



Caracterização da população de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary em regiões produtoras de batata (*Solanum tuberosum* L.) no Brasil

Samantha Zanotta

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Área de Concentração: Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Ricardo Harakava

Co-orientador (a): Dr. Jesus Guerino Tôfoli

**São Paulo
2019**

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio**

**Caracterização da população de *Phytophthora infestans* (Mont) de
Bary em regiões produtoras de batata (*Solanum tuberosum* L.) no
Brasil**

Samantha Zanotta

Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio. Área de
concentração: Segurança Alimentar e Sanidade
no Agroecossistema

São Paulo
2019

Eu **Samantha Zanotta**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Zanotta, Samantha.

Caracterização da população de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary em regiões produtoras de batata (*Solanum tuberosum* L.) no Brasil. / Samantha Zanotta. - São Paulo, 2019.

124 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2019T.S2014

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Ricardo Harakava.

Versão do título para o inglês: Characterization of the population of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary in potato producing regions (*Solanum tuberosum* L.) in Brazil.

1. Requeima 2. Bataticultura 3. Autofértil 4. Microsatélite 5. Fungicidas
Zanotta, Samantha II. Harakava, Ricardo III. Instituto Biológico (São Paulo)
IV. Título.

IB/Bibi/2019/014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Samantha Zanotta

Título: Caracterização da população de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary em regiões produtoras de batata (*Solanum tuberosum* L.) no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 30/7/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Harakawa Instituição: Instituto Biológico
Julgamento: Aprovada Assinatura: Ricardo Harakawa

Prof. Dr. Flávia R.A. Patrício Instituição: Instituto Biológico
Julgamento: Aprovada Assinatura: Flávia R.A. Patrício

Prof. Dr. EDUARDO FEICHTENBERGER Instituição: Instituto Biológico
Julgamento: APROVADA Assinatura: [Assinatura]

Prof. Dr. ALTON REIS Instituição: EMBRAPA
Julgamento: APROVADA Assinatura: Alton Reis

Prof. Dr. LEONARDO PIRES BOAVA Instituição: UNAR
Julgamento: APROVADA Assinatura: [Assinatura]

**Aos meus pais Glória e Carlos,
por tamanha dedicação a minha
formação pessoal e profissional,
pelo amor a mim dedicado e por
me proporcionarem paz na alma
e felicidade na vida.**

**Ao meu irmão Brunno, por todo
amor e apoio incondicional.**

**Ao meu sobrinho Enrico, que
trouxe muito mais alegria e me
fez conhecer um amor que antes
eu não sabia que podia existir.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo agradeço a Deus, por ter me dado a oportunidade de concretizar este trabalho mesmo com todos os desafios.

Aos meus pais, Carlos e Glória, por sempre me proverem de ensinamentos para a vida e para todas as questões em meus momentos mais difíceis, sem que, para isso, exigissem nada em troca. Pelo amor incondicional, orações, confiança, apoio e exemplo de vida a seguir.

Ao meu irmão, Brunno, pela atenção e carinho dedicado a minha pessoa, tanto nos momentos comemorativos como nos tumultuados. Sempre desenvolveu a função de irmão mais velho, aquele que protege, ampara e, às vezes, briga. Tenho uma admiração imensa por você!

Ao meu sobrinho Enrico Bassoi Zanotta, que mesmo pequeno, e sem saber, me trouxe força e o maior e melhor apoio, num momento tão importante da minha vida. A Titia te ama demais!

Ao Dr. Ricardo Harakava, por me aceitar como orientada nessa aventura e desafio que foi esse doutorado. Pelas oportunidades de aprendizado que foram e continuarão a ser de valor inestimável para a continuidade da minha carreira como cientista, pesquisadora e, quem sabe um dia, como professora. Pela colaboração, paciência e seus conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho, além da amizade formada e apoio em todos os momentos.

Ao Dr. Jesus Guerido Tofoli, pela confiança, pela paciência e por prontamente me ajudar sempre que o procurei. Eu aprendi muito com você.

Ao Dr. Fernando Javier Sanhueza Salas por me trazer à bataticultura. Esse universo maravilhoso onde nada é monótono. Pela confiança e por prontamente me ajudar sempre que o procurei.

A Dra. Marta Helena Vechiato Maziero, por ter aberto as portas do Instituto Biológico de São Paulo, confiando na minha competência. Hoje acima de tudo agradeço principalmente pela sua amizade e seu apoio incondicional sempre.

A Ieda Mascarenhas Louzeiro Terçariol, a Dra. Eliana Borges Rivas, a MSc. Josiane Takassaki Ferrari, ao MSc. Ricardo Domingues e ao mestrando Guilherme Augusto Cabral Silva pela amizade e por tornarem mais alegre e agradável o nosso ambiente de trabalho ao longo desses anos.

Agradeço pela confiança e livre acesso às dependências do Laboratório de Diagnóstico Fitopatológico, ao Laboratório de Doenças Fúngicas em Horticultura e a Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada – Instituto Biológico de São Paulo, assim como a utilização dos reagentes e equipamentos necessários para a conclusão deste trabalho. Agradeço muito pelo reconhecimento da minha dedicação ao trabalho e confiança a minha pessoa.

A Dra. Ana María Florencia Lucca , Dra. Andrea Fabiana Puebla e María Florencia Servici, do Instituto de Biotecnología Agropecuária - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária (INTA), por aceitarem a colaboração neste projeto, pelos ensinamentos e auxílio nas análises de microssatélites (SSR).

Ao Dr. Eduardo Seite Gomide Mizubuti, pela colaboração, e por sempre estar disposto a compartilhar seu conhecimento.

A Associação Brasileira de Batata (ABBA) e ao Sr. Natalino Yassushi Shimoyama (diretor executivo) que enxergaram um potencial neste estudo e foram um dos maiores apoiadores. Este apoio foi primordial para a divulgação deste por todas as regiões brasileiras produtoras de batata.

Aos inúmeros bataticultores, que sofreram com essa doença no campo, e viram um grande potencial neste projeto e auxiliaram este se colocando a disposição para o envio de amostras sempre que necessário.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, pela oportunidade de vivenciar o trabalho de um instituto com tanta história e de grande importância nacional certamente ajudou na minha formação como profissional.

A Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli, a Dra. Flávia Rodrigues Alves Patrício, a Dra. Marise Cagnin Martins Parisi, ao Dr. Ailton Reis, ao Dr. Eduardo Feichtenberg e ao Dr. Leonardo Pires Boava pelas colaborações importantíssimas, melhorando a qualidade e valorizando o trabalho final.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

Agradeço aos professores do curso de Pós Graduação do IB, amigos e colegas pelo agradável convívio e companheirismo.

A todos os meus amigos que me apoiaram, me corrigiram, me aturaram, souberam entender a importância deste momento do trabalho que por tantas vezes justificou a minha ausência e me fizeram saber que, antes de tudo, a vida sem eles não

teria graça alguma. Sem duvida, este, que até o momento é o capítulo mais louco da minha vida, não poderia de deixar de ser escrito sem a presença de vocês.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, quer me criticando, quer incentivando, gostaria de manifestar meus sinceros agradecimentos.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

RESUMO

ZANOTTA, Samantha. **Caracterização da população de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary em regiões produtoras de batata (*Solanum tuberosum* L.) no Brasil.** 2019. 124f. Tese (Doutorado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

A requeima, causada por *Phytophthora infestans* (Oomycota, Stramenopila), é uma das doenças mais destrutivas na bataticultura mundial, podendo comprometer a produção em poucos dias. Este trabalho tem como principal objetivo a caracterização da população de *Phytophthora infestans* nas regiões produtoras de batata no Brasil e, para isso, teve como objetivos específicos: i) obter isolados de *P. infestans* a partir de plantas de batata com sintomas de requeima oriundas de diferentes regiões produtoras do país; ii) identificar e monitorar o tipo de reprodução de isolados de *P. infestans* existentes no Brasil; iii) caracterizar os isolados do patógeno quanto ao grupo de compatibilidade; iv) caracterizar os isolados do patógeno quanto ao genótipo empregando-se marcadores moleculares tipo SSR; v) avaliar a sensibilidade dos genótipos de *P. infestans* a quatro ingredientes ativos com diferentes mecanismos de ação, utilizados para o controle químico do patógeno. Para isso, material botânico (folhas, hastes, caules, frutos e tubérculos) manifestando sintomatologia típica de requeima, provenientes de diversos locais produtores de batata pelo Brasil, foi coletado. Destas coletas foram realizadas as análises quanto ao tipo de reprodução presente e o isolamento do patógeno para estudo da população de *P. infestans*. Reprodução sexuada provenientes de isolados autoférteis de *P. infestans* foi detectada em três Estados no Brasil, São Paulo (Divinolândia e Itobi), Paraná (Campo do Tenente) e Minas Gerais (Serra do Salitre). O grupo de compatibilidade predominante neste estudo foi o A1. Na identificação quanto ao grupo de compatibilidade dos isolados coletados, a correlação entre os resultados do pareamento “in vitro” e os obtidos molecularmente foi de 100% no presente estudo. Ao realizar a caracterização molecular por microssatélite, utilizando os 12 pares de marcadores microssatélites estabelecido para o monitoramento das populações de *P. infestans* ao redor do mundo, forma identificadas duas linhagens de *P. infestans* foram identificadas, a linhagem 2_A1 e a linhagem US-1, sendo a linhagem 2_A1, a mais

abundante. A sensibilidade de dezessete isolados de *P. infestans* coletados pelo Brasil aos princípios ativos ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe, que possuem mecanismos de ação diferentes, pelo método de microtitulação colorimétrica, não tendo sido observado perda de sensibilidade aos princípios pela maioria dos isolados avaliados.

Palavras-chave: requeima, bataticultura, autofértil, microssatélites, fungicidas, sensibilidade.

ABSTRACT

ZANOTTA, Samantha. **Characterization of population of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary potato-producing areas (*Solanum tuberosum* L.) in Brazil. 2019.** 124s. Doctoral Thesis of the Postgraduate Program in Health, Food and Environmental Security in Agribusiness, Instituto Biológico.

Late blight, caused by *Phytophthora infestans* (Oomycota, Stramenopila), is one of the most destructive diseases in world potato production, and may compromise production in a few days. The main objective of this work is to characterize the population of *Phytophthora infestans* in potato-producing regions in Brazil and, for this purpose, its specific objectives were: i) to obtain isolates of *P. infestans* from potato plants with late blight symptoms originating from different producing regions of the country; ii) identify and monitor the type of reproduction of *P. infestans* isolates in Brazil; iii) characterize the pathogen isolates according to the compatibility group; iv) characterize the pathogen isolates according to genotype using SSR-type molecular markers; v) evaluate the sensitivity of *P. infestans* genotypes to four active ingredients with different mechanisms of action, used for chemical control of the pathogen. Plant material (leaves, stems, stems, fruits and tubers) showing typical symptoms of late blight from various potato-producing sites in Brazil was collected. From these collections, analyzes were performed regarding the type of reproduction and the pathogen was isolated to study *P. infestans* population. Sexual reproduction by *P. infestans* self-fertile isolates was detected in three states in Brazil: São Paulo (Divinolândia and Itobi), Paraná (Campo do Tenente) and Minas Gerais (Serra do Salitre). The predominant compatibility group in this study was A1. Regarding determination of the compatibility group of the isolates, correlation between results of in vitro pairing and molecular tests was 100% in the present study. Monitoring of *P. infestans* population using twelve microsatellite markers resulted in the detection of two *P. infestans* lineages: 2_A1 and US-1, the former being the most abundant. Sensitivity of seventeen *P. infestans* isolates to the active ingredients ciazofamide, chlorotalonil, dimetomorph and propamocarb was measured by the colorimetric microtiter method. Significant loss of sensitivity to the principles was not observed for the isolates evaluated.

Key - words: late blight, potato production, self fertile, microsatellite markers, fungicides, sensitivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura n°	Descrição	Página
01	Ilustração de uma planta de batata. Fonte: INTERNATIONAL POTATO CENTER, 2019 – Adaptado.....	27
02	Distribuição (em porcentagem - %) por região, da produção de batata no Brasil. Fonte: IBGE, 2019.....	30
03	Sintomas de Requeima em batata. A) sintoma de requeima na par adaxial da folha; B) esporulação do patógeno (<i>P. infestans</i>) na par abaxial da folha; C) sintoma de requeima em haste; D) fruto de bata sadio e com sintomas de requeima; E) Sintoma de requeima e tubérculos de batata externamente e (F) internamente.....	32
04	Locais de coletas de amostras de batata com sintomas de requeima: A) Divinolândia/SP (março/2015), B) Itararé (julho/2015), C) Pilar do Sul (março/2015), D) Divinolândia/SP (abril/2015).....	46
05	Formulário desenvolvido para o envio de amostra de requeima ao Instituto Biológico.....	47
06	Esquema da diluição seriada dos princípios ativos de diferentes fungicidas, para a obtenção das concentrações utilizadas.....	56
07	Esquema da microplaca de poliestireno estéril com 96 poços. Nas colunas são distribuídos isolados, e nas linhas as diluições dos princípios ativos.....	57
08	Origem das amostras de material botânico com sintomas típicos de requeima (<i>Phytophthora infestans</i>) coletadas por região no Brasil.....	60
09	Estruturas reprodutivas sexuais de isolado de <i>Phytophythora infestans</i> do presente estudo. A, B e D - gametângios (anterídio, oogônio) e oósporo; C - oósporo; . Fonte: A - Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli, B, C e D – Samantha Zanotta.....	61
10	Estruturas reprodutivas assexuais de isolado de <i>Phytophthora infestans</i> do presente estudo. A a D – esporângios.....	62
11.a	Sequências de fragmentos de DNA de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> pertencentes ao grupo de compatibilidade A1 e A2,	73

amplificados com iniciadores W16-1 e W16-2.....	
11.b Polimorfismo encontrado em eletroferograma de um isolado pertencente ao grupo de compatibilidade A1. A seta indica a sobreposição de picos das bases C e T.	73
12 Perfil de um isolado de <i>Phytophthora infestans</i> obtido com os 12 pares de marcadores microssatélites.....	75
13 Árvore de distância genética construída pelo método de Neighbor Joining com os dados de microssatélites dos isolados de <i>Phytophthora infestans</i> do presente estudo e de outras linhagens mundiais.....	84
14 Gráfico da rede de extensão mínima (minimum spanning network) construído com os dados de microssatélites de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> do presente estudo e de outras linhagens mundiais.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela n°	Descrição	Página
01	Ranking dos 24 maiores países produtores de batata, no ano de 2017, classificados por produção (ton) e por rendimento (kg/ha).....	29
02	Iniciadores utilizados para identificação dos grupos de compatibilidade dos isolados de <i>Phytophthora infestans</i>	49
03	Descrição dos iniciadores para amplificação dos 12 lócus polimórficos microssatélites usados na caracterização de isolados de <i>Phytophthora infestans</i>	53
04	Descrição dos iniciadores para amplificação dos 12 lócus polimórficos microssatélites usados na caracterização de isolados de <i>Phytophthora infestans</i>	55
05	Identificação, procedência e identificação do grupo de compatibilidade dos isolados de <i>Phytophthora infestans</i> coletados no presente estudo.....	64
06	Número de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> pertencentes a cada Grupo de Compatibilidade quando avaliados pelo método de pareamento “ <i>in vitro</i> ” e pelos métodos moleculares.....	72
07	Número de alelos existentes mundialmente para <i>Phytophthora infestans</i> e número de alelos detectado por lócus nos isolados presente estudo.....	75
08	Frequência dos alelos no estudo molecular por SSR nos isolados de <i>Phytophthora infestans</i> do presente estudo.....	77
09	Variações encontradas entre os perfis polimórficos obtidos com os marcadores microssatélites (SSR) dos isolados <i>Phytophthora infestans</i> do presente estudo.....	79
10	Comparação dos perfis polimórficos das variações 04 e 11 deste trabalho, com os perfis polimórficos encontrados por Li (2012).	82
11	Perfis polimórficos dos isolados brasileiros estudados por Saville e colaboradores (2016), pertencentes à linhagem BR-1.....	86
12	Comparação dos perfis polimórficos dos isolados autoférteis	86

encontrados neste estudo, com os perfis polimórficos dos isolados autoférteis encontrados por Casa-Coila e colaboradores (2017).....	
13 Médias das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações de ciazofamida para isolados de <i>Phytophthora infestans</i> e EC50 obtido por isolado.....	88
14 Médias das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações de clorotalonil para isolados de <i>Phytophthora infestans</i> e EC50 obtido por isolado.....	88
15 Médias das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações de dimetomorfe para isolados de <i>Phytophthora infestans</i> e EC50 obtido por isolado.....	89
16 Médias das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações de propamocarbe para isolados de <i>Phytophthora infestans</i> e EC50 obtido por isolado.....	89
17 Valores de EC50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os 17 isolados de <i>Phytophthora infestans</i> para os fungicidas ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe.....	92
18 Valores de EC50 para os 17 isolados subdivididos por variações dos genótipos, para ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe.....	93
19 Valores de EC50 máximo e mínimo entre as variações de <i>Phytophthora infestans</i> para ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

Abreviatura / Siglas / Símbolos	Definição
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
°	Graus
’	Minutos
”	Segundos
µm	Micrometro
µg	Microgramas
Abr	Abril
AF	Autofértil
Ago	Agosto
Al	Alelo
BOD	Incubadora com regulagem de temperatura
CABI	Center for Agriculture and Biosciences International
CIA	Clorofórmio Álcool Isoamílico
CIP	International Potato Center
Cm	Centímetros
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CV%	Coeficiente de variação em %
Dez	Dezembro
DMS	Diferença mínima significativa
EC ₅₀	Concentração do fungicida capaz de reduzir 50% do crescimento do patógeno
EUA	Estados Unidos da América
Fev	Fevereiro
GPS	Global Positioning System
ha	Hectare
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization of The United Nations

IB	Instituto Biológico
Jan	Janeiro
Jul	Julho
Jun	Junho
Kg	Quilograma
LDFH	Laboratório de Doenças Fúngicas em Horticultura
LDF	Laboratório de Diagnóstico Fitopatológico
M	Metros
Mai	Maio
Mar	Março
MG	Minas Gerais
ml	Mililitro
Nov	Novembro
Out	Outubro
<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Ppm	Partes por Milhão
PR	Paraná
RPM	Rotações por minuto
RR	Roraima
RS	Rio Grande do Sul
S	South / Sul
Set	Setembro
SP	São Paulo
SSR	Simple Sequence Repeats / Sequencias Simples Repetidas
Ton	Tonelada
W	West / Oeste

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	24
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	26
3.1. A Bataticultura.....	27
3.2. A Requeima.....	31
3.3. O patógeno – <i>Phytophthora infestans</i>	32
3.4. Marcadores Moleculares Microssatélites.....	38
3.5. Manejo da Requeima.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1. Coleta de material infectado.....	46
4.2. Monitoramento do tipo de reprodução.....	47
4.2.1. Indução à produção de estruturas de reprodução.....	47
4.3. Isolamento de <i>Phytophthora infestans</i>	48
4.4. Extração de DNA.....	48
4.5. Identificação do grupo de compatibilidade.....	49
4.5.1. Amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	49
4.5.2. Sequenciamento.....	49
4.5.3. Pareamento “ <i>in vitro</i> ”.....	50
4.6. Caracterização molecular por microssatélite (SSR).....	51
4.7. Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> de 17 isolados de <i>Phytophthora infestans</i> pertencentes a seis variações genotípicas, aos fungicidas, ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. Coleta de material infectado.....	60

5.2.	Monitoramento do tipo de reprodução.....	60
5.3.	Identificação do grupo de compatibilidade.....	63
5.4.	Caracterização molecular por microssatélite (SSR).....	74
5.5.	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> de 17 isolados de <i>Phytophthora infestans</i> pertencentes a seis variações genóticas, aos fungicidas, ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe.....	87
6.	CONCLUSÕES.....	96
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
8.	ANEXOS.....	121

1. INTRODUÇÃO

A bataticultura possui grande importância econômica e social no cenário agrícola brasileiro. Hoje, a cadeia produtiva da batata assume características empresariais bem definidas, com avanços tecnológicos constantes e gerenciamento avançado de todo o processo produtivo (TOFOLI; MELO; DOMINGUES, 2012).

Vários são os fatores que limitam a produção de batata, dentre eles podem ser destacadas as pragas e doenças, as quais se estabelecem nas lavouras quando as condições ambientais são favoráveis. A principal doença da cultura da batata é a requeima, também conhecida como mela, causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, que pode comprometer todo o campo de produção em poucos dias, sendo uma doença importante em todo o mundo (KAMOUN; HUITEMA; VLEESHOUWERS, 1999; FRY; MIZUBUTI, 1998; LOPES; SANTOS, 1994; HENFLING, 1987; STEVENSON, 1983).

A requeima ganhou destaque mundial entre os anos 1845-1849, ao causar a escassez alimentar na Irlanda, que resultou na fome, morte e migração de grande parte da população irlandesa daquela época. Cerca de 1 milhão de pessoas morreram e outros milhões emigraram devido ao seu efeito devastador (TURNER, 2005; SALAMAN; BURTON, 1985). Esta doença até hoje ainda é considerada uma grande ameaça para a segurança alimentar mundial. No Brasil, a ocorrência inicial da requeima sobre a cultura da batata foi atribuída a uma introdução de batata-semente infectada, proveniente da Europa em 1898 (NIEDERHAUSER, 1991).

Com o seu rápido desenvolvimento e alto potencial destrutivo, a requeima é uma ameaça econômica muito grave na grande maioria dos sistemas de produção de batata, podendo ocorrer em qualquer fase da cultura, afetando folhas, pecíolos, hastes, frutos e tubérculos. Seu controle é feito através de aplicações de fungicidas, tanto que em locais onde existe alta pressão da doença, uma variedade de batata suscetível pode exigir aplicações de fungicida a cada 3 ou 5 dias. No Brasil, as aplicações de fungicidas são em geral excessivas, devido a serem realizadas sem considerar a interação entre aspectos biológicos do ciclo de vida do patógeno e as condições meteorológicas prevalentes durante o ciclo da cultura. A doença é altamente dependente das condições ambientais, tornando sua epidemia variável no espaço e no tempo. Como consequência, pode haverem causado aumento no custo de produção e no impacto ambiental, devido à contaminação da água e do solo por agroquímicos (BOSCO et al., 2010; GARCÍA, 2005; HIJMANS; FORBES; WALKER, 2000; NAZARENO et al., 1999; ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Devido à importância da requeima como fator limitante à cultura da batata, diferentes métodos de controle integrado têm sido usados, como por exemplo, a utilização de tubérculos-sementes sadios, cultivares menos suscetíveis, retirada e destruição de plantas voluntárias e controle químico (BOSCO et al., 2010; TAYLOR et al., 2003).

Considera-se que todas as cultivares comerciais são suscetíveis a alguma linhagem do patógeno (genótipo), pois *P. infestans*, por meio da reprodução sexuada, é capaz de rapidamente formar novas raças fisiológicas. Por esta razão, o método mais empregado para o controle da requeima ainda é o controle químico (BOSCO et al., 2010; KIRK et al., 2005).

O genoma de *P. infestans* foi sequenciado em 2009 por Haas e colaboradores, sendo caracterizado pela presença de grande número de transposons (elementos genéticos móveis) e regiões hipervariáveis abundantes, explicando, a nível genético, as grandes variações de fenótipo, agressividade e adaptabilidade observadas para esse patógeno no decorrer da sua evolução (GUO et al., 2009; KAMOUN, 2003). Por estas características, este patógeno tem sido capaz de se adaptar a diferentes climas e latitudes ao longo da história, com o aparecimento de novos genótipos nas duas últimas décadas, e que a tornam mais difícil de controlar (FRY, GOODWIN, 1997).

