. Gilbertson, RN Raid. The American **Phytopathological Society**, p. 32–34.

Tobar-Tosse, D. E, Candido, S, Marin, MV, Panizi, RDC, Carlos, J, Braz, LT (2017). Estado de São Paulo. :55–57.

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, De 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. **Eur. J. Plant Pathol.** 144:431–441.

Vargas, PF. Túlio, FA, Andrade, MAP (2012). Identificação de raças de *Bremia lactucae* de alface no estado de Minas Gerais. **Ciência ET Praxis**. 5:11-14.

Vieira, BS, Barreto, RW (2006) First record of *Bremia lactucae* infecting *Sonchus oleraceus* and *Sonchus asper* in Brazil and its infectivity to lettuce. **Journal of Phytopathology**.154:84–87.

Yuen, JE, Lorbeer, JW (1987) Natural and Experimental Production of Oospores of *Bremia lactucae* in Lettuce in New York. **Plant Disease** 71:63–64.

Yuri, JE, Resende, GM, Mota, JH, Souza, R. J, Rodrigues Júnior, JC (2004) Comportamento de cultivares e linhagens de alface americana em Santana da Vargem (MG), nas condições de inverno. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 322-325.