A compreensão da dinâmica da variabilidade genética dos fitopatógenos se faz necessária para o entendimento de como as populações evoluem e as implicações desse processo na durabilidade de cultivares resistente e no controle da doença. Esta compreensão pode ser traduzida na duração da efetividade da adoção de uma cultivar resistente ou de um fungicida específico para o manejo da doença (OLIVEIRA, 2010; MILGROOM; PEEVER, 2003). Segundo Lees e colaboradores (2006), diversos trabalhos já foram desenvolvidos para caracterizar o grupo de compatibilidade e a resistência a fungicidas das populações de *P. infestans*, no entanto, os estudos relacionados à diversidade genética eram limitados pela sensibilidade dos marcadores genéticos utilizados no passado. Este aspecto incentivou a adoção de novos marcadores nas análises de biologia de populações de fitopatógenos, como o caso dos microssatélites, também conhecidos como Sequências Simples Repetidas (SSR) (COOKE; LEES, 2004).

Os marcadores moleculares têm sido uma ferramenta de grande importância na caracterização de populações de fungos fitopatogênicos, permitindo avaliar os níveis de diversidade genética, as relações filogenéticas intra e interespecíficas, além da

identificação de raças e patótipos (CERQUEIRA, 2014; DAVIS; KUBISIAK; MILGROOM, 2005; HENSEN; OBERPRIELER; WESCHE, 2005; JAMES; LIU; VILGALYS, 2004; BELABID et al., 2004; LEAL-BERTIOLI, 1998).

O acompanhamento das variações na população de *P. infestans* ao longo dos anos permite melhor embasamento no desenvolvimento e na adoção de práticas de manejo da requeima, especialmente no auxílio ao desenvolvimento de cultivares resistentes a requeima e melhorará a eficiência do controle químico.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como principal objetivo a caracterização da população de *Phytophthora infestans* nas regiões produtoras de batata no Brasil e, para isso, teve como objetivos específicos:

- Obter isolados de *P. infestans* a partir de plantas de batata com sintomas de requeima oriundas de diferentes regiões produtoras do país
- Identificar e monitorar o tipo de reprodução de isolados de *P. infestans* existentes no Brasil;
- Caracterizar os isolados do patógeno quanto ao grupo de compatibilidade;
- Caracterizar os isolados do patógeno quanto ao genótipo empregando-se marcadores moleculares tipo SSR;
- Avaliar a sensibilidade dos genótipos de *P. infestans* a quatro ingredientes ativos com diferentes mecanismos de ação, utilizados para o controle químico do patógeno.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A Bataticultura

A batata, *Solanum tuberosum* L. (Figura 1), é uma planta dicotiledônea, pertencente à família Solanaceae, gênero *Solanum* (FORTES; PEREIRA, 2003). É originária dos Andes (América do Sul) e possui mais de 4.000 variedades comestíveis cultivadas em mais de 100 países (INTERNATIONAL POTATO CENTER, 2019).

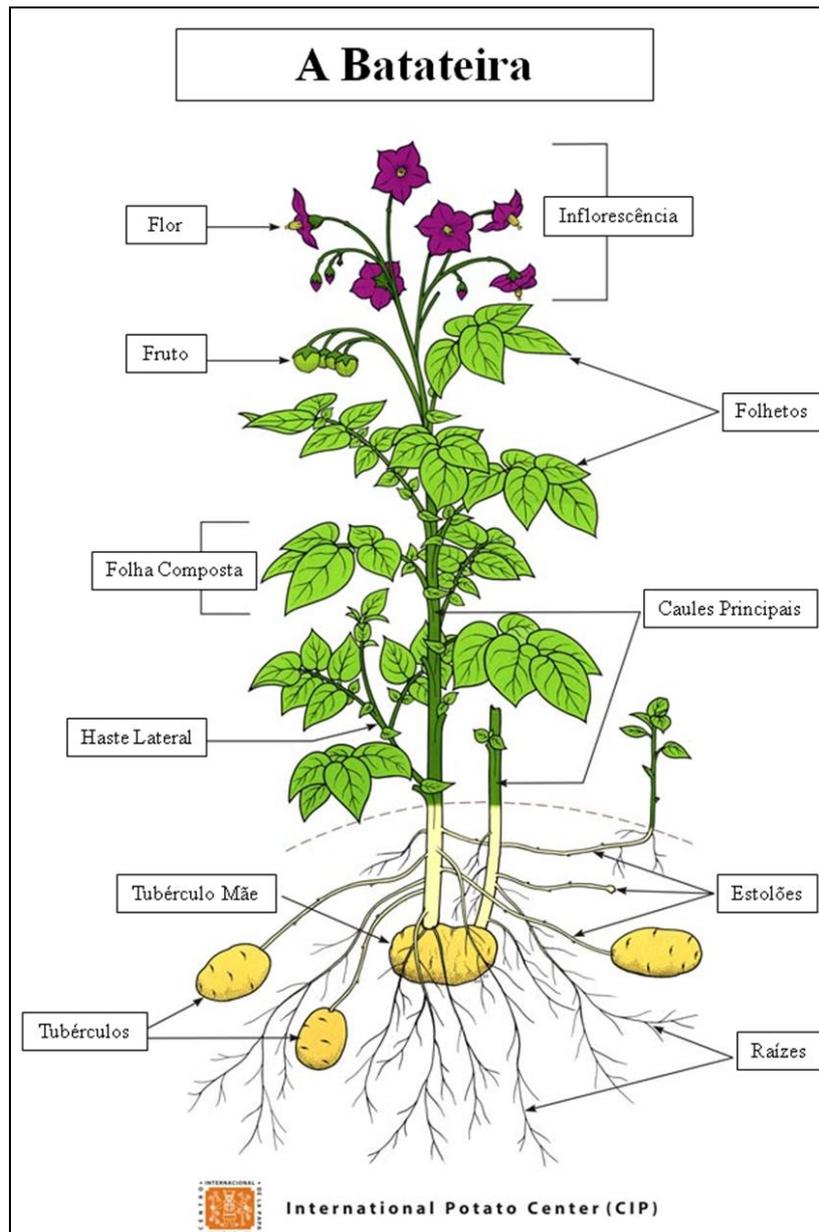


Figura 1. Ilustração de uma planta de batata. Fonte: INTERNATIONAL POTATO CENTER, 2019 – Adaptado.

Esta espécie vegetal é de grande importância mundial devido ao elevado valor nutricional, pois é rica em carboidratos, fósforo e vitaminas do complexo B, que

caracterizam o seu potencial na segurança alimentar. Trata-se da terceira maior fonte de alimento para o ser humano, atrás apenas do arroz e do trigo (INTERNATIONAL POTATO CENTER, 2019).

Mundialmente, em 2017, a produção total de batata foi de 288.190.674,00 toneladas em 19.302.642,00 hectares. O continente que mais produz é a Ásia (50,40%), seguida pela Europa (31,37%), África (6,44%), América do Norte (6,30%), América do Sul (4,37%), América Central (0,71%) e Oceania (0,41%) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2019).

Dentre os 24 países que mais produziram batata em 2017 (Tabela 1), a liderança ficou com a China (99.205.580 ton), seguida pela Índia (48.605.000 ton), Rússia (29.589.976 ton), Ucrânia (22.208.220 ton) e Estados Unidos da América (20.017.350 ton), enquanto o Brasil ocupou a 20ª posição (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2019).

Na América do Sul (Tabela 1), o Brasil se destacou como o segundo maior produtor de batata com 3.656.846,00 ton, ficando atrás somente do Peru que produziu 4.776.294,00 ton (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2019).

Tabela 1. Ranking dos 24 maiores países produtores de batata, no ano de 2017, classificados por produção (ton) e por rendimento (kg/ha).

País	Área		Ranking	Rendimento (kg/ha)	Ranking
	Plantada (ha)	Produção (ton)			
China	5767481	99205580	1°	172009	19°
Índia	2179000	48605000	2°	223061	15°
Rússia	1889208	29589976	3°	156626	21°
Ucrânia	1323200	22208220	4°	167837	20°
EUA	415010	20017350	5°	482334	1°
Alemanha	250500	11720000	6°	467864	3°
Bangladesh	499725	10215957	7°	204432	16°
Holanda	160791	7391881	8°	459720	4°
França	173486	7342203	9°	423216	6°
Belarus	275997	6414755	10°	232421	13°
Reino Unido	146000	6218000	11°	425890	5°
Irã	160902	5102342	12°	317109	8°
Turquia	142851	4800000	13°	336014	7°
Peru	310400	4776294	14°	153875	22°
Argélia	148692	4606403	15°	309795	10°
Bélgica	92855	4416665	16°	475652	2°
Canadá	342218	4410829	17°	128889	24°
Egito	163939	4325478	18°	263848	12°
Paquistão	183961	4142399	19°	225178	14°
Brasil	118030	3656846	20°	309823	9°
Cazaquistão	182895	3551114	21°	194161	17°
Romênia	171390	3116910	22°	181861	18°
Nepal	194115	2691037	23°	138631	23°
Polônia	329323	917133	24°	278503	11°

Fonte: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2019.

No entanto, quando se analisa o rendimento (kg/ha), no ano de 2017, o panorama muda completamente (Tabela 1), com os Estados Unidos (482.334 kg/ha), Bélgica (475.652 kg/ha), Alemanha (467.864 kg/ha), Holanda (459.720 kg/ha) e Reino Unido (425.890 kg/ha), liderando o ranking. A China cai para a 19ª colocação com um rendimento de 172.009 kg/ha, enquanto o Brasil sobe para a 9ª, com 309.823 kg/ha (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2019).

Segundo dados do IBGE (2019), no Brasil foram registrados 126.999,00 hectares de área colhida de batata, com uma produção de 3.900.737,00 toneladas em quatro regiões: Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste (Figura 2). As regiões Sudeste e

Sul juntas são responsáveis por quase 90% da produção nacional de batata, com destaque para os Estados de Minas Gerais (1.150.220,00 ton), São Paulo (936.302,00 ton), Paraná (790.885,00 ton) e Rio Grande do Sul (406.736,00 ton), que respectivamente, são os maiores produtores (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA - IBGE, 2019).

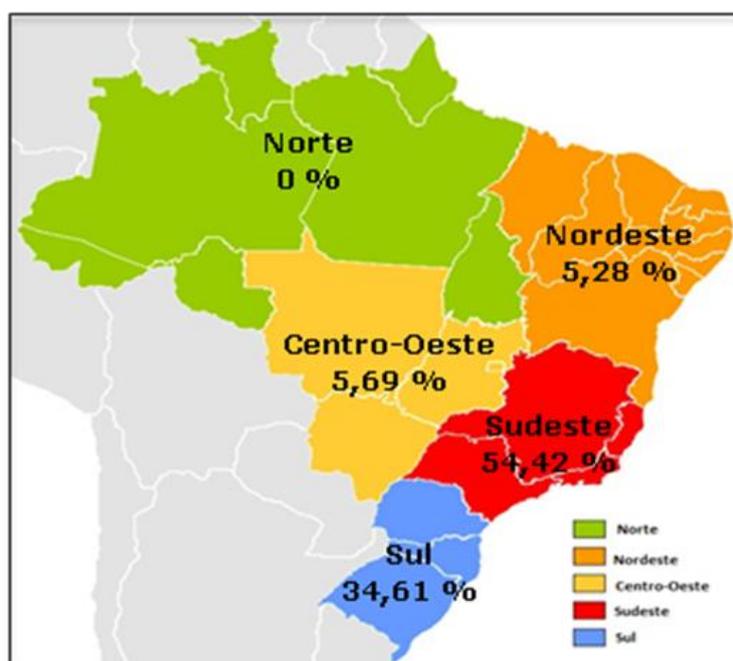


Figura 2. Distribuição (em porcentagem - %) por região, da produção de batata no Brasil. Fonte: IBGE, 2019.

A produção nacional ocorre em três épocas de cultivo, denominadas safra das águas, da seca e de inverno (WATANABE, 2013; FILGUEIRA, 2003). O período de plantio dessas safras pode variar em função da região e da variedade da batata a ser plantada, porém estão sempre concatenadas, sendo que cada região desenvolve dois cultivos predominantes (FILGUEIRA, 2003).

Embora importante para o agronegócio mundial, a cultura da batata está sujeita a fatores que limitam a sua produção, como os ambientais e os sanitários, ou seja, as pragas e as doenças. A principal doença da batata, em todo o mundo, é a requeima ou mela, causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans*, pois é das doenças mais devastadoras em campos de produção (WANG et al., 2017; HOOKER, 1981).

3.2. A Requeima

A requeima ou mela, causada por *P. infestans*, é conhecida por diversos nomes em outros idiomas, sendo os mais comuns: “late blight”, “blight” e “downy mildew” em inglês; “mildiu” e “tizon tardio” em espanhol; “mildiou” em francês; “fitoftoros” em russo; “wan yi Bing” em chinês; “braunfaeule” e “kraut und knollenfaeule” em alemão; “aaloo ka jhulsa” em indiano; e “phytophthorosis” em ucraniano (CENTER FOR AGRICULTURE AND BIOSCIENCES INTERNATIONAL - CABI, 2019).

Mundialmente, *P. infestans* é considerado um dos patógenos mais significativos na bataticultura e até hoje é temido pelos agricultores e pelas agroindústrias devido às perdas de bilhões de dólares em danos decorrentes de infecções todos os anos (DAHLIN, 2016; KAMOUN et al., 2015; COOKE; LEES, 2004).

A requeima da batata ficou conhecida mundialmente por causar “A Grande Fome” na Irlanda entre 1845-1849, resultando em morte de cerca de 1 milhão de pessoas por desnutrição e a migração de milhões de irlandeses, devido ao efeito devastador dessa doença (TURNER, 2005; SALAMAN; BURTON, 1985).

Até hoje a requeima é considerada uma grande ameaça para a segurança alimentar mundial. No Brasil, a ocorrência da doença na cultura da batata em 1898 foi atribuída a uma introdução de batata-semente infectada, proveniente da Europa (NIEDERHAUSER, 1991).

Os sintomas da requeima (Figura 3) em folhas são caracterizados por manchas de tamanho variável, coloração verde-clara ou escura, aspecto úmido, localizados nas bordas dos folíolos. Ao evoluírem, as manchas se tornam escuras, irregulares ou parcialmente circulares, apresentando geralmente aspecto encharcado. Sob condições de temperatura amenas e umidade elevada observa-se na face inferior das lesões a formação de um anel de esporulação formado por esporângios e esporangióforos do patógeno. O anel tem aspecto aveludado, com coloração branco-acinzentada, e localiza-se principalmente ao redor das lesões, nos limites entre o tecido sadio e o necrótico. À medida que o tecido foliar é afetado, as lesões tornam-se necróticas e ressecadas, apresentando um aspecto de queima intensa e generalizada. Nas hastes foliares, as lesões são marrom-escuras, contínuas e aneladas, podendo causar a morte das áreas abaixo da lesão. Nos tubérculos, as lesões são superficiais, de cor castanha, com formatos irregulares e bordos definidos. No interior dos tubérculos, a necrose é irregular, de coloração marrom, aparência granular e mesclada (TÖFOLI;

DOMINGUES; ZANOTTA., 2017; SOUZA DIAS; IAMAUTI; FISCHER,2016; WALE; PLAT; CATTILIN, 2008; STEVENSON; KIRK; ATALLAH, 2008).

A dispersão dos propágulos do patógeno ocorre pelo vento, água e insetos. O ciclo completo de *P. infestans* pode ocorrer em menos de cinco dias em cultivares suscetíveis e os esporos também infectam os tubérculos, os quais apodrecem durante o armazenamento ou podem atuar como fonte de inóculo primário se no plantio seguinte forem utilizados como tubérculos-semente (FRY; GOODWIN, 1997).

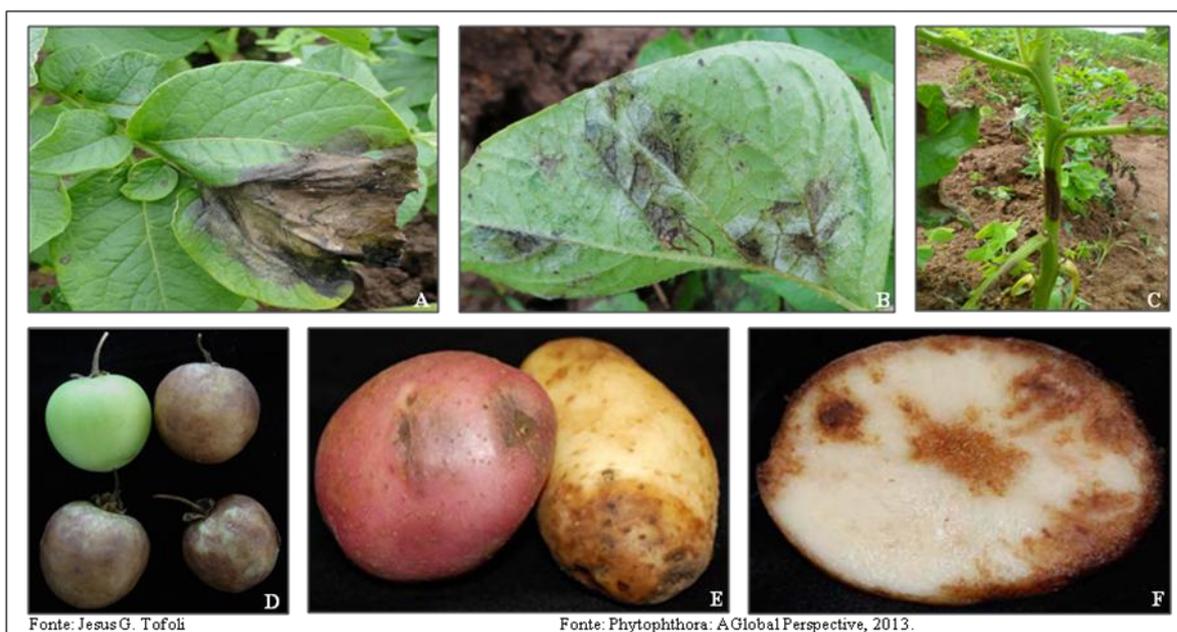


Figura 3. Sintomas de Requeima em batata. A) sintoma de requeima na parte adaxial da folha; B) esporulação do patógeno (*P. infestans*) na parte abaxial da folha; C) sintoma de requeima em haste; D) fruto de batata sadio e com sintomas de requeima; E) Sintoma de requeima em tubérculos de batata externamente e (F) internamente.

3.3. O patógeno – *Phytophthora infestans*

O gênero *Phytophthora*, palavra derivada do grego, sendo phyto = planta e pthora = destruidor, foi assim nomeado por Anton de Bary em 1876, em alusão ao seu poder de disseminação e destruição (MOURA, 2002).

Phytophthora infestans é um representante dos oomicetos, um grupo de organismos genericamente conhecidos como “mofos aquáticos”. Muito embora compartilhem muitas características biológicas, ecológicas e epidemiológicas dos fungos, não pertencem ao Reino Fungi (BOSCO et al., 2010; SCHUMANN; D’ARCY, 2000; SCHUMANN, 1991).

Estudos filogenéticos mostraram que os oomicetos estão mais intimamente relacionados às algas marrons e às plantas verdes do que aos fungos. A principal diferença reside na composição da parede celular. Enquanto em fungos, a parede celular é composta em sua maior parte por quitina, em oomicetos é constituída predominantemente por 1-3- β -glucanas e, em menor proporção, por 1-4- β -glucanas e 1-6- β -glucanas (BARBOZA, 2014; FRY, GRUNWALD, 2010; KIRK, et al., 2005; LATIJNHOUWERS, DE WIT, GOVERS, 2003; WERNER et al., 2002; CAVALIER-SMITH, 1998).

O gênero *Phytophthora* pertence ao Domínio Eukaryota, Reino Stramenopila, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Peronosporales, família Peronosporaceae (RIBEIRO, 2013, CENTER FOR AGRICULTURE AND BIOSCIENCES INTERNATIONAL - CABI, 2019; MYCOBANK DATABASE, 2019).

Inferências filogenéticas apontam para algum lugar no Novo Mundo como centro de origem de *P. infestans*, embora haja discordância quanto à localização geográfica. Para Goss e colaboradores (2014) *P. infestans* é nativa do México central, enquanto Martin e colaboradores (2015) defendem a hipótese de que seja das terras andinas da América do Sul.

O México foi considerado o centro de origem de *P. infestans* devido à alta diversidade genética do patógeno nesta região, à presença dos dois tipos de grupo de compatibilidade (A1 e A2) e a presença de duas espécies próximas, *P. ipomoeae* e *P. mirabilis*, as quais são endêmicas do México Central (GOSS et al., 2014). Para corroborar com esta hipótese, acrescenta-se o fato das populações de *P. infestans*, nas terras altas do México, se reproduzir sexualmente uma vez que os dois grupos de compatibilidade ocorrem em uma proporção de 1: 1 (GOODWIN, DRENTH, FRY, 1992a, GRUNWALD et al., 2001), os oósporos são formados nas folhas e nos caules (FERNANDEZ-PAVIA; GRÜNWARD, FRY., 2002, FLIER et al., 2001, GALLEGLY; GALINDO, 1958) e os marcadores genéticos mostram que os isolados nesta região apresentam alta variabilidade (GRUNWALD et al., 2001, TOOLEY et al., 1985).

Por outro lado, como a batata é nativa da América do Sul, na região Andina (AMES; SPOONER, 2008), há a hipótese de ser este o centro de origem de *P. infestans* (GÓMEZ-ALPIZAR; CARBONE; RISTAINO, 2007; ABAD; ABAD, 1997). No entanto, a ausência de reprodução sexuada em populações de campo e a presença de clonalidade na América do Sul depõem contra essa hipótese (FRY et al., 2009), apesar dos grupos de compatibilidade A1 e A2 serem encontrados na Argentina, Brasil,

Paraguai e Uruguai (FORBES, 2004). No Brasil, acredita-se que o alto grau de especificidade dos isolados presente aos hospedeiros, com o grupo A1 predominando em tomate e o A2 em batata, desempenhe um papel importante no impedimento da reprodução sexuada (OLIVA et al. 2002).

O micélio de *P. infestans* é composto por filamentos (hifas) hialinos, ramificados e não septados, com um diâmetro entre 5 e 8 µm, onde se formam os esporangióforos. São nesses esporangióforos que se desenvolvem as estruturas assexuadas denominadas esporângios ou zoosporângios. Os esporângios são hialinos, com forma de limões e papilados, dimensões entre 21 - 38 x 12 - 23 µm e são formados durante período de alta umidade relativa (91 - 100%) e temperaturas entre 12-25°C (TOKESHI; CARVALHO, 1980).

Os esporângios de *P. infestans* podem germinar de modo direto ou indireto, dependendo da temperatura. A germinação direta consiste na formação do tubo germinativo e é favorecida por temperaturas acima de 20°C. A germinação indireta é caracterizada pela formação e liberação de zoósporos (geralmente oito por esporângio), os quais são liberados quando a parede do esporângio se rompe em temperaturas iguais ou inferiores a 12°C. Os zoósporos podem nadar num filme de água sobre o tecido da planta e, ao perderem seus flagelos, podem encistar, germinar, formar o tubo germinativo e penetrar na planta, iniciando assim um novo ciclo. Portanto, em baixas temperaturas, a quantidade de inóculo é muito maior do que na germinação direta do esporângio, devido à formação de zoósporos. Por esta razão, os efeitos da temperatura na germinação de esporângios têm implicações diretas no manejo da requeima. Temperaturas acima de 30°C são consideradas desfavoráveis para a ocorrência da doença (SOUZA, 2013; FRY; 2008; JUDELSON; BLANCO. 2005; SATO, 1994a; SATO, 1994b; TOKESHI; CARVALHO, 1980; CROSIER, 1934).

Phytophthora infestans possui características que o torna um patógeno com grande capacidade de causar danos à cultura, uma vez que possui alto potencial de esporulação, fácil disseminação via batata-semente, vento e água e curto período de incubação. Esse patógeno pode causar perdas maiores ou até totais quando ocorrem equívocos na adoção de medidas de controle, o plantio de cultivares suscetíveis é massivo, o inóculo está presente e as condições climáticas são favoráveis (TOFOLI et al., 2013; TÖFOLI, MELO, DOMINGUES, 2012; MIZUBUTI, FRY, 2006; STEVENSON et al., 2001; FRY, 1994). Acrescenta-se a isso o fato de que, na ausência do hospedeiro, os oósporos podem persistir no solo, constituindo-se como inóculo

primário para novas infecções em novos plantios (CASA-COILA, 2014; PORTER; DASGUPTA; JOHNSON, 2005; MAYTON et al., 2000).

Dentre as condições climáticas que afetam o ciclo de vida de *P. infestans*, se destacam a temperatura e a umidade relativa do ar. A temperatura influencia a esporulação, a infecção e a expansão das lesões, além da sobrevivência de propágulos e a germinação dos esporângios (MIZUBUTI; FRY, 1998; HARTILL et al., 1990; SUJKOWSKI, 1987; MINOGUE; FRY, 1981). Já a presença de água no estado líquido e o tempo de molhamento foliar são essenciais para a esporulação, a sobrevivência do patógeno, a germinação dos esporângios e o estabelecimento da infecção (DE WEILLE, 1964; MINOGUE; FRY, 1981; HARRISON; LOWE, 1989; HARTILL et al., 1990; HARRISON, 1992; MAZIERO, 2001).

O ciclo completo do patógeno pode ocorrer em menos de cinco dias em cultivares suscetíveis, sendo que os esporos infectam também os tubérculos, causando apodrecimento durante o armazenamento e servindo de fonte primária de inóculo, se no plantio seguinte forem utilizados esses tubérculos como semente (FRY; GOODWIN, 1997).

O ciclo reprodutivo de *P. infestans* pode ser separado em assexuado e sexuado. Na forma assexuada ocorre a produção de esporângios (zoosporângios) e zoósporos, e na reprodução sexuada há a produção de oósporos. O oósporo também é conhecido por esporo sexual de resistência, por possuir a capacidade de se manter viável no solo na ausência de hospedeiros (CASA-COILA, 2014; DANIES et al., 2013; TRIGIANO; AMENT; LAMOUR, 2010; VARGAS et al., 2009; WIDMARK et al., 2007; MIZUBUTI; FRY, 2006; RISTAINO; GUMPERTZ, 2000; FLIER et al., 2003; ERWIN; RIBEIRO, 1996; FRY et al., 1992).

O ciclo sexual dos oomicetos pode ser dividido em duas formas, o homotático (autofértil) e o heterotático (autoestéril).

Phytophthora infestans é considerado um organismo heterotático (autoestéril) com dois grupos de compatibilidade conhecidos como A1 e A2, apesar da existência também de isolados autoférteis (homotáticos) (ZHU et al., 2016).

As espécies homotáticas são capazes de produzir oósporos durante o crescimento vegetativo, seja em placas de Petri com meio de cultura ou durante a infecção dos tecidos do hospedeiro, por meio de um mecanismo de autofertilização. Em 1911, Clinton foi o primeiro a observar oogônio, anterídio e oósporos em cultura pura de *P. infestans*. De acordo com Zhu e colaboradores (2016), de maneira geral os

isolados autoférteis mostraram maior adaptação e agressividade, além de serem mais resistentes aos princípios ativos de fungicidas, do que os isolados pertencentes ao grupo de compatibilidade A1.

Isolados autoférteis de *P. infestans* já foram identificados no México (GALLEGLY; GALINDO, 1958; GALLEGLY, 1960; GALINDO; NIEDERHAUSER, 1961; GOODWIN et al., 1992b), Estados Unidos (MILLER; HAMM; JOHNSON, 1997); VARTANIAN; ENDO, 1985) Inglaterra e País de Gales (FYFE; SHAW, 1992; TANTIUS et al., 1986), Japão (MOSA et al., 1989), Canadá (FABRITIUS; JUDELSON, 1997) e Brasil (CASA-COILA et al., 2017).

A reprodução sexual heterotática envolve distintos grupos de compatibilidade sexual, conhecidos como grupos de compatibilidade A1 e A2. Para que ocorra a reprodução sexual, é necessário que estes dois grupos de compatibilidade ocorram ao mesmo tempo na mesma área. Os grupos de compatibilidade A1 e A2 secretam hormônios α_1 e α_2 , respectivamente, para induzir a formação de oósporos no grupo de compatibilidade oposto (QI et al., 2005).

A reprodução sexual começa com a formação de gametângios masculino (anterídio) e feminino (oogônio). O anterídio é confinado por um septo e secreta material adesivo que facilita o emparelhamento. Simultaneamente, a meiose ocorre tanto no anterídio quanto no oogônio e um tubo de fertilização se desenvolve entre eles, permitindo que um núcleo haplóide atinja o oogônio e a fecundação ocorra (KANDEL, 2014; JUDELSON et al., 2009).

O ciclo assexuado envolve apenas um grupo de compatibilidade, A1 ou A2. Neste caso, não ocorre uma recombinação meiótica e a variabilidade genética se origina de mutações (FRY, 2008).

A reprodução assexuada de *P. infestans* leva à baixa variabilidade genética do patógeno, enquanto que a reprodução sexuada aumenta a variabilidade do oomiceto, podendo originar híbridos mais agressivos. O conjunto de isolados de uma cepa que se reproduz de forma assexuada é conhecido como linhagem clonal (CASA-COILA, 2014; PORTER; DASGUPTA; JOHNSON, 2005; MAYTON et al., 2000).

Em 2009, Haas e colaboradores realizaram o sequenciamento completo do genoma de *P. infestans*. A análise do genoma apontou como característica marcante a presença de transposons (elementos genéticos móveis) e regiões hipervariáveis abundantes, explicando as grandes variações de fenótipo, a agressividade (KAMOUN, 2003; GUO et al., 2009), e a capacidade de se adaptar a diferentes climas e latitudes ao

longo de sua evolução. Essas características tornam *P. infestans* um patógeno de difícil controle (FRY, GOODWIN, 1997).

O sequenciamento de DNA de folhas de batata e tomate infectadas por *P. infestans* que haviam sido herborizadas nos EUA e na Europa na época da Grande Fome Irlandesa (principalmente entre 1845 e 1849), permitiu a obtenção de diversos genomas completos de linhagens do fungo daquele período (MARTIN et al., 2013; YOSHIDA et al., 2013). Estas análises evidenciaram que uma linhagem denominada HERB-1 foi responsável pela epidemia que se iniciou em 1842 nos EUA e atingiu a Europa dois anos depois.

Os primeiros estudos que envolveram a caracterização de populações de *P. infestans* no Brasil foram realizados em meados para fins da década de 1980 (GOODWIN; COHEN; FRY, 1994; BROMMONSCHENKEL, 1988). Neste período, a linhagem clonal US-1, do grupo de compatibilidade A1, era a predominante em tomate enquanto em batata, era encontrada somente a linhagem clonal BR-1, do grupo de compatibilidade A2. Este cenário permaneceu inalterado conforme estudos realizados com isolados de tomate e batata obtidos nos anos de 1998 a 2000, nos estados de RS, SC, PR, SP, MG, RJ e ES (REIS et al., 2003) e nos anos de 2001 a 2003, no DF e GO (REIS; RIBEIRO; MIZUBUTI, 2006). No estudo de REIS e colaboradores (2003), isolados A1 foram encontrados em batata somente em campo experimental da Universidade Federal de Viçosa, infectando as variedades altamente suscetíveis Bintje e Monalisa, em uma região em que se cultivava comercialmente o tomate mas não a batata. A presença das duas linhagens clonais US-1/A1 em tomate e BR-1/A2 em batata, sem que se observasse reprodução sexuada entre as duas, devia-se provavelmente à especificidade de hospedeiro que dificultaria a ocorrência de ambas na mesma cultura (SUASSUNA; MAFFIA; MIZUBUTI, 2004).

Mudança nesse cenário foi constatada em estudo com isolados de tomate e batata coletados entre 2004 e 2005 nos estados de RS, SC e PR por Santana (2006) e Santana e colaboradores (2013). Esses autores constataram em batata, somente no RS, a presença de diferentes populações clonais e/ou reproduzindo-se sexualmente de *P. infestans* dos grupos A1 e A2, enquanto que em tomate, nos três estados, permanecia a ocorrência exclusiva da linhagem clonal US-1 do grupo A1.

Oliveira (2010) observou a ocorrência de isolados A1 e A2 de *P. infestans* em batata em MG e SP entre os anos de 2008 e 2010. Casa-Coila (2014), entre os anos de

2010 a 2012, detectou isolados A1, A2 e A1/A2 em batata no RS e, em SC e PR, além dos grupos A1 e A2, observou grande quantidade de isolados autoférteis.

Nota-se, portanto, uma gradativa mudança nas populações de *P. infestans* em batata, ao longo dos anos e nas diversas regiões produtoras, com substituição da linhagem clonal BR-1, do grupo de compatibilidade A2, por novas linhagens do grupo A1 ou autoférteis. Desde o trabalho de Casa-Coila (2014), com isolados obtidos entre os anos de 2010 a 2012, não foram realizados novos estudos para a caracterização das populações de *P. infestans* de batata no Brasil.

Nestes estudos de caracterização da população brasileira de *P. infestans* foram utilizados marcadores fenotípicos, como grupo de compatibilidade sexual, resistência a mefenoxam, além de marcadores moleculares, como RFLP e haplótipos mitocondriais (mtDNA), e bioquímicos, como as isoenzimas GPI (glicose-6-fosfato isomerase) e PEP (peptidase).

A compreensão da dinâmica da variabilidade genética dos fitopatógenos se faz necessária para o entendimento de como as populações evoluem e as implicações desse processo na durabilidade de cultivares resistentes e no controle da doença. Esta compreensão pode ser traduzida na duração da efetividade da adoção de uma cultivar resistente ou de um fungicida específico para o manejo da doença (OLIVEIRA, 2010; MILGROOM; PEEVER, 2003). Segundo Lees e colaboradores (2006), diversos trabalhos já foram desenvolvidos no mundo todo para caracterizar o grupo de compatibilidade e a resistência a fungicidas das populações de *P. infestans*. No entanto, os estudos relacionados à diversidade genética eram limitados pelo baixo poder discriminatório dos marcadores genéticos então utilizados. A partir da década de 2000, novos marcadores passaram a ser utilizados nas análises de biologia de populações de fitopatógenos, como o caso dos microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR) (COOKE; LEES, 2004).

3.4. Marcadores Moleculares Microssatélites (SSR)

Os marcadores moleculares têm sido cada vez mais utilizados para caracterizar populações de fungos fitopatogênicos, permitindo avaliar os níveis de diversidade genética, as relações filogenéticas intra e interespecíficas e a identificação de raças e patótipos (HENSEN; OBERPRIELER; WESCHE, 2005; DAVIS, KUBISIAK,

MILGROOM, 2005; LEAL-BERTIOLI, 1998; BELABID et al., 2004; JAMES, LIOU, VILGALYS, 2004;).

Em estudos de genética populacional de fitopatógenos, os marcadores microssatélites também conhecidos como SSR (“Simple Sequence Repeats”), têm sido amplamente utilizados para verificar a estrutura e a variabilidade genética em populações. A estrutura genética refere-se à distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e linhagens, no espaço e no tempo, resultante da ação de forças evolutivas tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie ou população (HAMRICK, 1982). Os marcadores de SSR são utilizados para investigar a estrutura genética e biologia reprodutiva de numerosos patógenos de plantas (TENZER et al., 1999).

Para Grunwald e colaboradores (2003), a análise da diversidade genética é avaliada com base nas diversidades gênica e genotípica. A primeira considera o número e a frequência dos alelos por locus na população, enquanto que a segunda avalia o número de linhagens observadas, sua distribuição e uniformidade dentro da população. Os marcadores microssatélites têm natureza multialélica, são de fácil detecção por PCR, relativamente abundantes e podem estar distribuídos em várias partes do genoma. Eles são muito utilizados em estudos genéticos, por combinarem codominância e poliformismo em abundância. Sua identificação depende de conhecer as sequências das regiões adjacentes ao SSR, para então desenhar um par de iniciadores apropriado para essa determinada região, sendo possível nos indivíduos da população, amplificar esses SSR por PCR (polymerase chain reaction ou reação em cadeia pela polimerase) (VIGNA et al., 2011).

Na literatura já foram descritos diversos locos microssatélites (SSR) para algumas espécies de *Phytophthora* como: *P. capsici* (OGUNDIWIN et al., 2005; SUGITA et al., 2006; WANG et al. 2009), *P. cinnamomi* (DOBROWOLSKI, et al., 2003), *P. infestans* (KNAPOVA; GISI, 2002; LEES et al., 2006; LI et al., 2010) e *P. ramorum* (IVORS et al., 2006a; IVORS et al. 2006b; PROSPERO; BLACK; WINTON, 2004).

Desde 2013, baseado em estudo de Li e colaboradores (2013), um conjunto de 12 marcadores SSR foi estabelecido para o monitoramento das populações de *P. infestans* ao redor do mundo. Na Europa, o consórcio de pesquisa EuroBlight coordena os levantamentos realizados pelos diferentes países membros. Nos Estados Unidos e na América Latina essa coordenação é realizada pelos consórcios USABlight e Tizón

Latino, respectivamente. No Brasil, esse conjunto de 12 marcadores SSR padronizados ainda não haviam sido utilizados para a caracterização das populações locais de *P. infestans*.

O emprego de técnicas moleculares, como o sequenciamento de genomas completos e diferentes marcadores incluindo SSRs, mostrou que a linhagem causadora da Grande Fome na Irlanda no século dezenove, também presente na América do Norte e denominada FAM-1 (também conhecida pelo haplótipo mitocondrial como HERB-1), foi substituída globalmente pela linhagem US-1 no século XX (SAVILLE; MARTIN; RISTAINO, 2016; MARTIN et al., 2013, YOSHIDA et al., 2013). A linhagem US-1 predominou por décadas nos EUA e Europa e ainda prevalece em algumas regiões do mundo. Pertencendo ao grupo de compatibilidade A1, a linhagem US-1 não sofreu recombinação sexual até a década de 1970, quando foram introduzidas nos EUA e Europa novas linhagens pertencentes tanto ao grupo A1 como A2, oriundas do México. A partir da diversificação genética resultante da recombinação sexual, novas linhagens clonais nos EUA (US-8, US-22 e US-23) e Europa (13_A2), tornando-se dominantes localmente por diferentes períodos (MARTIN et al., 2019). Nos últimos anos, tem-se observado o rápido surgimento e a expansão de novas linhagens clonais como, por exemplo, 36_A2, 37_A2 e 41_A2, cujo a frequência na Europa aumentou de 10%, em 2016, para 36%, em 2018 (EUROBLIGHT, 2019).

Em países da África ocidental (Quênia, Uganda, Tanzânia, Burundi e Ruanda), a linhagem 2_A1, originária da Europa, suplantou a então predominante US-1 em um período de nove anos (2007 a 2016) (NJOROGE et al., 2019).

Na América do Sul, a linhagem EC-1 é predominante na Colômbia (CHAVES et al., 2018), Equador (DELGADO et al., 2013) e Peru (GARRY et al., 2005). Levantamentos recentes realizados com isolados do Chile, Argentina e Brasil (parte dos isolados do presente estudo) indicaram que a linhagem 2_A1 é a predominante (LUCCA; RESTREPO, 2018).

3.5. Manejo da Requeima

Devido à importância da requeima para a cultura da batata, diferentes métodos de controle têm sido integrados, como por exemplo, a utilização de tubérculos-sementes saudios e de cultivares menos suscetíveis, a retirada e destruição de plantas voluntárias e

o controle químico (BOSCO et al., 2010; TAYLOR et al., 2003). Dentre as medidas recomendadas para prevenção e controle da requeima, a mais utilizada pelos bataticultores é a aplicação de fungicidas (TOFOLI, DOMINGUES, ZANOTTA, 2017; STEVENSON; KIRK; ATALLAH, 2008).

Fungicidas de uso agrícola são compostos químicos, de origem natural ou sintética, que conferem proteção às plantas quando em contato, evitando a penetração e/ou posterior desenvolvimento de fungos e bactérias patogênicos em seus tecidos (BLUM, 2009). Estes desempenham um papel fundamental como ferramenta no controle de doenças, como a requeima.

A eficácia, o modo de ação, o risco de resistência, os efeitos colaterais e os aspectos econômicos e sociais, além das legislações, são fatores que devem ser tecnicamente considerados em programas de manejo de doenças que visem a sustentabilidade da cadeia produtiva da batata (TOFOLI, DOMINGUES, ZANOTTA, 2017).

A constante evolução técnico-científica dos princípios ativos permitiu o desenvolvimento de fungicidas com diversos mecanismos de ação na planta e nas diferentes fases do processo infeccioso (AGRIOS, 2005; RUSSEL, 2005).

Em relação ao comportamento na planta, os princípios ativos podem ser classificados em produtos de contato, mesostêmicos, translaminares e sistêmicos (TOFOLI, DOMINGUES, ZANOTTA, 2017).

Os produtos de contato caracterizam-se por formar uma película protetora na superfície da planta, que impede a penetração do patógeno. Os mesostêmicos apresentam alta afinidade com a camada cerosa superficial das folhas, podendo redistribuir na fase de vapor ou ser absorvidos pelo tecido, entretanto não apresentam nenhum movimento. Os produtos sistêmicos são aqueles que possuem movimento pela planta, através de vasos condutores, podendo atingir locais distantes do local onde foi depositado, enquanto os translaminares movimentam-se de forma mais limitada nos tecidos (TOFOLI, DOMINGUES, ZANOTTA, 2017; TOFOLI, 2011; AZEVEDO, 2007; REIS, REIS, FORCELINI, 2007). Os fungicidas mesostêmicos, translaminares e sistêmicos são considerados produtos seletivos, porque, em geral, inibem processos metabólicos específicos inerentes a grupos restritos de fungos (TOFOLI, DOMINGUES, ZANOTTA, 2017).

O custo mundial da cultura de batata excede os US\$ 5 bilhões/ano, sendo 1/5 desse valor gasto em fungicidas (USABLIGHT, 2017). Em 1998, no Brasil, calculou-se

que o percentual destinado ao controle da requeima representava entre 15 e 20% dos custos de produção da cultura (SEAB-DERAL, 1998).

Todas as cultivares comerciais são suscetíveis a alguma raça do patógeno, pois *P. infestans*, por meio da reprodução sexuada, é capaz de formar novas raças fisiológicas. Portanto, o método mais eficiente existente para o controle da requeima ainda é o químico (BOSCO et al., 2010; KIRK et al., 2005).

No Brasil, as aplicações de fungicidas na cultura da batata são, em geral, excessivas por serem realizadas sem considerar a interação entre o ciclo de vida do patógeno e as condições meteorológicas, o que gera, por consequência, o aumento no custo de produção e no impacto ambiental, devido à contaminação da água e do solo por fungicidas (BOSCO et al., 2010; GARCÍAS, 2005; HIJMANS et al., 2000; NAZARENO et al., 1999; ERWIN; RIBEIRO, 1996). Em casos extremos, os produtores de batata podem efetuar até 30 aplicações por ciclo da cultura para controlar a requeima (NAZARENO; JACCOUND FILHO, 2003).

Os fungicidas têm sido eficazes para o controle de *P. infestans*, porém o uso contínuo pode trazer como consequência a seleção de populações de patógenos menos sensíveis ou até mesmo resistentes. Esse tipo de situação já está presente por todo o mundo, ou seja, os fungicidas acabam atuando como agentes de seleção (BRENT; HOLLOMON, 2007).

A resistência de fungos a fungicidas pode ser classificada qualitativa ou quantitativamente. Na qualitativa, ocorre a perda de efetividade do fungicida de modo repentino e marcante, pela presença bem definida de populações de patógenos que apresentam sensibilidade e resistência com respostas que variam amplamente. Na quantitativa, ocorre a diminuição da eficácia no controle da doença, assim como a diminuição da sensibilidade das populações do patógeno, demonstrada por testes de monitoramento. Esse tipo de resistência se manifesta gradualmente (FRAC, 2018).

Para observar se está, ou não, ocorrendo a diminuição da sensibilidade ao princípio ativo, é indicado calcular o EC50, ou seja, a concentração efetiva para matar 50% dos microrganismos submetidos ao fungicida, que neste caso é a fungitoxicidade de uma substância química (VALENCIO, 2017; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008; RUSSEL, 2004; LOOMIS, 1995; EDGINGTON, KHEW, BARRON, 1971; TORGESON, 1967; SHARVELLE, 1961).

Para se realizar um monitoramento de resistência de fungos a fungicidas é de extrema importância que se analise um grande número de isolados, além disso, as

técnicas de monitoramento requerem um alto investimento e tempo (RAPOSO, et al. 2015). Um dos métodos mais utilizados para medir essa resistência e determinar o EC₅₀, é o método de inibição do crescimento micelial da colônia em meio de cultura (ICM) (DEKKER, 1987; GEORGOPOULOS, 1982).

Como alternativa, a sensibilidade de fungos a fungicidas pode ser avaliada através da metodologia de microtitulação colorimétrica. Essa metodologia vem sendo recomendada pelo FRAC Internacional, já sendo empregada em diversos estudos de monitoramento de resistência (VALÊNCIO, 2017; VEGA et al., 2012; RAMPERSAR, 2011; STAMMLER; BENZINGER; SPEAKMAN, 2007).

No teste de microtitulação, a quantidade de biomassa fúngica presente nos poços afeta a passagem de luz proporcionalmente, possibilitando quantificar o efeito do fungicida de forma rápida e reprodutível. Essas características tornam esse método muito apropriado para um monitoramento rápido e preciso de resistência em uma população de fungos a fungicidas (RAPOSO et al., 2015). Este método consiste no fungo ser cultivado em poços de microplacas de poliestireno, sendo seu crescimento analisado por espectrofotômetro (LUDWING; BOLLER, 1990).

No Brasil, o controle da requeima tem sido realizado basicamente com fungicidas à base de metalaxil-M, dimetomorfe, cimoxanil, famoxadona e fluazinam. Os fungicidas de contato pertencentes às classes dos ditiocarbamatos (mancozebe, metiram) e cloronitrilas (clorotalonil) têm sido empregados no controle preventivo, seja em aplicações isoladas, ou formulados em mistura com produtos específicos (TOFOLI, DOMINGUES, ZANOTTA, 2017).

Nos últimos anos, novos produtos foram introduzidos no mercado brasileiro para o controle da requeima. Novas misturas, mecanismos de ação e características técnicas diferenciadas abrem novas perspectivas para o controle dessa doença (TOFOLI, DOMINGUES, ZANOTTA, 2017). Entre as opções para o controle da requeima destacam-se os fungicidas à base de ametoctradina (TOFOLI et al., 2016; REIMANN et al., 2010; GOLD et al., 2009), bentiavalicarbe (MIYAKE et al., 2005), ciazofamida (EBERSOLD, 2002), cimoxanil (GENET et al., 2000), dimetomorfe (JOHNSON, CUMMINGS, GEARY, 2000), fenamidona (TAFFOREAU et al., 2009), fluopicolida (LATORSE et al., 2007; TAFFOREAU et al., 2006), mandipropamida (THOMPSON; COOKE, 2009; HUGGENBERGER; KNAUF-BEITER, 2007; HERMANN et al., 2005), mefenoxam (BODKER; NIELSEN 2002; BODKER; NIELSEN, 2001), propamocarbe (BODKER; NIELSEN, 2002;

BODKER; NIELSEN, 2001; JOHNSON, CUMMINGS, GEARY, 2000) e zoxamida (BRADSHAW; SCHEPERS, 2001).

Levantamento sobre a sensibilidade o metalaxil de *P. infestans* de tomate e batata obtidos entre os anos de 1998 a 2000 nas regiões Sul e Sudeste do Brasil indicou elevada frequência de resistência em isolados de tomate (55%) e batata (38%) (REIS et al., 2003). Reis e colaboradores (2005) confirmaram alta incidência de isolados de tomate e batata insensíveis ao metalaxil, nas linhagens US-1 e BR-1, enquanto que, para mancozebe, clorotalonil e cimoxanil, os isolados foram altamente sensíveis. Em estudo com isolados de tomate e batata obtidos no estado de Goiás e em cidades satélites de Brasília, foi observada alta frequência de isolados de tomate resistentes (36%) e intermediários (48%) ao mefenoxam (metalaxil-M), enquanto que a maioria dos isolados de batata (82%) foi sensível (REIS; RIBEIRO; MIZUBUTI, 2006). No mesmo estudo, quando utilizado metalaxil, a maioria dos isolados de batata (87%) foi resistente ou intermediária. Casa-Coila (2014) observou, nos três estados da Região Sul, alta proporção de isolados de *P. infestans* de batata, moderadamente resistentes (77,44%) e resistentes (17,29%) a metalaxil, enquanto que para clorotalonil não se constatou perda de sensibilidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de material infectado

Material botânico (folhas, hastes, caules, frutos e/ou tubérculos) manifestando sintomatologia típica de requeima foi coletado em diversos locais onde ocorre a produção de batata pelo Brasil (Figura 4). As coordenadas geográficas dos locais de coleta das amostras foram registradas com um aparelho GPS.



Figura 4. Locais de coletas de amostras de batata com sintomas de requeima: A) Divinolândia/SP (março/2015), B) Itararé (julho/2015), C) Pilar do Sul (março/2015), D) Divinolândia/SP (abril/2015).

Quando a coleta não podia ser feita presencialmente, foi desenvolvido um formulário (Figura 5) para coleta e este era encaminhado ao produtor ou engenheiro agrônomo responsável pela área.

Amostras de tomateiros infectados com *P. infestans* também foram encaminhadas por produtores para o projeto.

	AMOSTRAS DE REQUEIMA	Requeima
	LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO FITOPATOLÓGICO	

Nome:		
E-mail:		Telefone: ()
Endereço:		
Data da coleta:	Cidade:	Estado:
Latitude:	Longitude:	Altitude:
Variedade:		Dias após plantio (DAP):
TIPO DE AMOSTRA (MATRIZ)		
<input type="checkbox"/> Mudanças <input type="checkbox"/> Folhas <input type="checkbox"/> Pecíolos <input type="checkbox"/> Hastes <input type="checkbox"/> Frutos <input type="checkbox"/> Tubérculos <input type="checkbox"/> Batata-semente <input type="checkbox"/> Outros:		

Para que as análises sejam realizadas é de extrema importância que o material chegue em condições ao Instituto Biológico, para que isto ocorra recomenda-se que sejam coletados material com lesões jovens/novas e que estes não estejam muito úmido e sejam acondicionados em sacos de papel (não em sacos plásticos).

Figura 5. Formulário desenvolvido para o envio de amostra de requeima ao Instituto Biológico.

As amostras foram levadas ao Laboratório de Doenças Fúngicas em Horticultura (LDFH) ou para o Laboratório de Diagnóstico Fitopatológico (LDF) no Instituto Biológico (IB), em São Paulo, SP.

4.2. Monitoramento do tipo de reprodução

4.2.1. Indução à produção de estruturas de reprodução

No laboratório, as amostras foram observadas sob microscópios estereoscópico e óptico, para que fossem analisadas as estruturas de reprodução presentes nas mesmas. Quando a amostra apresentava os sintomas típicos de requeima, mas nenhuma estrutura de reprodução, a amostra era colocada em câmara úmida (dentro de caixa gerbox sobre papel filtro umedecido com água destilada) e mantidas em câmara incubadora (BOD) com temperatura de $16 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. Após três dias, as estruturas de reprodução eram analisadas. As análises continuaram diariamente por até 15 dias.

4.3. Isolamento de *Phytophthora infestans*

Para o isolamento de *P. infestans* foi utilizado meio indicado pelo Fry Lab (2014) com modificações, que consistiram no preparo do meio V8 não clarificado (suco V8, água destilada, β -sitosterol, carbonato de cálcio e ágar) com adição de antibióticos (ampicilina e rifampicina) e fungicidas (cercobin e flutriafol).

Durante o período de incubação, para a esporulação do patógeno, o material infectado foi visualizado em microscópios (esteroscópico e óptico) e, posteriormente, fragmentos do material, contendo estruturas do patógeno, foram transferidos para o meio de cultura descrito acima e incubados a 16°C com fotoperíodo de 12 horas.

4.4. Extração de DNA

Discos de micélios de nove milímetros de diâmetro de isolados de *P. infestans* foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio líquido de ervilha (FRY LAB, 2014). Estes foram mantidos a 18°C por sete dias, posteriormente o micélio foi coletado e transferido para microtubos de 1,5 mL.

As amostras de tomate não foram utilizadas para isolamento do patógeno em meio de cultura, sendo a extração de DNA feita diretamente do tecido infectado.

A extração de DNA foi realizada segundo método descrito por Dellaporta e colaboradores (1983) com modificações. O material foi triturado sob nitrogênio líquido dentro de tubos de 1,5 mL, adicionou-se solução de extração CTAB e seguiu-se incubação por 30-45 minutos a 65°C com agitação moderada. Adicionou-se clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), a mistura foi agitada por inversão e centrifugada a 14.000 G por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e a extração com clorofórmio/álcool isoamílico foi repetida. O sobrenadante foi novamente transferido para novos tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol e mantidos a -4°C durante a noite. Após este período, os tubos foram centrifugados a 12.000 G por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com etanol absoluto seguido de lavagem com etanol 70%. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco a 36 °C por 20 min. O DNA foi suspenso em 40 μ L de água de osmose reversa esterilizada.

4.5. Identificação do grupo de compatibilidade

4.5.1. Amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Os fragmentos de DNA foram submetidos à amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando os iniciadores S1-A e S1-B, iniciadores modificados a partir dos descritos por Judelson (1996), que amplifica um fragmento de aproximadamente 1250 pb para isolados pertencentes ao grupo de compatibilidade A1, os iniciadores PHYB-1 e PHYB-2, descritos por Kim e Lee (2002), que amplificam um fragmento de 347 pb para isolados que pertencem ao grupo de compatibilidade A2 e com os iniciadores W16-1 e W16-2, descritos por Judelson, Spielman e Shattock (1995), que amplificam fragmento de 547 pb para ambos os grupos de compatibilidade, mas permitem discriminar os grupos após digestão com a enzima de restrição *Hae* III ou sequenciamento. As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para identificação dos grupos de compatibilidade dos isolados de *Phytophthora infestans*

Iniciador	Sequência (5'-3')	Fragmento / Grupo de Compatibilidade	Referência
S1-F	AGGATTTCAACAA	1250 pb / A1	JUDELSON, 1996
S1-R	TGCTTCCTAAGG		
PHYB-1	GATCGGATTAGTCAGACGAG	347 pb / A2	KIM; LEE, 2002
PHYB-2	GCGTCTGCAAGGCGCATTTT		
W16-1	AACACGCACAAGGCATATAAATGTA	547 pb / A1 e A2	JUDELSON, SPIELMAN e SHATTOCK, 1995
W16-2	GCGTAATGTAGCGTAACAGCTCTC		

4.5.2. Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados seguindo protocolo descrito por Schmitz e Riesner (2006). Em microtubo de 1,5 mL, foi misturados 1,6 µL de EDTA 0,5 M, 21,0 µL PEG 6.000 a 50% e 8,1 µL de NaCl 5 M. Adicionou-se o produto da PCR (50 µL) à mistura e incubou-se a temperatura ambiente por 10 min. Após centrifugação

a 14.000 G por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 125 µL de etanol 70%. O pellet foi seco a 36°C por 20 minutos. O DNA foi ressuspenso em 30 µL água de osmose reversa esterilizada.

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger et al. (1977). As reações para sequenciamento foram efetuadas com o kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisadas em sequenciador ABI 3500 xL (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante.

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999).

4.5.3. Pareamento “*in vitro*”

O pareamento *in vitro* foi feito seguindo protocolo do Lab Fry (2014), com modificações. Em placa de Petri de 9 cm, contendo meio V8 10% clarificado, foram colocados dois discos de micélios separados por aproximadamente 6,0 cm. Um dos discos de micélio pertencente a um dos isolados padrões e o outro pertencente a um isolado desconhecido. Cada isolado desconhecido foi pareado com ambos os isolados padrões (A1 e A2). Posteriormente placas foram mantidas em BOD a $16 \pm 2^\circ\text{C}$ no escuro. Após 15 dias de incubação, as placas foram observadas sob microscópio estereoscópico e, se necessário, microscópio óptico, para observar a presença ou não de oósporos.

Os isolados que apresentaram formação de oósporos quando pareados com o padrão A1 foram classificados como A2 e os que o fizeram com o padrão A2, foram classificados como A1.

Os isolados padrões 151 (Santa Maria do Herval/RS) – isolado de batata pertencente ao grupo de compatibilidade A2; CRI-2 (Cristal/RS) – isolado de batata pertencente ao grupo de compatibilidade A1 e PRT – isolado de tomate pertencente ao grupo de compatibilidade A1, foram fornecidos pelo Dr. Cesar Bauer Gomes, Pesquisador da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS).

4.6. Caracterização molecular por microssatélite (SSR)

Os procedimentos para a análise molecular por microssatélite dos isolados de *P. infestans* foram realizados inicialmente no Instituto de Biotecnologia Agropecuária, situado no Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária (INTA) em Hurlingham, Província de Buenos Aires, Argentina, com a colaboração das pesquisadoras Dra. Ana María Florencia Lucca, Dra. Andrea Fabiana Puebla e María Florencia Servici. Posteriormente, as análises foram realizadas na Unidade Laboratorial de Referencia em Biología Molecular Aplicada (ULRBMA), no Instituto Biológico, em São Paulo, SP.

A partir do DNA total extraído e quantificado em equipamento Nanodrop, foi realizada reação de PCR para amplificação de 12 marcadores microssatélites (SSR), (Tabela 3): Pi4B e PiG11 (KNAPOVA, GISI, 2002), D13, Pi04, Pi63, Pi70 (LEES et al., 2006) e PinfSSR2, PinfSSR3, PinfSSR4, PinfSSR6, PinfSSR8 e PinfSSR11 (LI et al., 2010).

O iniciador *forward* de cada um dos lócus foi marcado com um fluoróforo, com exceção do lócus PinfSSR6 para o qual o iniciador *reverse* foi marcado. Foram utilizados quatro fluoróforos: NED para amarelo (PiG11, PinfSSR3, PinfSSR11), FAM para azul (D13, PinfSSR4, PinfSSR8), VIC para verde (Pi04, Pi63, Pi70, PinfSSR6) e PET para vermelho (Pi4B, PinfSSR2) (Tabela 7).

A amplificação dos marcadores microssatélites foi realizada em um volume final de 12,5 µL, com aproximadamente 150 ng de DNA e o Type-it® Microsatellite PCR Kit (QIAGEN), seguindo instruções do fabricante. A reação de PCR foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems) ou T100 (BioRad), com a programação de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 s para desnaturação, 58°C por 90 s para anelamento e 72°C por 20s para extensão, e uma extensão final a 72°C por 30 min.

Após a amplificação, o produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídeo. Posteriormente, os produtos foram diluídos (5 a 50 vezes), em água Milli Q autoclavada, com base na intensidade no gel de agarose.

Dois microlitros da diluição foram misturados com 8 µL de formamida contendo o padrão GeneScan 500 LIZ (Thermo Scientific), desnaturados a 92 °C durante 5 minutos e analisados em sequenciador ABI Prism® 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Os fragmentos foram avaliados através do software GeneMapper® versão 4.0 (Applied Biosystems®) na Argentina e com o software STRand no Brasil. O tamanho dos alelos foi comparado com a lista de alelos cedida pela Euroblight e Tizón Latino (Anexos 1, 2 e 3) e a nomenclatura dos alelos foi dada seguindo a descrição da tabela no tópico “final name”.

Árvore de distância genética, calculada por Neighbor Joining, e gráfico de “minimum spanning network” foram construídos com os dados de microssatélites do presente estudo, comparando com linhagens de referência, com a ferramenta Genotype-ID do website Phytophthora-ID versão 2.0 (www.phytophthora-id.org) (LEES et al., 2006; LI et al., 2013). Também foram incluídos dados de microssatélites da linhagem BR-1 (cedidos por Jean Ristaino, North Carolina State University) e de outras linhagens mundiais presentes no estudo de Martin e colaboradores (2019).

Tabela 3. Descrição dos iniciadores para amplificação dos 12 loci polimórficos microssatélites usados na caracterização de isolados de *Phytophthora infestans*.

Locus	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Fluoróforo	Faixa de tamanho do produto	Referência	
D13	D13-Fwd	FAM – TGCCCCCTGCTCACTC	FAM (Azul)	100 – 185 pb	LEES et al., 2006	
	D13-Rev	GCTCGAATTCATTTTACAGACTTG				
Pi04	Pi04-Fwd	VIC – AGCGGCTTACCGATGG	VIC (Verde)	162 – 170 pb		
	Pi04-Rev	GTTTCAGCGGCTGTTTCGAC				
Pi4B	Pi4B-Fwd	PET – AAAATAAAGCCTTTGGTTCA	PET (Vermelho)	200 – 295 pb		KNAPOVA; GISI, 2002
	Pi4B-Rev	GCAAGCGAGGTTTGTAGATT				
Pi63	Pi63-Fwd	VIC – ATGACGAAGATGAAAGTGAGG	VIC (Verde)	265 – 280 pb	LEES et al., 2006	
	Pi63-Rev	CGTATTTTCCTGTTTATCTAACACC				
Pi70	Pi70-Fwd	VIC – ATGAAAATACGTCAATGCTCG	VIC (Verde)	189 – 195 pb		
	Pi70-Rev	CGTTGGATATTTCTATTTCTTCG				
PiG11	PiG11-Fwd	NED – TGCTATTTATCAAGCGTGGG	NED (Amarelo)	130 – 180 pb		KNAPOVA; GISI, 2002
	PiG11-Rev	GTTTCAATCTGCAGCCGTAAGA				
PinfSSR2	SSR2-Fwd	PET – CGACTTCTACATCAACCGGC	PET (Vermelho)	165 – 180 pb		
	SSR2-Rev	GTTTGCTTGGACTGCGTCTTAGC				
PinfSSR3	SSR3-Fwd	NED – ACTTGCAGAACTACCGCCC	NED (Amarelo)	254 – 274 pb		
	SSR3-Rev	GTTTGACCACTTTCCTCGGTTT				
PinfSSR4	SSR4-Fwd	FAM – TCTTGTTTCGAGTATGCGACG	FAM (Azul)	280 – 305 pb	LI et al., 2010	
	SSR4-Rev	GTTTCACTTCGGGAGAAAGGCTTC				
PinfSSR6	SSR6-Fwd	GTTTTGGTGGGGCTGAAGTTTT	VIC (Verde)	230 – 250 pb		
	SSR6-Rev	VIC – TCGCCACAAGATTTATCCG				
PinfSSR8	SSR8-Fwd	FAM – AATCTGATCGCAACTGAGGG	FAM (Azul)	250 – 275 pb		
	SSR8-Rev	GTTTACAAGATACACACGTCGCTCC				
PinfSSR11	SSR11-Fwd	NED – TTAAGCCACGACATGAGCTG	NED (Amarelo)	325 – 360 pb		
	SSR11-Rev	GTTTAGACAATTGTTTTGTGGTCGC				

4.7. Teste de sensibilidade *in vitro* de isolados de *Phytophthora infestans* aos fungicidas, ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe

Para o experimento foram selecionados 17 isolados de *P. infestans*, de seis variações genotípicas escolhidas dentre as mais frequentes no presente estudo (Tabela 4).

O experimento foi instalado seguindo protocolo de Microtitulação de Dimetomorfe do FRAC (2006), com adaptações.

Discos de 0,7 cm de diâmetro dos isolados escolhidos foram retirados dos bordos de colônias, com dez dias de idade, e transferidos para o centro de placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio V8. Após as repicagens, as placas foram mantidas em fotoperíodo de 12 horas, a $16^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de dez dias.

Para obtenção do inóculo, os esporângios foram coletados adicionando-se 10 mL de meio líquido de ervilha (FRAC, 2006) em cada placa de Petri contendo o isolado crescido e feita uma raspagem do micélio com lâmina descartável estéril. A suspensão de esporângios foi filtrada em gaze esterilizada e a concentração foi ajustada para 10^4 esporângios. mL^{-1} com o auxílio de câmara de Neubauer.

Os princípios ativos utilizados neste experimento foram: ciazofamida (concentração: 34,50% m/v), propamocarbe (concentração: 72,20% m/v), clorotalonil (concentração: 50,00% m/v) e dimetomorfe (concentração: 50,00% m/v).

Para padronizar o teste de sensibilidade, todos os fungicidas selecionados foram utilizados nas concentrações de: 0; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 e $10\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, diluídas a partir de solução estoque dos fungicidas na concentração de $1000\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. (Figura 6).

Cada concentração do fungicida foi incubada com a suspensão de esporângios em triplicata.

Tabela 4. Isolados de *Phytophthora infestans* selecionados para o experimento de sensibilidade a fungicidas

Varição	Denominação	Cidade - Estado de Procedência	Planta hospedeira/Varietade
06	151	Santa Maria do Herval – RS	Batata
-	PRT	-	Batata
04	CRI-2	Cristal – RS	Batata
04	006	Pilar do Sul – SP	Batata / Agata
07	012C	Campo do Tenente – PR	Batata / Atlantic
09	023	Santa Juliana – MG	Batata / Markies
02	035B	Serra do Salitre – MG	Batata / Atlantic
07	042	Vargem Grande do Sul – SP	Batata / Ioná
07	051	Boa Vista – RR	Tomate / -
02	061	Ponta Grossa – PR	Batata / -
08	064	Tapira – MG	Batata / Atlantic
04	077	Vargem Grande do Sul – SP	Batata / FL 1867
04	093	Ponta Grossa – PR	Batata / -
04	109	Ponta Grossa – PR	Batata / Agata
04	117	Lapa – PR	Batata / Atlantic
04	136	Itapetininga – SP	Batata / Romeo
04	140	Leme – SP	Batata / -

*- Não consta.

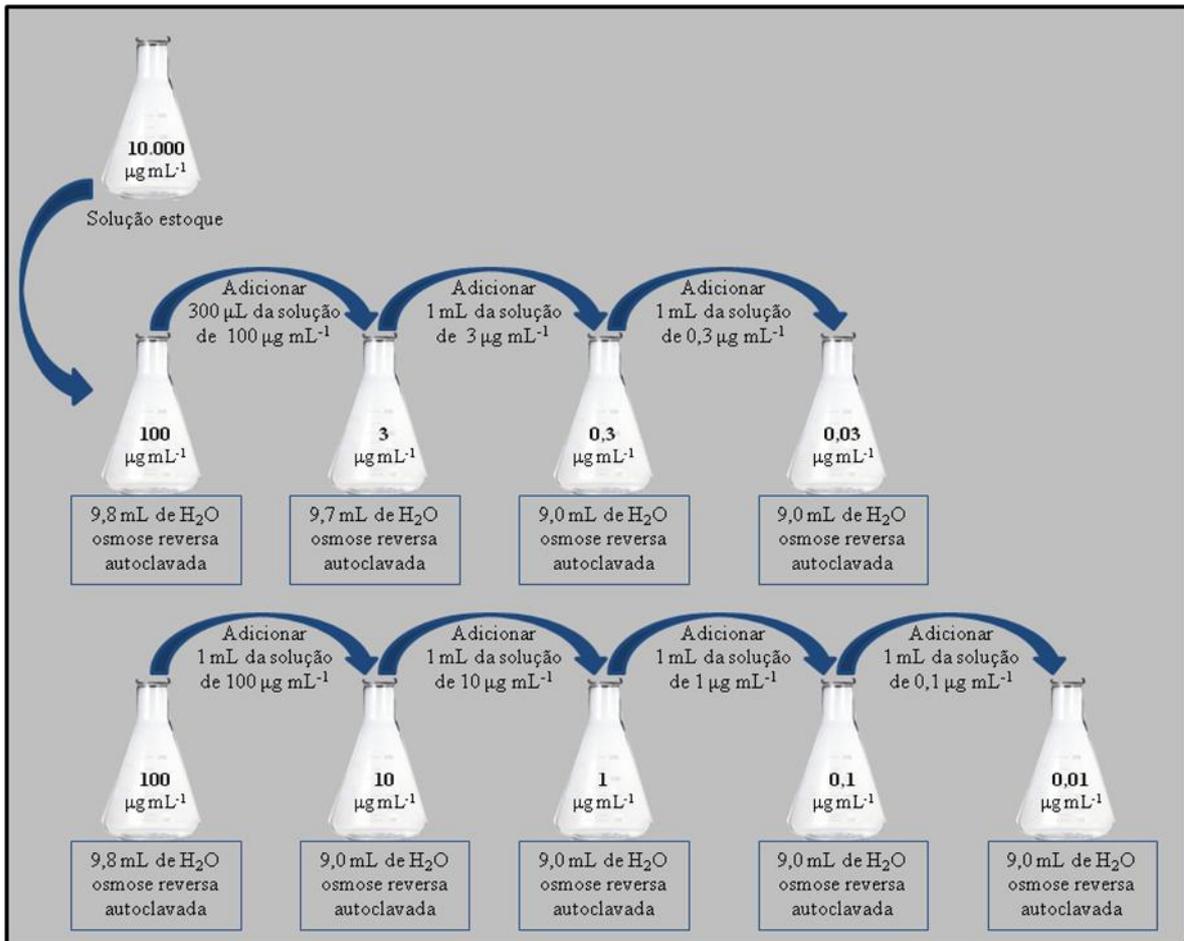


Figura 6. Esquema da diluição seriada dos princípios ativos de diferentes fungicidas, para a obtenção das concentrações utilizadas.

Para estudar a sensibilidade de cada isolado ao fungicida pelo teste de microtitulação colorimétrica, foram utilizadas microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços onde foram adicionados 50 µL da suspensão de esporângios na concentração 10^4 esporângios. mL⁻¹, seguido da adição de 50 µL das diferentes concentrações do fungicida, atingindo um volume final de 100 µL por poço.

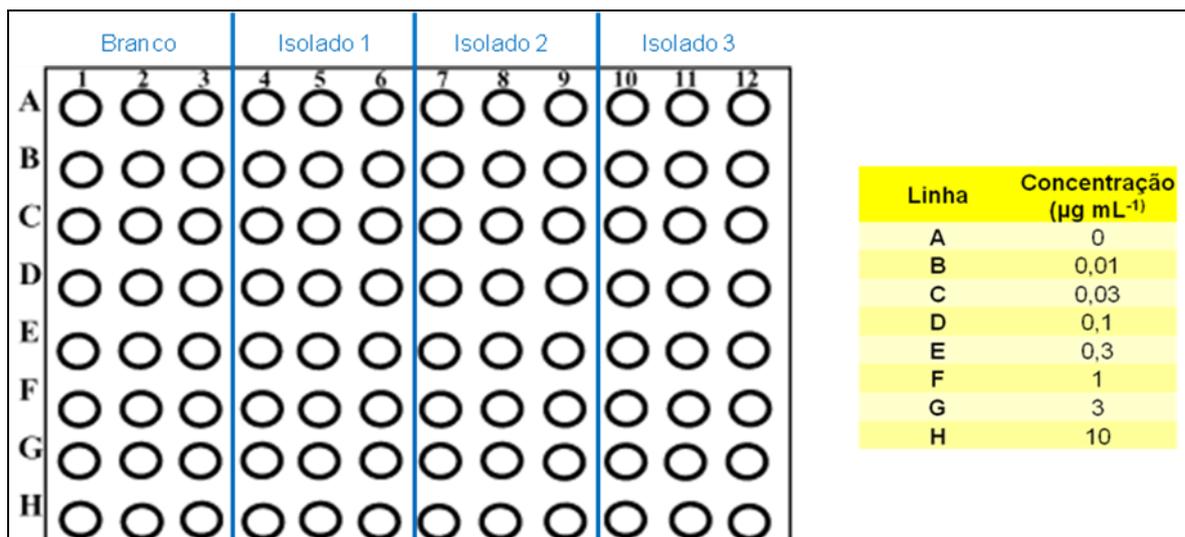


Figura 7. Esquema da microplaca de poliestireno estéril com 96 poços. Nas colunas são distribuídos isolados, e nas linhas as diluições dos princípios ativos.

As diluições dos fungicidas foram distribuídas em valores crescentes nas linhas (A H) e os isolados em triplicata por coluna (4 a 12) (Figura 7). Cada microplaca continha a testemunha (branco ou controle negativo) nas três primeiras colunas, onde foram adicionados 50 µL das diferentes concentrações do fungicida e 50 µL do meio líquido de ervilha sem esporângios, num volume final de 100 µL. Na primeira linha das colunas 4 a 12 foram colocados os controles positivos, onde eram adicionados 50 µL da suspensão de esporângios na concentração 10⁴ esporângios. mL⁻¹, seguido da adição de 50 µL de água de osmose reversa autoclavada.

As placas de poliestireno foram tampadas e envoltas com parafilme, para evitar a evaporação, e colocadas em mesa agitadora por 15 minutos, para homogeneizar a mistura do produto com a suspensão de esporângios. Posteriormente, foram mantidas em câmara de crescimento a 16 °C no escuro (as placas foram envoltas com papel alumínio), por cinco dias. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 405 nm. A média dos valores de absorbância obtida para as triplicatas de cada isolado em cada diluição do fungicida foi subtraída pela média da absorbância das triplicatas do branco/controle negativo da respectiva diluição.

Os dados foram analisados estatisticamente pela análise da variância e comparados pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Para calcular os valores de EC₅₀ (concentração do fungicida capaz de reduzir 50% do crescimento do patógeno) a partir das médias das absorbâncias obtidas nas

diferentes concentrações dos princípios ativos, plotou-se a % de redução no eixo Y e a concentração dos fungicidas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) no eixo X, este em escala logarítmica. A equação logarítmica de ajuste dos dados foi calculada, bem como o valor de R^2 para cada isolado em cada fungicida testado.

Equação das retas: $Y = -a \cdot \ln(x) + b$

Onde:

a e b = parâmetros da equação

X= concentração do fungicida ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Y = % redução do crescimento do patógeno

O valor de Y foi substituído por 50, em cada equação, obtendo-se a concentração do fungicida capaz de reduzir 50% do crescimento do patógeno.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Coleta de material infectado

No total, 144 amostras foram coletadas (Tabela 6) em campos e estufas de batata e tomate, sendo 82 amostras no Estado de São Paulo, 27 no Paraná, 20 em Minas Gerais, 13 no Rio Grande do Sul e duas em Roraima.

Com exceção das duas amostras de Roraima (1,39%), provenientes de estufa de tomate, as demais amostras de *P. infestans* foram coletadas nas regiões Sudeste (70,83%) e Sul (27,78%) do Brasil (Figura 8), regiões responsáveis por quase 90% da produção nacional e que apresentam condições climáticas ideais para o desenvolvimento da doença em períodos do ano com baixa temperatura e alta umidade.

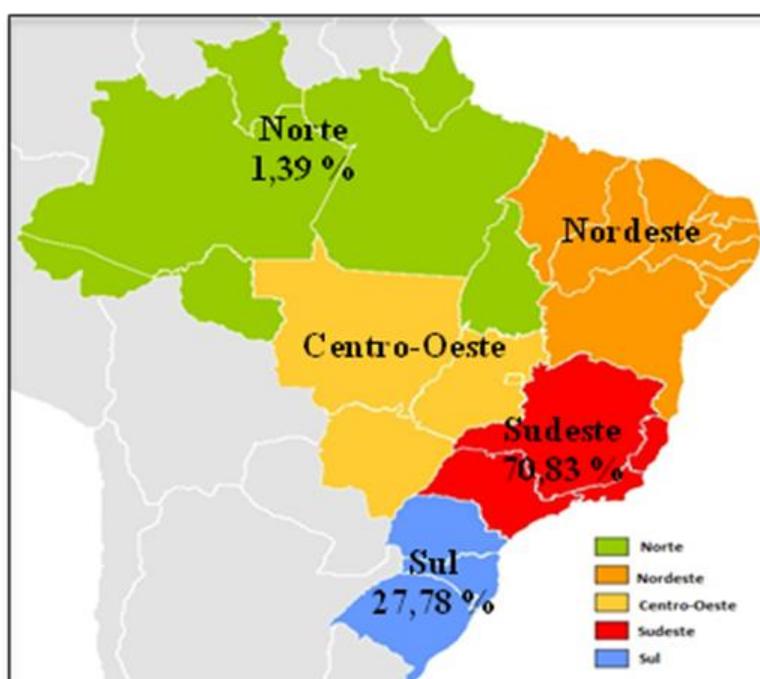


Figura 8. Origem das amostras de material botânico com sintomas típicos de requeima (*Phytophthora infestans*) coletadas por região no Brasil.

5.2. Monitoramento do tipo de reprodução

Das 144 amostras coletadas (Tabela 5), quatro apresentaram oósporos em órgãos infectados (Figura 9), indicando que nestes ocorreu reprodução sexuada de *P. infestans*: amostra nº 011, proveniente de Divinolândia/SP; nº 012, de – Campo do Tenente/PR; nº

035, de Serra do Salitre/MG e nº 142, de Itobi/SP. As demais amostras apresentaram apenas esporângios (Figura 10), estruturas de reprodução assexuada do patógeno.

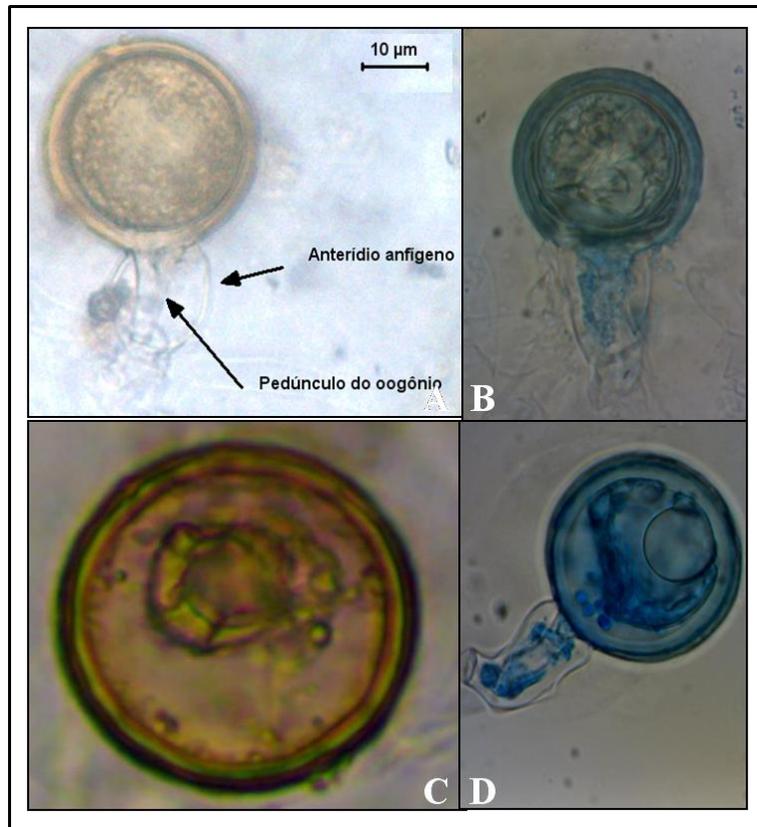


Figura 9. Estruturas reprodutivas sexuais de isolado de *Phytophthora infestans* do presente estudo. A, B e D - gametângios (anterídio, oogônio) e oósporo; C - oósporo; .
Fonte: A - Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli, B, C e D – Samantha Zanotta.

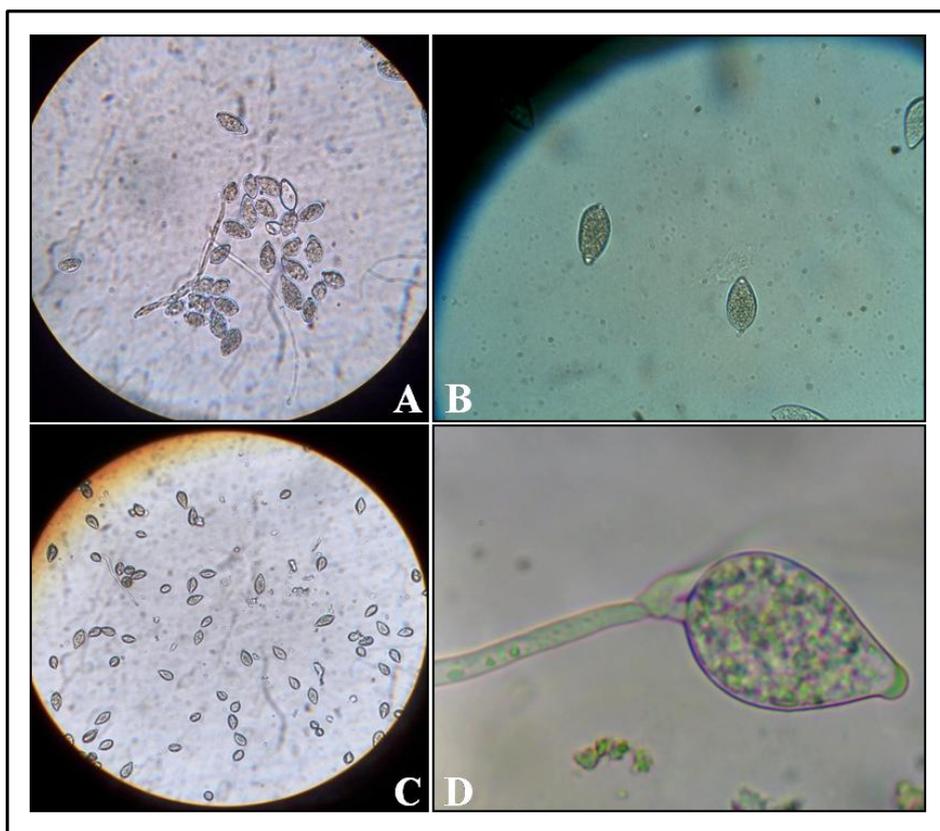


Figura 10. Estruturas reprodutivas assexuais de isolado de *Phytophthora infestans* do presente estudo. A a D – esporângios.

Segundo a bibliografia, a reprodução sexuada de *P. infestans* no Brasil por isolados autoférteis é recente. Em 2017, Casa-Coila e colaboradores, relataram a existência de isolados autoférteis de *P. infestans* no Brasil, no Estado do Paraná. Já a reprodução sexuada do patógeno numa mesma localidade, pelo pareamento de isolados pertencentes aos dois grupos de compatibilidade, ainda não foi registrada no Brasil.

Reis (2001) concluiu que a reprodução sexuada não ocorria nas populações de *P. infestans* amostradas no Brasil, levantando como hipóteses: (i) a especificidade do hospedeiro de duas linhagens clonais, como é o caso no Equador (OYARZUN et al., 1998), característica que faz com que a chance de ambos os tipos de acasalamento ocorrerem na mesma planta ser rara; (ii) se A1 e A2 estão presentes e se acasalam os oósporos não são viáveis, como observado por Mosa e colaboradores (1989) no Japão; (iii) se os oósporos são produzidos e germinados, a progênie é menos adaptada do que as cepas parentais, podendo não sobreviver, conforme observado em 2000 por Mayton e colaboradores.

Suassuna e colaboradores (2004) e Trentin (2006) também afirmaram que não existia reprodução sexuada de *P. infestans* no Brasil.

Em 2014, Casa-Coila mostrou a coexistência dos dois grupos de compatibilidade A1 e A2 de *P. infestans*, no Rio Grande do Sul, o que possibilitaria a ocorrência de reprodução sexuada, mas não foi possível afirmar a existência de reprodução sexual do patógeno.

5.3. Identificação do grupo de compatibilidade

As 144 coletas resultaram em 153 isolados (Tabela 5). Nas coletas realizadas em Divinolândia-SP (nº11), Campo do Tenente-PR (nº12) e Serra do Salitre-MG (nº 35), que apresentaram oósporos nos órgãos sintomáticos coletados, foram realizados mais de um isolamento.

Nos estudos de pareamento *in vitro*, foram avaliados 146 isolados, sendo um isolado de planta voluntária e os demais de batata, uma vez que os patógenos presentes em tomate não foram isolados em meio de cultura (seis isolados, ou seja, 3,92%). Dos isolados estudados, 130 foram identificados como pertencentes ao grupo de compatibilidade A1 (84,97%), quatro ao grupo A2 (2,61%) e 13 foram classificados como autoférteis (8,50%), pois apresentaram produção de oósporo sem a necessidade de pareamento com outro grupo de compatibilidade (Tabela 6).

Nos testes moleculares, foram analisados os 153 isolados. Destes, 142 apresentaram amplificação de um fragmento de aproximadamente 1250pb, quando amplificados com os iniciadores específicos S1-F e S1-R, indicando que estes pertencem ao grupo de compatibilidade A1, incluindo os isolados autoférteis. Quatro isolados apresentaram amplificação de um fragmento de aproximadamente 347pb, quando amplificados com os iniciadores específicos PHYB-1 e PHYB-2, indicando pertencerem ao grupo de compatibilidade A2. Sete isolados não apresentaram amplificação para nenhum dos iniciadores dos grupos de compatibilidade (Tabela 6).

Tabela 5. Identificação, procedência e identificação do grupo de compatibilidade dos isolados de *Phytophthora infestans* coletados no presente estudo

N°	Coleta (mês/ano)	Cidade / Estado	Latitude	Longitude	Altitude	Cultura / Variedade	Grupo de Compatibilidade	
							Pareamento “in vitro”	Molecular
001	mar/15	Mogi das Cruzes – SP	21° 59' 23" S	46° 30' 28" W	1.305 m	Batata / Agata	A1	A1
002	mar/15	Mogi das Cruzes – SP	21° 59' 23" S	46° 30' 28" W	1.305 m	Batata / Agata	A1	A1
003	mar/15	Divinolândia – SP	21° 45' 15,3" S	46° 37' 50,5" W	1.337 m	Batata / Agata	A1	A1
004	mar/15	Divinolândia – SP	21° 45' 15,3" S	46° 37' 50,5" W	1.337 m	Batata / Agata	A1	A1
005	mar/15	Divinolândia – SP	21° 45' 15,3" S	46° 37' 50,5" W	1.337 m	Batata / Agata	A1	A1
006	mar/15	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,60" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
007	mar/15	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,60" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
008	mar/15	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,60" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
009	abr/15	Divinolândia – SP	21° 45' 14,65" S	46° 37" 50,06" W	1354,5 m	Batata / Agata	A1	A1
010	abr/15	Divinolândia – SP	21° 45' 14,65" S	46° 37" 50,06" W	1354,5 m	Batata / Agata	A1	A1
011A	abr/15	Divinolândia – SP	21° 45' 14,65" S	46° 37" 50,06" W	1354,5 m	Batata / Agata	AF	A1
011B	abr/15	Divinolândia – SP	21° 45' 14,65" S	46° 37" 50,06" W	1354,5 m	Batata / Agata	AF	A1
012A	abr/15	Campo do Tenente – PR	25° 57' 25" S	49° 36' 16" W	840 m	Batata / Atlantic	AF	A1
012B	abr/15	Campo do Tenente – PR	25° 57' 25" S	49° 36' 16" W	840 m	Batata / Atlantic	AF	A1
012C	abr/15	Campo do Tenente – PR	25° 57' 25" S	49° 36' 16" W	840 m	Batata / Atlantic	AF	A1
012D	abr/15	Campo do Tenente – PR	25° 57' 25" S	49° 36' 16" W	840 m	Batata / Atlantic	AF	A1
012E	abr/15	Campo do Tenente – PR	25° 57' 25" S	49° 36' 16" W	840 m	Batata / Atlantic	AF	A1

013	abr/15	São Roque da Fartura - SP	21° 50' 3,45" S	46° 44' 4.24" W	1.303 m	Batata / -	A1	A1
014	abr/15	São Roque da Fartura - SP	21° 50' 3,45" S	46° 44' 4.24" W	1.303 m	Batata / -	A1	A1
015	abr/15	São Roque da Fartura - SP	21° 50' 3,45" S	46° 44' 4.24" W	1.303 m	Batata / -	A1	A1
016	abr/15	São Roque da Fartura - SP	21° 50' 3,45" S	46° 44' 4.24" W	1.303 m	Batata / -	A1	A1
017	abr/15	São Roque da Fartura - SP	21° 50' 3,45" S	46° 44' 4.24" W	1.303 m	Batata / -	A1	A1
018	abr/15	Itararé (UPD) – SP	24° 6' 32.17" S	49° 20' 8.47" W	764 m	Batata / Agata	A1	A1
019	abr/15	Itararé (UPD) – SP	24° 6' 32.17" S	49° 20' 8.47" W	764 m	Batata / Agata	A1	A1
020	abr/15	Itararé (UPD) – SP	24° 6' 32.17" S	49° 20' 8.47" W	764 m	Batata / Agata	A1	A1
021	abr/15	Itararé (UPD) – SP	24° 6' 32.17" S	49° 20' 8.47" W	764 m	Batata / Agata	A1	A1
022	abr/15	Itararé (UPD) – SP	24° 6' 32.17" S	49° 20' 8.47" W	764 m	Batata / Asterix	A1	A1
023	mai/15	Santa Juliana – MG	19° 21' 2,74" S	47° 21' 25,67" W	1.072 m	Batata / Markies	A1	A1
024	mai/15	Santa Juliana – MG	19° 21' 2,74" S	47° 21' 25,67" W	1.072 m	Batata / Markies	A1	A1
025	mai/15	Santa Juliana – MG	19° 21' 2,74" S	47° 21' 25,67" W	1.072 m	Batata / Markies	A1	A1
026	mai/15	Santa Juliana – MG	19° 21' 2,74" S	47° 21' 25,67" W	1.072 m	Batata / Markies	A1	A1
027	mai/15	Santa Juliana – MG	19° 21' 2,74" S	47° 21' 25,67" W	1.072 m	Batata / Markies	A1	A1
028	mai/15	Mogi Mirim – SP	22° 25' 23,36" S	46° 57' 29,701" W	642 m	Tomate / -	NA	A2
029	jun/15	Passo Fundo – RS	28° 15' 44.14" S	52° 24' 37.01" W	679 m	Batata / Mistura de Cultivares	A1	A1
030	jun/15	Passo Fundo – RS	28° 15' 44.14" S	52° 24' 37.01" W	679 m	Batata / Mistura de Cultivares	A1	A1
031	jun/15	Passo Fundo – RS	28° 15' 44.14" S	52° 24' 37.01" W	679 m	Batata / Macaca	A1	A1
032	jun/15	Passo Fundo – RS	28° 15' 44.14" S	52° 24' 37.01" W	679 m	Batata / Macaca	A1	A1

033	jun/15	Passo Fundo – RS	28° 15' 44.14" S	52° 24' 37.01" W	679 m	Batata / Macaca	A1	A1
034	jun/15	Ibiraiaras – RS	28° 22' 17.28" S	51° 38' 2.039" W	769 m	Planta voluntária	A1	A1
035A	jul/15	Serra do Salitre – MG	18° 56' 31,93" S	46° 36' 21,93" W	889 m	Batata / Atlantic	AF	A1
035B	jul/15	Serra do Salitre – MG	18° 56' 31,93" S	46° 36' 21,93" W	889 m	Batata / Atlantic	AF	A1
035C	jul/15	Serra do Salitre – MG	18° 56' 31,93" S	46° 36' 21,93" W	889 m	Batata / Atlantic	AF	A1
035D	jul/15	Serra do Salitre – MG	18° 56' 31,93" S	46° 36' 21,93" W	889 m	Batata / Atlantic	AF	A1
035E	jul/15	Serra do Salitre – MG	18° 56' 31,93" S	46° 36' 21,93" W	889 m	Batata / Atlantic	AF	A1
036	jul/15	Itararé (UPD) – SP	24° 6' 32.17" S	49° 20' 8.47" W	764 m	Batata / -	A1	A1
037	jul/15	Itararé (UPD) – SP	24° 6' 32.17" S	49° 20' 8.47" W	764 m	Batata / -	A1	A1
038	jul/15	Itararé (UPD) – SP	24° 6' 32.17" S	49° 20' 8.47" W	764 m	Batata / -	A1	A1
039	jul/15	Vargem Grande do Sul - SP	21° 49' 31,4" S	46° 57' 49,3" W	690,5 m	Batata / Atlantic	A1	A1
040	jul/15	Vargem Grande do Sul – SP	21° 51' 27,8" S	47° 0' 45,1" W	701 m	Batata / 5 variedades diferentes	A1	A1
041	jul/15	Vargem Grande do Sul – SP	21° 51' 27,8" S	47° 0' 45,1" W	701 m	Batata / 5 variedades diferentes	A1	A1
042	jul/15	Vargem Grande do Sul - SP	21° 51' 27,8" S	47° 0' 45,1" W	701 m	Batata / Ioná	A1	NIM
043	ago/15	Itobi – SP	21° 43' 24,8" S	46° 59' 41,3" W	654,5 m	Batata / -	A2	A2
044	ago/15	Itobi – SP	21° 43' 24,8" S	46° 59' 41,3" W	654,5 m	Batata / -	A2	A2
045	ago/15	Vargem Grande do Sul - SP	21° 50' 14,5" S	47° 0' 46,2" W	714 m	Batata / Taurus	A1	A1
046	jul/15	Vargem Grande do Sul - SP	21° 49' 31,4" S	46° 57' 49,3" W	690,5 m	Batata / Atlantic	A1	A1
047	out/15	Lavras – MG	21° 14' 54,43"S	45° 0' 5.01" W	928 m	Batata / -	A1	A1
048	out/15	Lavras – MG	21° 14' 54,43"S	45° 0' 5.01" W	928 m	Batata / -	A1	A1

049	out/15	Tatuí – SP	23° 20' 57.19" S	47° 50' 47.67" W	614 m	Batata / -	A1	A1
050	nov/15	Guarapuava – PR	25° 23' 26.60" S	51° 27' 46.11" W	1.103 m	Batata / Agata	A1	A1
051	nov/15	Boa Vista – RR	2° 49' 24.63" N	60° 40' 33" W	82 m	Tomate / -	NA	A1
052	nov/15	Lapa – PR	25° 43' 58.71" S	49° 43' 51.874" W	926 m	Batata / -	A1	A1
053	nov/15	Lapa – PR	25° 43' 58.71" S	49° 43' 51.874" W	926 m	Batata / -	A1	A1
054	nov/15	Cordeirópolis – SP	22° 28' 4,7" S	47° 24' 29,7" W	720,5 m	Tomate / -	NA	A1
055	dez/15	Divinolândia – SP	21° 38' 17,25" S	46° 43' 54,45" W	1.242 m	Batata / Agata	A1	A1
056	dez/15	Divinolândia – SP	21° 38' 17,25" S	46° 43' 54,45" W	1.242 m	Batata / Agata	A1	NIM
057	dez/15	Divinolândia – SP	21° 38' 17,25" S	46° 43' 54,45" W	1.242 m	Batata / Agata	A1	A1
058	dez/15	Divinolândia – SP	21° 41' 20,78" S	46° 38' 34,41" W	1.360 m	Batata / Agata	A1	A1
059	dez/15	Divinolândia – SP	21° 41' 20,78" S	46° 38' 34,41" W	1.360 m	Batata / Agata	A1	A1
060	jan/16	Lapa – PR	25° 43' 58.70" S	49° 43' 51.87" W	926 m	Batata / -	A1	A1
061	jan/16	Ponta Grossa – PR	25° 4' 13.25" S	50° 17' 47.61" W	938 m	Batata / -	A1	A1
062	jan/16	Ponta Grossa – PR	25° 4' 13.25" S	50° 17' 47.61" W	938 m	Batata / -	A1	A1
063	jan/16	Tapira – MG	19° 55' 03,8" S	46° 42' 01,2" W	1.313,5 m	Batata / Atlantic	A1	NIM
064	jan/16	Tapira – MG	19° 58' 05,9" S	46° 37' 34,5" W	1.231,5 m	Batata / Atlantic	A1	NIM
065	jan/16	São Roque da Fartura - SP	21° 50' 46" S	46° 44' 11" W	1.367 m	Batata / Agata	A1	A1
066	mar/16	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,59" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
067	mar/16	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,59" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
068	mar/16	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,59" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
069	mar/16	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,59" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
070	mar/16	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,59" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1

071	mar/16	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,59" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
072	mar/16	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,59" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
073	mar/16	Pilar do Sul – SP	23° 47' 57,59" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
074	jul/16	Vargem Grande do Sul - SP	21° 45' 51" S	46° 58' 34" W	658,5 m	Batata / Atlantic	A1	A1
075	jul/16	Vargem Grande do Sul - SP	21° 45' 41" S	46° 58' 29" W	660,5 m	Batata / Atlantic	A1	A1
076	jul/16	Vargem Grande do Sul - SP	21° 45' 42" S	46° 58' 29" W	659,5m	Batata / FL 1867	A1	A1
077	jul/16	Vargem Grande do Sul - SP	21° 45' 42" S	46° 58' 29" W	659,5m	Batata / FL 1867	A1	A1
078	jul/16	Vargem Grande do Sul – SP	21° 41' 40" S	46° 59' 28" W	671,5 m	Batata / Orchestra	A1	A1
079	mar/15	Mogi Mirim – SP	22° 25' 23,36" S	46° 57' 29,70" W	642 m	Tomate / -	NA	A1
080	nov/15	Cordeirópolis – SP	22° 28' 4,7" S	47° 24' 29,7" W	720,5 m	Tomate / -	NA	A1
081	nov/15	Boa Vista – RR	2° 49' 24,63" N	60° 40' 33" W	82 m	Tomate / -	NA	A1
082	out/15	Divinolândia – SP	23° 47' 57,59" S	47° 35' 29,38" W	881 m	Batata / Agata	A1	A1
083	out/15	Pilar do Sul – SP	21° 45' 14,65" S	46° 37' 50,06" W	1.354,5 m	Batata / Agata	A1	A1
084	out/15	Pilar do Sul – SP	21° 45' 14,65" S	46° 37' 50,06" W	1.354,5 m	Batata / Agata	A1	A1
085	mai/16	São Miguel Arcanjo – SP	23° 52' 43,27" S	23° 52' 43,27" S	661 m	Batata / -	A1	A1
086	mai/16	São Miguel Arcanjo – SP	23° 52' 43,27" S	23° 52' 43,27" S	661 m	Batata / -	A1	A1
087	mai/16	São Paulo – SP	-	-	-	Batata / -	A1	A1
088	mai/16	São Paulo – SP	-	-	-	Batata / -	A1	A1
089	out/15	Lavras – MG	21° 14' 54,43" S	45° 0' 5,01" W	928 m	Batata / -	A1	A1
090	mai/16	Campestre – MG	21° 42' 36,50" S	46° 14' 56,35" W	650 m	Batata/BRS-Bel	A1	A1
091	mai/16	Campestre – MG	21° 42' 36,50" S	46° 14' 56,35" W	650 m	Batata/BRS-Bel	A1	A1
092	jan/15	Ponta Grossa – PR	25° 4' 13,25" S	50° 17' 47,61" W	938 m	Batata / -	A1	A1

093	out/15	Ponta Grossa – PR	25° 4' 13.25" S	50° 17' 47.61" W	938 m	Batata / -	A1	A1
094	out/15	Ponta Grossa – PR	25° 4' 13.25" S	50° 17' 47.61" W	938 m	Batata / -	A1	NIM
095	out/15	Lapa – PR	25° 38' 39" S	49° 49' 59" W	905,0 m	Batata / -	A1	A1
096	out/15	Lapa – PR	25° 38' 39" S	49° 49' 59" W	905,0 m	Batata / -	A1	A1
097	mai/16	Ibiraiaras – RS	28° 22' 17.28" S	51° 31' 47.33" W	796 m	Batata / Agata	A1	A1
098	mai/16	Ibiraiaras – RS	28° 22' 17.28" S	51° 31' 47.33" W	796 m	Batata / Agata	A1	A1
099	mai/16	Ibiraiaras – RS	28° 22' 17.28" S	51° 31' 47.33" W	796 m	Batata / Agata	A1	A1
100	mai/16	Lagoa Vermelha – RS	28° 12' 34.41" S	51° 31' 47.33" W	792 m	Batata / Agata	A1	A1
101	jul/16	Vargem Grande do Sul - SP	21° 55' 38" S	47° 07' 32" W	644,0 m	Batata / Atlantic	A1	A1
102	jul/16	Vargem Grande do Sul - SP	21° 46' 03" S	46° 58' 41" W	645,5 m	Batata / FL 1867	A1	A1
103	jul/16	Vargem Grande do Sul - SP	21° 51' 28" S	46° 59' 58" W	719,0 m	Batata / FL 1867	A1	A1
104	set/16	Ponta Grossa – PR	25° 09' 23.92" S	50° 08' 38.92" W	830,0 m	Batata / Agata	A1	A1
105	set/16	Ponta Grossa – PR	25° 09' 23.92" S	50° 08' 38.92" W	830,0 m	Batata / Agata	A1	A1
106	set/16	Ponta Grossa – PR	25° 09' 23.92" S	50° 08' 38.92" W	830,0 m	Batata / Agata	A1	A1
107	set/16	Ponta Grossa – PR	25° 09' 23.92" S	50° 08' 38.92" W	830,0 m	Batata / Agata	A1	A1
108	set/16	Ponta Grossa – PR	25° 09' 23.92" S	50° 08' 38.92" W	830,0 m	Batata / Agata	A2	NIM
109	set/16	Ponta Grossa – PR	25° 09' 23.92" S	50° 08' 38.92" W	830,0 m	Batata / Agata	A2	NIM
110	dez/16	Paraná – PR	25° 15' 7.52" S	52° 1' 17.55" W	765 m	Batata / -	A1	A1
111	dez/16	Bom Jesus – RS	28° 42' 44,4" S	50° 18' 32,1" W	1.098 m	Batata / Atlantic	A1	A1
112	dez/16	Bom Jesus – RS	28° 42' 56,0" S	50° 18' 05,6" W	1.132 m	Batata / Atlantic	A1	A1
113	dez/16	Bom Jesus – RS	28° 43' 09,8" S	50° 18' 13,9" W	1.109 m	Batata / Atlantic	A1	A1
114	jan/17	Lapa – PR	25° 38' 35" S	49° 49' 53,98" W	926 m	Batata / Manitou	A1	A1

115	jan/17	Lapa – PR	25° 38' 35" S	49° 49' 53,98" W	926 m	Batata / Romeo	A1	A1
116	fev/17	Lapa – PR	25° 38' 35" S	49° 49' 53,98" W	926 m	Batata / Manitou	A1	A1
117	fev/17	Lapa – PR	25° 38' 35" S	49° 49' 53,98" W	926 m	Batata / Atlantic	A1	A1
118	abr/17	Água-Doce – PR	26° 34' 40" S	51° 48' 28" W	1.234 m	Batata / Agata	A1	A1
119	abr/17	Lagoa Seca – PR	25° 30' 51" S	51° 52' 25" W	946 m	Batata / -	A1	A1
120	abr/17	Lagoa Seca – PR	25° 30' 52" S	51° 52' 25" W	943 m	Batata / -	A1	A1
121	abr/17	Castrolanda – PR	24° 49' 25" S	49° 53' 22" W	1.017 m	Batata / Agata	A1	A1
122	jun/17	Tapira – MG	19° 58' 05,9"	46° 37' 34,5" W	1.231,5 m	Batata / Atlantic	A1	A1
123	jun/17	Tapira – MG	19° 58' 05,9"	46° 37' 34,5" W	1.231,5 m	Batata / Atlantic	A1	A1
124	jun/17	Bom Repouso – MG	22° 28' 3,28" S	46° 9' 0,587" W	1.388 m	Batata / Agata	A1	A1
125	jun/17	Itapetininga – SP	23° 31' 47,58" S	48° 4' 53,85" W	723 m	Batata / Atlantic	A1	A1
126	jun/17	Santa Juliana – MG	19° 21' 2,74" S	47° 21' 25,67" W	1.072 m	Batata / Asterix	A1	A1
127	jun/17	Santa Juliana – MG	19° 20' 30,45" S	47° 22' 4,6" W	1.064 m	Batata / Asterix	A1	A1
128	jun/17	Santa Juliana – MG	19° 17' 33,99" S	47° 25' 56,35" W	1.028 m	Batata / Asterix	A1	A1
129	jun/17	Vargem Grande do Sul - SP	21° 47' 11,03" S	46° 58' 9,75" W	705 m	Batata / FL 1867	A1	A1
130	jun/17	Vargem Grande do Sul - SP	21° 47' 11,05" S	46° 58' 9,83" W	705 m	Batata / FL 1867	A1	A1
131	jun/17	Vargem Grande do Sul - SP	21° 45' 45,57" S	46° 58' 22,81" W	667 m	Batata / FL 1867	A1	A1
132	jun/17	Taquarituba – SP	23° 43' 58,68" S	49° 7' 24,16" W	669 m	Batata / Atlantic	A1	A1
133	jun/17	Taquarituba – SP	23° 43' 58,68" S	49° 7' 24,16" W	669 m	Batata / Atlantic	A1	A1
134	jun/17	Itapetininga – SP	23° 31' 47,58" S	48° 4' 53,85" W	723 m	Batata / Atlantic	A1	A1
135	jun/17	Itapetininga – SP	23° 31' 47,58" S	48° 4' 53,85" W	723 m	Batata / Atlantic	A1	A1
136	jun/17	Itapetininga – SP	23° 31' 58,75" S	48° 5' 11,37" W	711 m	Batata / Romeo	A1	A1

137	jun/17	Itapetininga – SP	23° 31' 19,95" S	48° 9' 22,7" W	751 m	Batata / Infinity	A1	A1
138	jun/17	Itapetininga – SP	23° 31' 19,95" S	48° 9' 22,7" W	751 m	Batata / Atlantic	A1	A1
139	jun/17	Sorocaba – SP	23° 31' 23,23" S	48° 9' 23,19" W	764 m	Batata / Agata	A1	A1
140	jul/17	Leme – SP	22° 11' 21,29" S	47° 23' 52,14" W	616 m	Batata / -	A1	A1
141	jul/17	Pouso Alegre – MG	22° 14' 52,93" S	45° 56' 31,24" W	816 m	Batata / -	A1	A1
142	ago/17	Itobi – SP	21° 42' 12,8" S	46° 59' 20,81" W	711 m	Batata / Markies	AF	A1
143	ago/17	Casa Branca – SP	21° 44' 19,44" S	47° 9' 36,66" W	675 m	Batata / Markies	A1	A1
144	mai/15	Mogi Mirim – SP	22° 25' 23,36" S	46° 57' 29,70" W	642 m	Tomate / -	NA	A2
CRI-2	Isolado padrão A1	Cristal / RS	-	-	-	Batata / -	A2	NIM
PRT	Isolado padrão A1		-	-	-	Tomate / -	A1	A1
151	Isolado padrão A2	Santa Maria do Herval / RS	-	-	-	Batata / -	A1	A1

A1= Grupo de compatibilidade A1; A2 = Grupo de compatibilidade A2; AF = Isolado autofértil; NA = não avaliado; NIM – não identificado molecularmente.

Em Mogi Mirim-SP e em Ponta Grossa- PR os dois grupos de compatibilidade foram observadas em uma mesma localidade

Tabela 6. Número de isolados de *Phytophthora infestans* pertencentes a cada Grupo de Compatibilidade quando avaliados pelo método de pareamento “in vitro” e pelos métodos moleculares.

Grupo de Compatibilidade	Pareamento “in vitro”	Moleculares
	Nº de A1 ou A2 / Nº total de isolados (%)	Nº de A1 ou A2 / Nº total de isolados (%)
A1	129 / 146 (88,36%)	142 / 146 (97,26%)
A2	04 / 146 (2,74 %)	04 / 146 (2,74%)
Autofértil	13 / 146 (8,90%)	-

Segundo Suassuna e colaboradores (2001), a alta especificidade por hospedeiro fazia com que isolados A1 fossem associados ao tomateiro, enquanto isolados A2 à batata. Porém, o cenário observado no presente estudo mostrou que, isolados de *P. infestans* do grupo de compatibilidade A1 predominam em batata. Entretanto, não se sabe qual grupo de compatibilidade predomina atualmente em tomate no Brasil, pois foram avaliadas poucas amostras desta cultura.

Em 2006, Reis, Ribeiro e Mizubuti identificaram 78 isolados de *P. infestans* oriundos de tomate, proveniente do Distrito Federal e Goiás, como pertencentes ao grupo de compatibilidade A1 e 45 isolados de batata como pertencentes ao grupo de compatibilidade A2. Casa-Coila (2014) identificou ambos os grupos de compatibilidade em plantações de batata na região Sul do Brasil, com 20 isolados pertencentes ao grupo de compatibilidade A1, 54 isolados ao grupo de compatibilidade A2 e 27 isolados caracterizados como autoférteis. Portanto, a sequência de estudos mostra uma rápida desalojamento das linhagens do grupo A2, então predominantes em batata, pelas linhagens do grupo A1.

Alguns isolados brasileiros foram submetidos à amplificação com os iniciadores W16-1 e W16-2, e apresentaram um fragmento de aproximadamente 600 pb. As sequências destes fragmentos foram analisadas e em seus eletroferogramas foi observado polimorfismo para os isolados A1, que são heterozigotos para esta região do genoma, o mesmo estando ausente nos isolados A2, que são homozigotos (Figuras 11.a e 11.b).

As diferenças entre os grupos de compatibilidade A1 e A2 utilizando os iniciadores moleculares W16-1 e W16-2, foram evidenciadas também por Mazakova e colaboradores (2010) que ao digerirem o fragmento amplificado com os iniciadores moleculares, aproximadamente 557 pb de seus isolados, com a enzima de restrição *Hae* III (*Bsu*RI) (reconhece a sequência GGCC), detectaram que os produtos derivados de isolados pertencentes ao grupo de compatibilidade A1 apresentaram três fragmentos com tamanhos de aproximadamente 557, 457 e 100 pb e os pertencentes ao grupo de compatibilidade A2 apresentaram dois fragmentos de 457 e 100 pb.

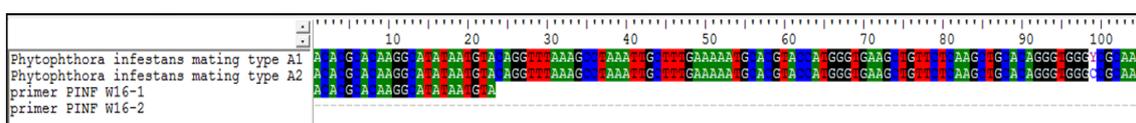


Figura 11.a. Sequências de fragmentos de DNA de isolados de *Phytophthora infestans* pertencentes ao grupo de compatibilidade A1 e A2, amplificados com iniciadores W16-1 e W16-2.

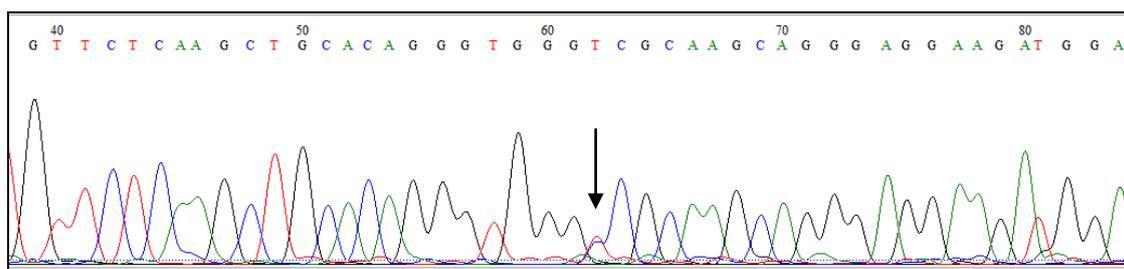


Figura 11.b. Polimorfismo encontrado em eletroferograma de um isolado pertencente ao grupo de compatibilidade A1. A seta indica a sobreposição de picos das bases C e T.

Ao correlacionar os resultados do pareamento *in vitro* com os obtidos por amplificação por PCR utilizando os iniciadores S1, PHYB e W16 podemos concluir que os marcadores moleculares foram uma ferramenta útil para a determinação do grupo de compatibilidade, mesmo quando o patógeno não foi isolado da planta hospedeira.

Mazakova e colaboradores (2010) ao estudarem a população de *P. infestans* na República Checa quanto aos grupos de compatibilidade, não detectaram diferenças entre os resultados quando comparados os testes de pareamento *in vitro* e de amplificação por PCR utilizando os iniciadores W16-1 e W16-2, e digestão com a enzima de restrição *Hae* III (*Bsu*RI). Por outro lado, Beketova e colaboradores (2014), ao determinarem o grupo de compatibilidade de isolados da Rússia utilizando a mesma metodologia observaram uma diferença de 10% entre os resultados dos testes *in vitro* e molecular. Em 2015, na Índia, Chowdappa e colaboradores observaram que

todos os 157 isolados testados eram do tipo de acasalamento A2 e os resultados de ambos os testes foram consistentes.

Wang, Han e Guo (2016) ao compararem os resultados obtidos no teste de pareamento *in vitro* com os de amplificação por PCR utilizando os iniciadores S1, LB e W16, relataram que os iniciadores moleculares estudados não foram eficazes na identificação do grupo de compatibilidade. O melhor resultado apresentado foi com os iniciadores específicos S1-F e S1-R (ZHANG et al., 2006) com a eficiência de 81,53%, seguido pelos iniciadores LB-1F e LB-1R descritos por Judelson (1996) com 73,84% e os iniciadores W16-F e W16-R (JUDELSON; SPIELMAN; SHATTOCK, 1995) com 67,69%.

Na Polônia em 2018, Brylinska e colaboradores com o objetivo de validar os iniciadores moleculares W16, S1 e PHYB para a identificação do grupo de compatibilidade de *P. infestans*, obtiveram 10% (15 isolados) de discrepância nos resultados na determinação do tipo de acasalamento dos isolados quando comparados os resultados entre os iniciadores.

Vale ressaltar que os iniciadores moleculares descritos por Kim e Lee (2002) assim como os descritos por Judelson, Spielman e Shattock, 1995, para a identificação de grupo de compatibilidade de isolados de *P. infestans* ainda não tinham sido utilizados no Brasil e que nenhum dos métodos moleculares pode identificar isolados autoférteis.

5.4. Caracterização molecular por microssatélite (SSR)

Para a caracterização molecular via SSR foram utilizados 12 pares de marcadores microssatélites que apresentaram perfis polimórficos (Figura 12) para os 155 isolados de *Phytophthora infestans* utilizados neste estudo (153 coletados neste estudo e 2 padrões).

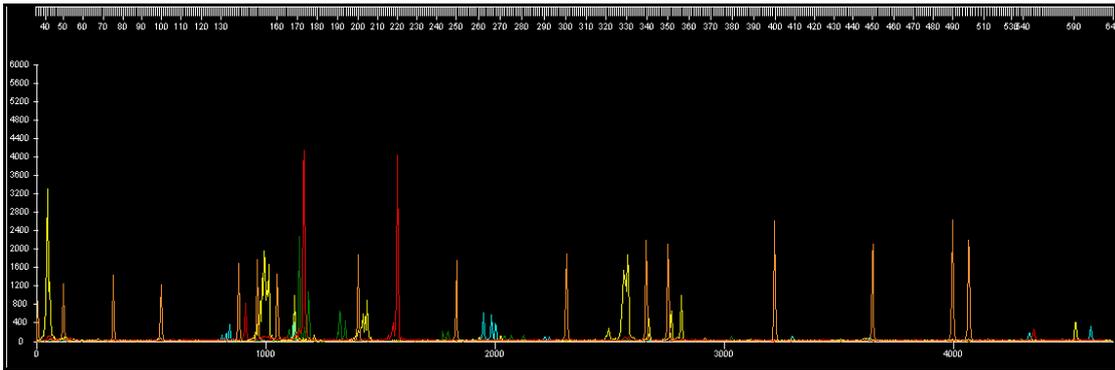


Figura 12. Perfil de um isolado de *Phytophthora infestans* obtido com os 12 pares de marcadores microssatélites.

Foram detectados no total, 42 alelos (Tabela 7), nos 12 lócus analisados. O lócus PiG11 foi o que mais apresentou alelos, com seis, e os lócus SSR2 e SSR6 foram os que apresentaram menos alelos, com dois alelos cada.

Tabela 7. Número de alelos existentes mundialmente para *Phytophthora infestans* e número de alelos detectado por lócus nos isolados presente estudo

Lócus	Nº de alelos existentes / Nº de alelos detectados	Alelos detectados
D13	28 / 04	136 / 140 / 142 / 166
Pi04	05 / 04	160 / 166 / 168 / 170
Pi4B	08 / 03	213 / 219 / 297
Pi63	03 / 03	270 / 273 / 279
Pi70	03 / 03	189 / 192 / 195
PiG11	28 / 06	150 / 152 / 154 / 200 / 204 / 206
PinfSSR2	03 / 02	173 / 177
PinfSSR3	06 / 04	264 / 266 / 268 / 270
PinfSSR4	08 / 05	285 / 287 / 289 / 291 / 293
PinfSSR6	04 / 02	242 / 244
PinfSSR8	03 / 03	260 / 264 / 266
PinfSSR11	03 / 03	330 / 340 / 356

As frequências dos alelos encontrados nos 155 isolados estudados variaram de 100 a 0,65% (Tabela 8). No lócus D13 foram encontrados quatro alelos apresentando frequências distintas: o alelo 136 teve frequência de 99,35% nos isolados analisados, o

alelo 140 teve 3,25%, o 142 teve 1,30% e o 166 teve 0,65%. Em 95,45% dos isolados o locus foi homozigoto com o alelo 136.

No locus Pi04 foram encontrados também quatro alelos: os alelos 160, 166 e 170 com frequência de 99,35% e o alelo 168 com 1,30%.

No locus Pi4B foram encontrados três alelos: os alelos 213 e 297 tiveram a frequência de 0,65% e o alelo 219 apresentou frequência de 99,35%. O locus foi homozigoto para dois alelos, o 219 em 99,35% dos isolados e 297 em 0,65%.

No locus Pi63 encontramos três alelos: os alelos 270 e 273 tiveram a frequência de 98,70% e o alelo 279 apresentou frequência um pouco menor, de 98,70%. Em 1,30% dos isolados o locus foi homozigoto com o alelo 270.

No locus Pi70 foram encontrados novamente três alelos, 189, 192 e 195 com as frequências de 0,65%, 100% e 99,35% respectivamente.

No locus G11, foi encontrado o maior número de alelos, seis: os alelos 150 e 200 tiveram frequências de 0,65%, o alelo 204 de 11,04%, o 206 apresentou frequência de 88,31%, 154 teve 99,35% e o 152 100%.

No locus SSR2 foram encontrados apenas dois alelos: o alelo 173 teve frequência de 100% nos isolados analisados e o alelo 177 que teve 1,30%. Neste locus, 98,70% dos isolados foram homozigotos para o alelo 173.

No locus SSR3 foram encontrados quatro alelos com frequências distintas: o alelo 264 com 0,65%, o 266 com 1,30%, o 268 com 98,05% e o 270 com 99,35%.

No locus SSR4 encontramos cinco alelos: os alelos 285 e 287 com a frequência de 0,65%, o alelo 289 com 88,31% de frequência, o 291 com 99,35% e o 293 com 100%.

O locus SSR6 apresentou dois alelos, um com 100% de frequência, 242 e o outro com 99,35%. Em 0,65% dos isolados o locus apresentou-se homozigoto para o alelo 242.

Nos dois últimos locus analisados, SSR8 e SSR11, foram encontrados três alelos. No primeiro, os três alelos, 260, 264 e 266 apresentaram a mesma frequência de 99,35%, sendo que em 0,65% dos isolados o locus foi homozigoto com o alelo 266. Já no locus SSR11 os alelos 340 e 356 tiveram a frequência de 100% nos isolados analisados e o alelo 330 teve 6,49%.

Segundo Rupp (2008) são chamados de locus homozigoto aqueles que apresentam o mesmo número de repetições em ambos os cromossomos homólogos. Locus heterozigoto apresentam um número diferente de repetições para cada alelo.

Entretanto, no mesmo locus a população ao todo contém geralmente diversos alelos, cada um com um número diferente de repetições. Isso significa que os marcadores de microssatélites (SSR) são úteis para discriminar indivíduos diferentes.

Tabela 8. Frequência dos alelos no estudo molecular por SSR nos isolados de *Phytophthora infestans* do presente estudo

Locus	Alelos	Nº de Isolados	Frequência (%)
D13	136	154	99,35%
	140	5	3,22%
	142	2	1,29%
	166	1	0,64%
Pi04	160	154	99,35%
	166	154	99,35%
	168	2	1,29%
	170	154	99,35%
Pi4B	213	1	0,64%
	219	154	99,35%
	297	1	0,64%
Pi63	270	155	100%
	273	153	98,70%
	279	153	98,70%
Pi70	189	1	0,64%
	192	155	100%
	195	154	99,35%
G11	150	1	0,64%
	152	155	100%
	154	154	99,35%
	200	1	0,64%
	204	17	10,96%
SSR2	206	136	87,74%
	173	155	100%
SSR3	177	2	1,29%
	264	1	0,64%
	266	2	1,29%

	268	152	98,06%
	270	154	99,35%
	285	1	0,64%
	287	1	0,64%
SSR4	289	136	87,74%
	291	154	99,35%
	293	155	100%
	242	155	100%
SSR6	244	154	99,35%
	260	154	99,35%
SSR8	264	154	99,35%
	266	154	99,35%
	330	10	6,45%
SSR11	340	155	100%
	356	155	100%

Analisando os 155 perfis polimórficos obtidos dos isolados de *P. infestans* neste estudo, foram encontradas 16 variações (Tabela 9).

Tabela 9. Variações encontradas entre os perfis polimórficos obtidos com os marcadores microssatélites (SSR) dos isolados *Phytophthora infestans* do presente estudo

Variação	D13			Pi04			Pi4B			Pi63			Pi70			G11			SSR2			SSR3			SSR4			SSR6			SSR8			SSR11		
	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.
01	136	140	0	160	166	168	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
02	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	204	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
03	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	330	340	356
04	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
05	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	270	270	0	291	293	0	242	244	0	260	264	266	340	356	0
06	136	136	0	160	166	170	219	219	0	273	279	0	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
07	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	291	293	0	242	244	0	260	264	266	340	356	0
08	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	204	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	330	340	356
09	136	140	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	330	340	356
10	136	136	0	160	166	170	297	297	0	270	270	0	192	195	0	152	154	204	173	173	0	266	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	330	340	356
11	136	142	0	160	168	170	213	219	0	270	273	279	189	192	0	150	152	200	173	177	0	264	266	268	285	287	293	242	244	0	266	266	0	340	356	0
12	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	291	293	0	242	242	0	260	264	266	340	356	0
13	136	140	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
14	136	136	0	166	170	0	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	291	293	0	242	244	0	260	264	266	340	356	0
15	142	166	0	160	166	170	219	219	0	270	270	0	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	291	293	0	242	244	0	260	264	0	330	340	356
16	136	140	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	177	0	268	270	0	291	293	0	242	244	0	260	264	266	330	340	356

Dentre as 16 variações encontradas, a variação 04 foi a mais abundante neste estudo. Dos 155 isolados analisados, 111 (71,6%) foram identificados como pertencente a essa variação. A variação 02 foi a segunda variação mais abundante neste estudo, com 14 representantes (9,0%), seguida da variação 07, com 11 representantes (7,1%). As demais variações apresentaram três (variação 03) representantes, dois (variações 05, 08 e 09) e um (variações 01, 06, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16), sendo estas as menos abundantes neste estudo.

Estas variações foram comparadas aos perfis polimórficos de isolados de *P. infestans* do banco de dados da EuroBlight e da Tizón Latino, redes internacionais que estudam *P. infestans*. As variações 02, 03, 04, 06, 07, 08, 09, 12, 13 e 14 foram identificadas como pertencentes à linhagem EU_2_A1 (ou simplesmente 2_A1), e a variação 11 pertencente a linhagem US-1.

A linhagem EU_2_A1 é uma linhagem originária na Europa (NJOROGÉ et al., 2019) e a linhagem US-1 foi descrita pela primeira vez por Goodwin, Cohen e Fry em 1994 nos Estados Unidos e Canadá.

Segundo Saville, Martin e Ristaino (2016), a linhagem US-1 foi disseminada mundialmente em meados do século 20. Legard, Lee e Fry (1995) detectaram a linhagem US-1 de *P. infestans* em tomate e em batata nos Estados Unidos.

As variações encontradas neste estudo também foram comparadas aos perfis polimórficos descritos por Li (2012), onde foram encontrados 2 isolados com alta similaridade polimórfica com variações encontradas neste estudo (Tabela 10). As variações 02, 03, 04, 06, 07, 08, 09, 12, 13 e 14 deste estudo apresentaram alta similaridade com o perfil polimórfico do isolado VK98014 descrito por Li (2012), a similaridade destas variações oscilaram entre 86,11% e 80,55%. O isolado VK98014 é de origem Holandesa (1998), foi isolado de *Solanum tuberosum* e pertence à linhagem clonal 2_A1 (LI, 2012).

A variação 11 apresentou aproximadamente 66,67% de similaridade com o perfil polimórfico do isolado VK1_4 descrito por Li (2012). Este isolado é de origem Holandesa (1958), foi isolado de *Solanum tuberosum*, classificado como pertencente ao grupo de compatibilidade A1 e pertencente à linhagem US-1 (Li, 2012).

Reis e colaboradores (2003) relataram a existência das linhagens clonais US-1 e BR-1 no Brasil, sendo cada linhagem altamente específica a seu hospedeiro: os isolados US-1 estão associados com tomate, enquanto os isolados BR-1 foram encontrados em batata. Estes resultados foram confirmados por Suassuna e colaboradores (2004).

Os isolados da linhagem BR-1, foram sempre associados à batata, enquanto os da linhagem US-1 foram mais comumente associados ao tomate (GOODWIN; COHEN; FRY, 1994).

Lucca e colaboradores (2018) identificaram as linhagens 2_A1 e US-1 em uma análise preliminar de isolados de *P. infestans* do presente estudo. No mesmo ano, Lucca e Restrepo (2018), relataram que os isolados de *P. infestans* analisados do Chile e da Argentina pertenciam à linhagem 2_A1 e os isolados analisados do Brasil pertenciam às linhagens 2_A1 e US-1.

Acuña e colaboradores (2016) relataram que no Chile, entre 2003 e 2005, a linhagem de *P. infestans* predominante era a US-1, e de 2006 a 2016 a linhagem 2_A1 passou a ser o predominante no país.

No Peru, Gamboa e colaboradores (2018) relataram a existência de quatro linhagens EC-1 e US-1 em batata e PE-3 e PE-7 em variedades nativas ou espécies silvestres. A linhagem EC-1 foi predominante no estudo.

Vargas e colaboradores (2009) relataram as linhagens EC-1 e US-7 na Colômbia, entretanto Gilchrist Ramelli e colaboradores (2009) relataram a presença das linhagens EC-1 e US-1 em Antioquia, Colômbia.

Tabela 10. Comparação dos perfis polimórficos das variações 04 e 11 deste trabalho, com os perfis polimórficos encontrados por Li (2012).

Variação	D13			Pi04			Pi4B			Pi63			Pi70			G11			SSR2			SSR3			SSR4			SSR6			SSR8			SSR11		
	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.			
Varição 02	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	204	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
Varição 03	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	330	340	356
Varição 04	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
Varição 06	136	136	0	160	166	170	219	219	0	273	279	0	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
Varição 07	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	291	293	0	242	244	0	260	264	266	340	356	0
Varição 08	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	204	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	330	340	356
Varição 09	136	140	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	330	340	356
Varição 12	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	291	293	0	242	242	0	260	264	266	340	356	0
Varição 13	136	140	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
Varição 14	136	136	0	166	170	0	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	291	293	0	242	244	0	260	264	266	340	356	0
VK98014	136	136	0	166	170	0	217	217	0	*148	*151	*157	192	195	0	154	156	206	173	173	0	258	268	0	288	290	292	242	244	0	260	264	266	341	356	0
Varição 11	136	142	0	160	168	170	213	219	0	270	273	279	189	192	0	150	152	200	173	177	0	264	266	268	285	287	293	242	244	0	266	266	0	340	356	0
VK1_4	140	140	0	166	170	0	213	217	0	*148	*151	*157	189	192	0	152	156	200	173	177	0	266	266	0	288	290	0	244	244	0	266	266	0	341	356	0

*No estudo de Li (2012) o locus Pi63 está com a nomenclatura 148/151/157 que segundo a Lista de alelos e tamanhos de produtos dos 12 marcadores (SSR) cedidos pela Eurobligh (Anexos 1 e 2) correspondem atualmente aos alelos 270/273/279.

Na França, em 2001, a linhagem predominante era a 2_A1 com 60% de frequência, em 2006 a mesma linhagem permaneceu como predominante, porém sua frequência foi mais baixa (40%). Já nos anos de 2007 e 2008 a linhagem 13_A2 (Blue 13) foi a predominante com 80% de frequência (MARIETTE et al., 2014).

Em levantamento feito por Alor-Romero (2015) na Espanha, a linhagem mais frequente foi a 2_A1 (42,30%), seguida pelas linhagens 3_A2, 13_A2y, Misc A1 e Misc A2.

Rekad e colaboradores (2017) realizaram a caracterização da população de *P. infestans* no noroeste da Argélia entre 2008-2014 por análise genotípica (SSR) e o resultado mostrou baixa diversidade. A linhagem predominante foi a 13_A2 (67%), seguida pela linhagem 2_A1 e 23_A1 com 21 e 5% respectivamente.

No Quênia e Uganda todos os isolados coletados por Vega-Sanchez e colaboradores (2000) pertenciam à linhagem US-1. Posteriormente, Were e colaboradores (2013) detectaram no Quênia as linhagens 2_A1 e US-1 em frequência de 52,27 e 47,73% respectivamente. Recentemente, no leste da África (Quênia, Uganda, Tanzânia, Burundi e Ruanda), Njoroge e colaboradores (2019) constataram a predominância das linhagens 2_A1 em batata e US-1 em tomate (exceto no Quênia, onde a linhagem 2_A1 predominou em tomate também). Os isolados da linhagem 2_A1 foram significativamente mais agressivos que os isolados da linhagem US-1 em ambas cultivares de batata avaliadas (cultivar Sarpo Mira e cultivar Kachpot-1). Os isolados da linhagem 2_A1 foram significativamente mais agressivos na batata do que no tomate. Nota-se que, de maneira similar ao que o presente estudo revela ter acontecido em batata no Brasil, no leste da África a linhagem 2_A1 suplantou rapidamente a linhagem anteriormente predominante (BR-1 no Brasil e US-1 na África).

Saville e colaboradores (2016) utilizaram os mesmos marcadores microssatélites para o estudo molecular de isolados de *P. infestans* pelo mundo. Dentre os 183 isolados analisados, foram incluídos quatro da linhagem BR-1 provenientes do Brasil, isolados em 1998 e cedidos pelo Dr. Eduardo Mizubuti (Tabela 11). Ao compararmos os perfis polimórficos dos isolados da linhagem BR-1 com as variações encontradas no presente trabalho, podemos observar que os isolados atuais pertencem a linhagens marcadamente distintas da anteriormente presente no Brasil.

Árvore de distância genética construída com os dados dos microssatélites dos isolados do presente estudo com os de outras linhagens mundiais, mostra que as linhagens brasileiras atuais formam um ramo junto à linhagem 2_A1 (Figura 13).

Observa-se também que a linhagem BR-1 se aproxima da linhagem AR4 da Argentina. A variação 11 se assemelha à linhagem US-1, conforme já discutido anteriormente.

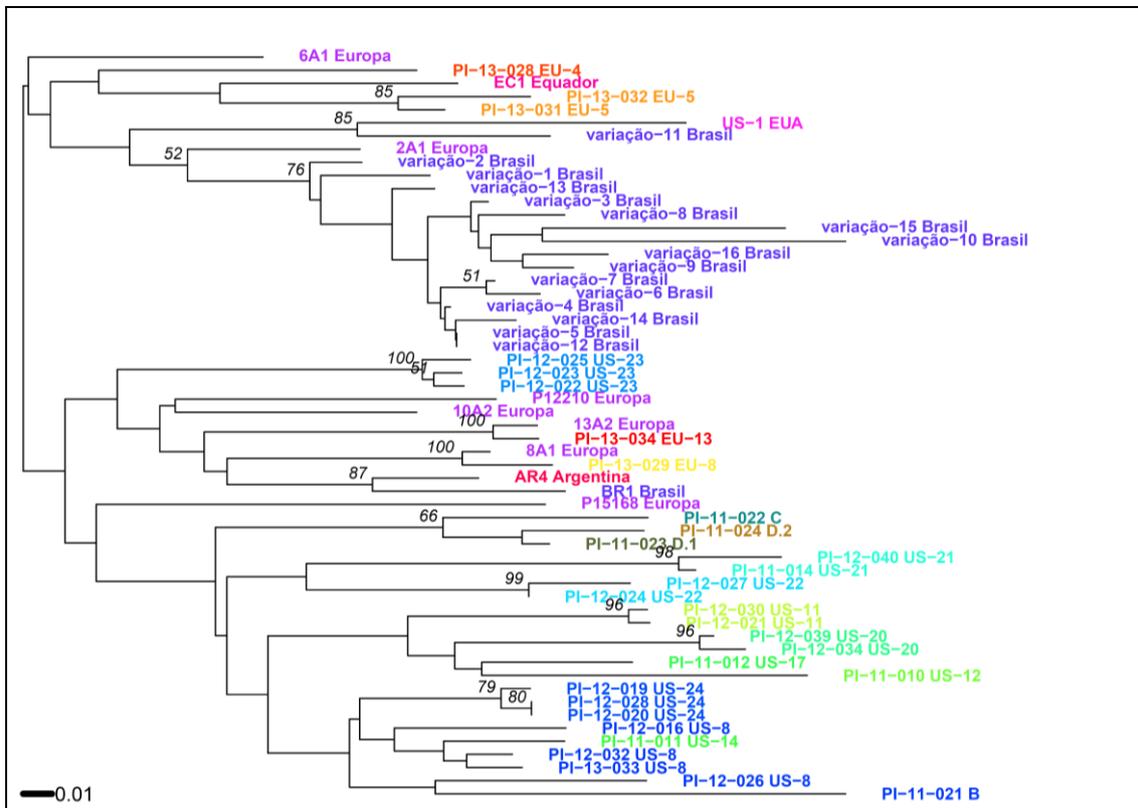


Figura 13. Árvore de distância genética construída pelo método de Neighbor Joining com os dados de microssatélites dos isolados de *Phytophthora infestans* do presente estudo e de outras linhagens mundiais.

O gráfico de rede de extensão mínima (minimum spanning network) confirma o agrupamento das variações do presente estudo com a linhagem 2_A1 (Figura 14).

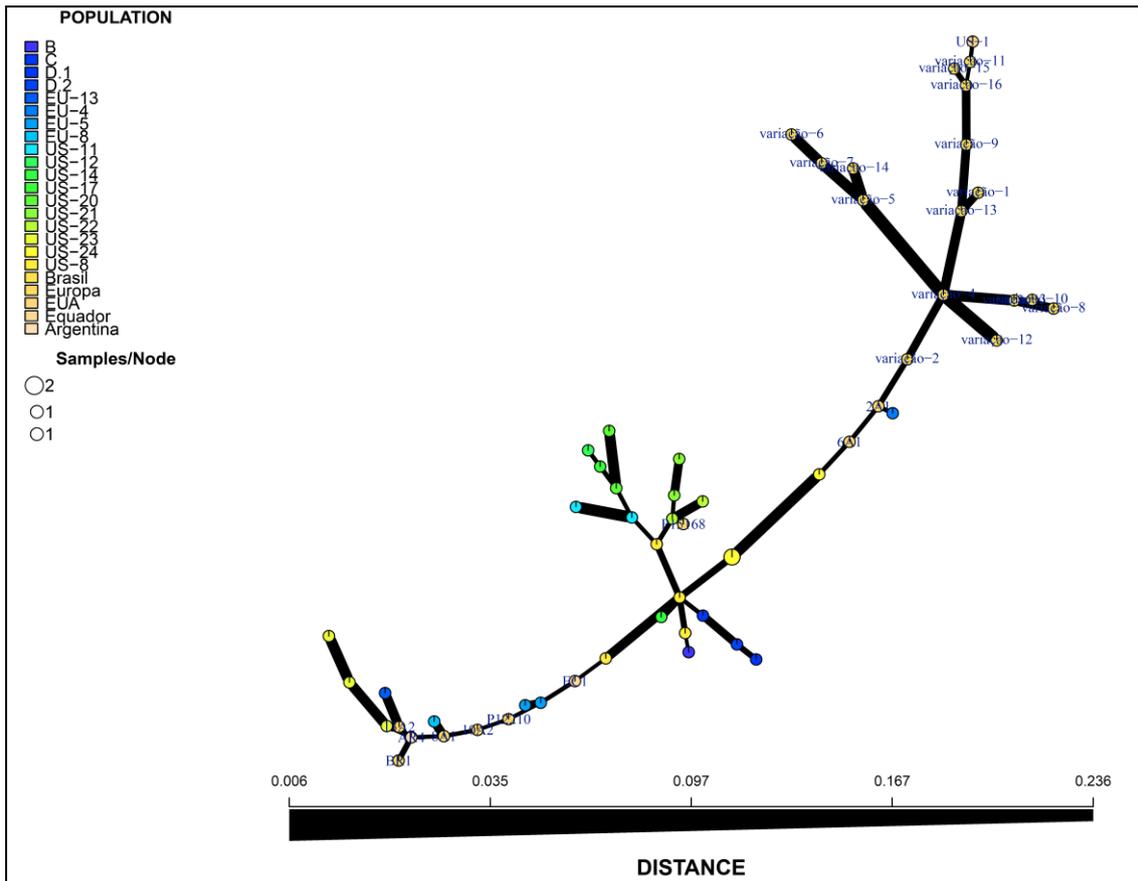


Figura 14. Gráfico da rede de extensão mínima (minimum spanning network) construído com os dados de microsstatélites de isolados de *Phytophthora infestans* do presente estudo e de outras linhagens mundiais.

Tabela 11. Perfis polimórficos dos isolados brasileiros estudados por Saville e colaboradores (2016), pertencentes à linhagem BR-1.

Isolado	Genótipo	D13			Pi04			Pi4B			Pi63			Pi70			G11			SSR2			SSR3			SSR4			SSR6			SSR8			SSR11		
		Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.				
B219	BR1	140	140	0	160	160	0	205	213	243	279	279	0	192	192	0	160	162	0	173	173	0	266	268	0	285	293	0	244	244	0	260	266	0	330	340	0
B217	BR1	140	140	0	170	170	0	205	213	243	270	279	0	192	192	0	164	164	0	173	173	0	266	268	0	285	297	0	244	244	0	260	266	0	330	340	0
B189	BR1	136	136	0	170	170	0	205	213	243	270	279	0	192	192	0	162	164	0	173	173	0	266	268	0	285	293	0	244	244	0	260	266	0	330	340	0
B193	BR1	140	140	0	170	170	0	205	213	243	270	279	0	192	192	0	162	164	0	173	173	0	266	268	0	285	293	0	244	244	0	260	266	0	330	340	0

Tabela 12. Comparação dos perfis polimórficos dos isolados autoférteis encontrados neste estudo, com os perfis polimórficos dos isolados autoférteis encontrados por Casa-Coila e colaboradores (2017).

Variação	Isolado	D13			Pi04			Pi4B			Pi63			Pi70			G11			SSR2			SSR3			SSR4			SSR6			SSR8			SSR11		
		Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.	Al.				
02	011A	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	204	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
02	011B	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	204	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
02	012A	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	204	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
04	012B	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
07	012C	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	291	293	0	242	244	0	260	264	266	340	356	0
04	012D	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
04	012E	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
13	035A	136	140	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
02	035B	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	204	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
04	035C	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
04	035D	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
04	035E	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
04	142	136	136	0	160	166	170	219	219	0	270	273	279	192	195	0	152	154	206	173	173	0	268	270	0	289	291	293	242	244	0	260	264	266	340	356	0
Autoférteis - Casa-Coila (2017)		138	140	0	168	168	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	158	158	0	-	-	-	146/-	160/266	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*

*Alelos encontrados no locus Pi33 que não foi utilizado neste estudo.

Em 2017 Casa-Coila e colaboradores realizaram o primeiro relato de isolados autoférteis de *P. infestans* no Brasil. Foram encontrados três isolados no Estado do Paraná (Ponta Grossa, Contenda e Castro) para os quais foi realizado o estudo molecular por SSR utilizando nove pares de iniciadores (SSR), alguns iguais ao utilizados neste estudo. Os perfis polimórficos dos isolados foram obtidos com os marcadores microssatélites: G11, Pi02, Pi89, Pi04, Pi70, Pi56_(Long), Pi63_(Long), Pi33 e D13. Ao compararmos os isolados autoférteis relatados por Casa-Coila e colaboradores (2017), com os isolados obtidos neste estudo, observamos tratar de perfis distintos (Tabela 12).

5.5. Teste de sensibilidade *in vitro* de isolados de *Phytophthora infestans* aos fungicidas ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe

Os 17 isolados de *P. infestans* utilizados, representativos de 6 variações genóticas, apresentaram sensibilidade variável aos princípios ativos analisados (ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe).

Tabela 13. Médias das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações de ciazofamida para isolados de *Phytophthora infestans* e EC₅₀ obtido por isolado.

Concentração [µg mL ⁻¹]	Isolados de <i>Phytophthora infestans</i>																
	151	PRT	CRI-2	006	012C	023	035B	042	051	061	064	077	093	109	117	136	140
0	0,1173 a	0,1244 a	0,7757 a	0,7609 a	0,6393 a	0,1088 a	0,2757 a	0,1491 a	0,6275 a	0,5663 a	0,7097 a	0,3742 a	0,6919 a	0,7943 a	0,7578 a	0,1103 a	0,2804 a
0,01	<u>0,0458 b</u>	0,1033 b	0,6745 b	0,6457 ab	<u>0,3749 b</u>	0,0600 b	<u>0,1341 b</u>	0,1079 b	0,3309 b	<u>0,3853 a</u>	0,6314 ab	<u>0,1567 b</u>	0,6175 b	0,6485 b	0,6785 a	0,0704 b	<u>0,1422 b</u>
0,03	0,0363 c	0,0431 c	0,6558 bc	0,6141 bc	0,3018 b	<u>0,0449 bc</u>	0,0834 bc	0,0942 bc	<u>0,3317 b</u>	0,1037 b	0,4282 abc	0,1100 bc	0,5806 b	0,5409 c	0,5498 ab	0,0615 bc	0,1016 bc
0,1	0,0339 cd	<u>0,0400 c</u>	0,6505 bc	0,5902 bcd	0,1275 c	0,0417 bcd	0,0764 bc	0,0923 bcd	0,1736 c	0,0766 b	0,3650 abc	0,1058 bc	0,5006 c	<u>0,2285 d</u>	0,3403 bc	<u>0,0490 bcd</u>	0,0875 bc
0,3	0,0285 de	0,0320 cd	0,6376 bc	0,5779 bcd	0,0975 c	0,0376 cd	0,0717 bc	<u>0,0771 bcd</u>	0,1510 c	0,0650 b	0,2065 bc	0,0880 bc	0,0959 d	0,1670 de	<u>0,2994 bc</u>	0,0410 cde	0,0779 bc
1	0,0237 e	0,0265 de	0,5927 bcd	0,5686 bcd	0,0783 c	0,0298 cd	0,0678 bc	0,0649 cde	0,1497 c	0,0568 b	0,0912 c	0,0768 bc	0,0943 d	0,1608 de	0,1114 c	0,0366 de	0,0702 bc
3	0,0155 f	0,0168 e	0,5697 cd	0,4863 d	0,0638 c	0,0238 de	0,0584 bc	0,0490 de	0,0973 c	0,0412 b	0,0537 c	0,0529 c	0,0608 d	0,0925 ef	0,0951 c	0,0262 ef	0,0624 bc
10	0,0146 f	0,0014 f	0,5088 d	0,4950 cd	0,0379 c	0,0052 e	0,0344 c	0,0307 e	0,0771 c	0,0232 b	0,0200 c	0,0301 c	0,0306 d	0,0591 f	0,0508 c	0,0122 f	0,0418 c
CV%	6,27	8,62	5,07	7,58	27,59	15,41	28,15	15,08	20,97	54,59	49,76	26,44	11,25	8,45	29,52	15,6	28,13
EC ₅₀	0,000369	0,036492	1779,664	1260,723	0,009659	0,016987	0,000995	0,249111	0,012018	0,003042	0,101859	0,000752	0,163704	0,069486	0,136544	0,069766	0,00304

CV% = Coeficiente de variação em %; EC₅₀ = Concentração do fungicida capaz de reduzir 50% do crescimento micelial do patógeno.

Tabela 14. Médias das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações de clorotalonil para isolados de *Phytophthora infestans* e EC₅₀ obtido por isolado.

Concentração [µg mL ⁻¹]	Isolados de <i>Phytophthora infestans</i>																
	151	PRT	CRI-2	006	012C	023	035B	042	051	061	064	077	093	109	117	136	140
0	0,1116 a	0,1388 a	0,5390 a	0,5734 a	0,1492 a	0,0969 a	0,2017 a	0,1414 a	0,1246 a	0,5350 a	0,6007 a	0,2629 a	0,1440 a	0,2843 a	0,5559 a	0,0585 a	2,1889 a
0,01	<u>0,0320 b</u>	0,0921 b	0,5297 a	0,5471 a	0,1094 ab	<u>0,0466 b</u>	0,2487 a	0,1047 ab	0,1165 a	<u>0,2888 b</u>	0,3753 b	0,1621 ab	0,1268 b	0,2476 a	<u>0,1697 b</u>	0,0338 b	<u>1,2512 b</u>
0,03	0,0288 b	0,0703 bc	0,5172 a	0,5886 a	0,0801 bc	0,0339 b	0,0596 a	0,0630 bc	0,1097 a	0,1702 bc	0,3150 bc	<u>0,1406 bc</u>	0,1034 c	0,2040 b	0,0803 c	0,0336 b	1,0064 c
0,1	0,0326 b	0,0650 c	0,5103 a	0,6056 a	0,0590 bcd	0,0298 bc	<u>0,0587 a</u>	0,0435 c	0,0819 a	0,0798 bc	<u>0,2691 cd</u>	0,1215 bc	0,0774 d	0,1717 bc	0,0687 c	0,0319 bc	0,8982 cd
0,3	0,0318 b	0,0607 cd	0,5088 a	0,6062 a	0,0549 cd	0,0291 bc	0,0557 a	0,0225 c	0,0772 a	0,0541 c	0,2428 d	0,0667 bcd	0,0676 de	0,1508 cd	0,0666 c	<u>0,0314 bc</u>	0,8568 cd
1	0,0121 bc	<u>0,0395 de</u>	0,4955 a	0,6043 a	0,0495 cd	0,0094 cd	0,0533 a	0,0070 c	0,0704 a	0,0357 c	0,1648 e	0,0381 cd	<u>0,0567 e</u>	<u>0,1256 de</u>	0,0629 c	0,0236 cd	0,8190 de
3	0,0026 c	0,0212 ef	0,4855 a	0,6355 a	0,0310 cd	0,0064 d	0,0450 a	0,0078 c	0,0570 a	0,0349 c	0,0719 f	0,0324 cd	0,0412 f	0,1074 ef	0,0611 c	0,0211 d	0,6750 ef
10	0,0011 c	0,0062 f	0,4863 a	0,6206 a	0,0252 d	0,0035 d	0,0320 a	0,0059 c	<u>0,0482 a</u>	0,0224 c	0,0329 f	0,0068 d	0,0306 f	0,0853 f	0,0604 c	0,0193 d	0,6278 f
CV%	24,76	13,5	4,39	6,36	25,78	24,52	120,81	41,4	44,35	49,86	9,01	36,93	5,22	7,82	22,2	15,7	5,48
EC ₅₀	2,84x10 ⁻⁵	0,043919	5,24x10 ²¹	Resistente	0,05247	0,001633	0,037449	0,012593	4,690103	0,000418	0,032502	0,020731	0,399073	0,946099	1,4x10 ⁻¹¹	0,168819	0,009281

CV% = Coeficiente de variação em %; EC₅₀ = Concentração do fungicida capaz de reduzir 50% do crescimento micelial do patógeno.

Tabela 15. Médias das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações de dimetomorfe para isolados de *Phytophthora infestans* e EC₅₀ obtido por isolado.

Concentração [µg mL ⁻¹]	Isolados de <i>Phytophthora infestans</i>																
	151	PRT	CRI-2	006	012C	023	035B	042	051	061	064	077	093	109	117	136	140
0	0,0467 a	0,0497 a	0,7142 a	0,7021 a	0,1500 a	0,0994 a	0,2285 a	0,1861 a	0,3358 a	0,5433 a	0,5310 a	0,2919 a	0,5264 a	0,6416 a	0,7226 a	0,0911 a	0,2127 a
0,01	0,0407 ab	0,0422 ab	0,6964 ab	0,6602 ab	0,1327 ab	0,0865 ab	0,1746 b	0,1589 a	0,2563 b	0,3892 ab	<u>0,1542 b</u>	0,2548 ab	<u>0,2383 b</u>	0,4827 b	0,4890 b	0,0847 ab	<u>0,1331 b</u>
0,03	0,0367 ab	0,0379 abc	0,6646 abc	0,6493 ab	0,1186 bc	0,0702 abc	0,0866 c	<u>0,1118 b</u>	0,2378 bc	0,3702 ab	0,1163 c	0,1920 abc	0,1270 c	0,4044 bc	<u>0,3936 bc</u>	0,0727 abc	0,0956 c
0,1	0,0339 bc	0,0370 abc	0,6490 abc	0,6153 abc	0,1076 bcd	0,0563 bed	0,0681 c	0,1031 bc	0,1961 bcd	0,2301 ab	0,0768 d	0,1454 bc	0,1173 cd	<u>0,3030 cd</u>	0,2713 cd	0,0557 bcd	0,0786 cd
0,3	0,0310 bcd	0,0348 abc	0,6454 abc	0,6130 abc	0,0932 cde	0,0473 cd	0,0598 c	0,0853 bc	0,1683 cde	0,2045 ab	0,0696 de	<u>0,1140 c</u>	0,1020 de	0,2007 de	0,1669 de	0,0485 cd	0,0641 cde
1	0,0283 bcd	0,0305 bc	0,6154 abc	0,5692 bcd	0,0779 de	<u>0,0444 cd</u>	0,0562c	0,0796 bc	0,1612 de	<u>0,0670 ab</u>	0,0651 de	0,1045 c	0,0861ef	0,1556 e	0,1118 e	0,0418 cd	0,0593 de
3	0,0211 d	0,0261 cd	0,5686 bc	0,5412 cd	0,0716 e	0,0379 d	0,0527 c	0,0717 bc	<u>0,1503 de</u>	0,0502 ab	0,0633 de	0,0862 c	0,0765f	0,1328 e	0,0843 e	0,0353 d	0,0551 de
10	<u>0,0218 cd</u>	<u>0,0158 d</u>	0,5399 c	0,4932 d	<u>0,0668 e</u>	0,0379 d	0,0437 c	0,0586 c	0,1144 e	0,0351 b	0,0555 e	0,0718 c	0,0723 f	0,0898 e	0,0763 e	0,0286 d	0,0403 e
CV%	13,73	14,19	7,36	5,7	10,49	18,55	16,53	15,07	13,11	74,15	4,08	27,08	4,05	16,25	18,52	20,79	13,4
EC ₅₀	6,849307	7,894986	15953607	588376,5	7,08912	0,948592	0,011926	0,012593	1,208674	0,058881	1,27x10 ⁻⁹	0,261414	1,16x10 ⁻⁵	0,077496	0,020134	0,168819	0,009677

CV% = Coeficiente de variação em %; EC₅₀ = Concentração do fungicida capaz de reduzir 50% do crescimento micelial do patógeno.

Tabela 16. Médias das absorvâncias obtidas nas diferentes concentrações de propamocarbe para isolados de *Phytophthora infestans* e EC₅₀ obtido por isolado.

Concentração [µg mL ⁻¹]	Isolados de <i>Phytophthora infestans</i>																
	151	PRT	CRI-2	006	012C	023	035B	042	051	061	064	077	093	109	117	136	140
0	0,0484 a	0,0536 a	0,6942 a	0,6254 a	0,1294 a	0,0738 a	0,3474 a	0,1596 a	0,2009 a	0,6840 a	0,5796 a	0,4191 a	0,5820 a	0,7334 a	0,8792 a	0,0758 a	0,4378 a
0,01	0,0404 ab	0,0441 ab	0,6519 ab	0,5962 ab	0,1130 b	0,0649 b	0,2796 ab	0,1137 b	<u>0,1718 ab</u>	0,4232 ab	0,4323 b	0,2867 b	<u>0,3248 b</u>	0,5164 b	0,7287 ab	0,0680 ab	0,3633 ab
0,03	0,0374 abc	0,0402 abc	0,6397 bc	0,5881 abc	0,0983c	0,0603 bc	0,2578 abc	0,1060 b	0,1588 abc	0,3852 ab	0,3017 c	0,2659 b	0,2977 c	0,4006 c	0,6756 b	0,0610 bc	0,2884 bc
0,1	0,0347 bcd	0,0369 bc	0,6267 bcd	0,5698 bc	0,0945 cd	0,0561 cd	0,2180 bcd	0,0931 bc	0,1422 bcd	0,2720 ab	<u>0,2615 cd</u>	0,2466 bc	0,2025 d	<u>0,3190 d</u>	0,5719 bc	0,0570 cd	0,2636 cd
0,3	0,0324 bcd	0,0349 bcd	0,6154 bcd	0,5667 bc	0,0874 cde	0,0532 cde	0,1786 cd	0,0923 bc	0,1308 bcd	0,0869b	0,2207 cd	0,2135 bcd	0,1714 e	0,2852 de	0,4849 c	0,0536 cde	0,2119 cde
1	0,0271 cde	0,0296 cd	0,5962 cde	0,5473 bc	0,0833 de	0,0498 de	<u>0,1364 de</u>	0,0910 bc	0,1188 bcd	0,0736 b	0,1733 de	<u>0,2120 bcd</u>	0,1390 f	0,2271 ef	0,4325 cd	0,0514 de	<u>0,1813 e</u>
3	0,0248 de	0,0271 cd	0,5884 de	0,5382 cd	0,0763 ef	0,0452 e	0,0639 ef	0,0750 cd	0,1071 cd	0,0608 b	0,0981 e	0,1524 cd	0,0984 g	0,1690 f	<u>0,4025 cd</u>	0,0475 e	0,1151 f
10	<u>0,0185 e</u>	<u>0,0226 d</u>	0,5662 e	0,4886 d	0,0672 f	0,0323 f	0,0380 f	<u>0,0635 d</u>	0,0864 d	0,0556 b	0,0615 e	0,1473 d	0,0652 h	0,0842 g	0,3034 d	0,0338 f	0,0483 g
CV%	13,47	13,96	2,55	3,24	5,31	5,65	17,6	8,53	14,32	62,2	15,3	13,94	2,9	7,49	10,93	5,65	14,59
EC ₅₀	8,102545	9,393238	7,66x10 ¹²	2,1x10 ¹⁰	107,1952	57,83516	0,315768	3,977605	0,004263	0,013058	0,058646	0,69023	0,008698	0,056091	2,222396	65,4758	0,301488

CV% = Coeficiente de variação em %; EC₅₀ = Concentração do fungicida capaz de reduzir 50% do crescimento micelial do patógeno.

No experimento com o princípio ativo ciazofamida (Tabela 13), todos os isolados apresentaram sensibilidade. Observamos que todos os isolados apresentaram menor absorvância na concentração a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, no entanto, a análise estatística mostrou que alguns isolados apresentaram comportamentos similares ao apresentado na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando em menores concentrações.

A análise estatística mostrou que os isolados 035B, 061, 064, 077 e 140 apresentaram resultados similares ao da concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, na concentração de $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados 006, 012C, 051 e 117 na concentração $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, o isolado 093 na concentração na concentração $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados CRI-2 e 042 na concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados 023, 109 e 136 na concentração $3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já o isolado PRT, mostrou menor absorção somente a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 13).

Ao correlacionar o EC_{50} dos isolados para ciazofamida com as concentrações utilizadas no experimento (Tabela 13) observamos que seis isolados (151, 012C, 035B, 061, 077 e 140) apresentaram o EC_{50} na concentração de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, dois isolados (023 e 051) na concentração $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$, três isolados (PRT, 109 e 136) na concentração de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e quatro isolados (042, 064, 093 e 117) na concentração de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os EC_{50} dos isolados CRI-2 e 006 não foram encontrados nas concentrações utilizadas no experimento.

No experimento com clorotalonil (Tabela 14), com excessão dos isolados CRI-2 e 006, todos os demais isolados apresentaram sensibilidade ao fungicida. Os isolados CRI-2, 006, 035B e 051 não apresentaram diferença estatística quando comparados entre as concentração do princípio ativo. No entanto, entre os isolados que apresentaram sensibilidade, observamos que a análise estatística mostrou que todos os isolados apresentaram comportamentos similares ao de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. quando em menores concentrações.

A análise estatística mostrou que os isolados 042 e 117 apresentaram resultados similares ao da concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, na concentração de $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$, o isolado 012C na concentração $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados 061 e 077 na concentração na concentração $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados 151, 023 e 136 na concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e os isolados PRT, 064, 093, 109 e 140 na concentração $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 14).

Comparando o EC_{50} obtido dos isolados, com as concentrações utilizadas no experimento com clorotalonil (Tabela 14), podemos observar que cinco isolados (151, 023, 061, 117 e 140) obtiveram o EC_{50} na concentração $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, dois isolados (042 e 077) na concentração $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$, três isolados (012C, 035B e 064) na

concentração $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, um isolado (136) na concentração $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, três isolados (PRT, 093 e 109) na concentração $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e um isolado (051) na concentração $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Novamente, os EC_{50} dos isolados CRI-2 e 006 não foram encontrados nas concentrações utilizadas no experimento.

No experimento com o dimetomorfe (Tabela 15), com excessão dos isolados CRI-2 e 006, os demais também todos os isolados apresentaram sensibilidade. Novamente, todos os isolados apresentaram menor absorvância na concentração a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, porém neste, a análise estatística mostrou que todos isolados apresentaram comportamentos similares a maior concentração quando em menores concentrações.

O isolado 061 apresentou resultado similar ao da concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, na concentração de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados CRI-2, 035B e 077 na concentração $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados 023, 042 e 136 na concentração na concentração $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados 151, 012C, 051, 064, 109, 117 e 140 na concentração $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados 006 e 093 na concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o isolado PRT na concentração $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 15).

Ao correlacionar o EC_{50} com as concentrações utilizadas no experimento com dimetomorfe (Tabela 15), observamos que três isolados (064, 093 e 140) tem o EC_{50} na concentração de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, um isolado (117) na concentração $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$, um isolado (109) na concentração de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, quatro isolados (035B, 042, 077 e 136) na concentração de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, dois isolados (023 e 061) na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, um isolado (051) na concentração de $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e três isolados (151, PRT e 012C) na concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

No experimento com propamocarbe, igual aos experimentos anteriores, todos os isolados apresentaram sensibilidade (Tabela 16). Observamos que todos os isolados apresentaram menor absorção na concentração a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, no entanto, a análise estatística mostrou que alguns isolados apresentaram comportamentos similares ao de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando em menores concentrações.

A análise estatística (Tabela 16) mostrou que o isolado 061 apresentou comportamento similar ao da concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, na concentração de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, o isolado 051 na concentração $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados 151, CRI-2, 064 e 117 na concentração na concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, os isolados 006, 012C, 035B e 042 na concentração $3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os demais isolados 023, 093, 109, 136 e 140, mostraram menor absorção somente a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

E no experimento com propamocarbe, comparando o EC₅₀ obtido, com as concentrações utilizadas (Tabela 16), observamos que dois isolados (051 e 093) obtiveram o EC₅₀ na concentração 0,01 µg mL⁻¹, um isolado (061) na concentração 0,03 µg mL⁻¹, dois (064 e 109) na concentração de 0,1 µg mL⁻¹, três (035B, 077 e 140) na concentração de 1 µg mL⁻¹, um isolado (117) na concentração de 3 µg mL⁻¹ e três isolados (151, PRT e 042) na concentração de 10 µg mL⁻¹. Os EC₅₀ dos isolados CRI-2, 006, 012C, 023 e 136 não foram encontrados nas concentrações utilizadas no experimento.

Tabela 17. Valores de EC₅₀ (µg mL⁻¹) para os 17 isolados de *Phytophthora infestans* para os fungicidas ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe.

Isolado	Ciazofamida	Clorotalonil	Dimetomorfe	Propamocarbe
	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)			
151	0,000369	2,84x10 ⁻⁵	6,849307	8,102545
PRT	0,036492	0,043919	7,894986	9,393238
CRI-2	1779,664	Resistente*	Resistente*	Resistente*
006	1260,723	Resistente*	Resistente*	Resistente*
012C	0,009659	0,05247	7,08912	107,1952
023	0,016987	0,001633	0,948592	57,83516
035B	0,000995	0,037449	0,011926	0,315768
042	0,249111	0,012593	0,012593	3,977605
051	0,012018	4,690103	1,208674	0,004263
061	0,003042	0,000418	0,058881	0,013058
064	0,101859	0,032502	1,27x10 ⁻⁹	0,058646
077	0,000752	0,020731	0,261414	0,69023
093	0,163704	0,399073	1,16x10 ⁻⁵	0,008698
109	0,069486	0,946099	0,077496	0,056091
117	0,136544	1,4x10 ⁻¹¹	0,020134	2,222396
136	0,069766	0,168819	0,168819	65,4758
140	0,00304	0,009281	0,009677	0,301488

*Resistente = EC₅₀ > 10000 µg mL⁻¹

Ao analisarmos a Tabela 17, observamos os maiores e menores EC₅₀ por princípio ativo. Para todos os princípios ativos, os maiores valores de EC₅₀ foram do isolado CRI-2. Os menores valores de EC₅₀ para ciazofamida e clorotalonil foram do

isolado 151, para dimetomorfe foi do isolado 064 e para propamocarbe foi do isolado 051.

Ao compararmos os valores de EC₅₀ dos isolados por princípio ativo observamos que oito isolados (PRT, CRI-2, 006, 012C, 035B, 077, 136 e 140) apresentaram menor EC₅₀ com o tratamento com ciazofamida, cinco isolados (151, 023, 042, 061 e 117) com clorotalonil, três isolados (042, 064 e 093) com dimetomorfe e dois isolados (051 e 109) com propamocarbe.

Os valores de EC₅₀ máximo e mínimo para cada princípio ativo apresentaram ampla variação entre os isolados avaliados .

Isolados pertencentes à mesma variação também apresentaram grande amplitude na sensibilidade aos princípios ativos, não sendo possível associar fenótipo ao genótipo (Tabelas 18 e 19). A insensibilidade para os diferentes princípios ativos observada para os isolados CRI-2 e 006 precisará ser confirmada pelo método de inibição de crescimento em meio de cultura sólido pois é possível que algum fator desconhecido tenha afetado a absorbância no ensaio em placa de microtitulação.

Os valores elevados de EC₅₀ de propamocarbe obtidos para alguns isolados pode ser um artefato da técnica de microtitulação. Este fungicida é eficaz na inibição da germinação de esporos porém tem pouco efeito na inibição do crescimento micelial. Caso os esporângios da suspensão utilizada no experimento já tenham iniciado a germinação, ou se a suspensão apresentar hifas do fungo, o fungicida não é capaz de impedir o crescimento micelial (HU et al., 2007).

Tabela 18. Valores de EC₅₀ para os 17 isolados subdivididos por variações dos genótipos, para ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe.

Variação	Isolado	Ciazofamida	Clorotalonil	Dimetomorfe	Propamocarbe
		CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)			
02	035B	0,000995	0,037449	0,011926	0,315768
	061	0,003042	0,000418	0,058881	0,013058
04	CRI-2	1779,664	Resistente*	Resistente*	Resistente*
	006	1260,723	Resistente*	Resistente*	Resistente*
	077	0,000752	0,020731	0,261414	0,69023
	093	0,163704	0,399073	1,16x10 ⁻⁵	0,008698
	109	0,069486	0,946099	0,077496	0,056091
	117	0,136544	1,4x10 ⁻¹¹	0,020134	2,222396

	136	0,069766	0,168819	0,168819	65,4758
	140	0,00304	0,009281	0,009677	0,301488
	012C	0,009659	0,05247	7,08912	107,1952
07	042	0,249111	0,012593	0,012593	3,977605
	051	0,012018	4,690103	1,208674	0,004263

Tabela 19. Valores de EC50 máximo e mínimo entre as variações de *Phytophthora infestans* para ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe

Variação	Fungicida	EC50 _{max}	EC50 _{min}
02	Ciazofamida	0,003042 µg mL ⁻¹	0,000995 µg mL ⁻¹
	Clorotalonil	0,037449 µg mL ⁻¹	0,000418 µg mL ⁻¹
	Dimetomorfe	0,058881 µg mL ⁻¹	0,011926 µg mL ⁻¹
	Propamocarbe	0,315768 µg mL ⁻¹	0,013058 µg mL ⁻¹
04	Ciazofamida	1779,664 µg mL ⁻¹	0,000752 µg mL ⁻¹
	Clorotalonil	> 1000 µg mL ⁻¹	1,4x10 ⁻¹¹ µg mL ⁻¹
	Dimetomorfe	> 1000 µg mL ⁻¹	1,16x10 ⁻⁵ µg mL ⁻¹
	Propamocarbe	> 1000 µg mL ⁻¹	0,008698 µg mL ⁻¹
07	Ciazofamida	0,249111 µg mL ⁻¹	0,009659 µg mL ⁻¹
	Clorotalonil	4,690103 µg mL ⁻¹	0,012593 µg mL ⁻¹
	Dimetomorfe	7,08912 µg mL ⁻¹	0,012593 µg mL ⁻¹
	Propamocarbe	107,1952 µg mL ⁻¹	0,004263 µg mL ⁻¹

Kato e colaboradores (1997) em experimento utilizando isolados dos EUA de 4 linhagens clonais (US-1, US-6, US-7 e US-8) e o princípio ativo clorotalonil, através da metodologia de inibição do crescimento micelial, encontraram EC50 que variou entre 0,21 e 1,47 µg mL⁻¹.

Mitani e colaboradores (2002) utilizando metodologia de inibição do crescimento micelial em meio de cultura, encontraram para ciazofamida, EC50 mínimo de 0,006 e máximo de 0,03 mg/mL para isolados de *P. infestans* do Japão.

Oliveira (2010) realizou experimentos com seis princípios ativos e 62 isolados brasileiros de *P. infestans*. Para clorotalonil e propamocarbe com a metodologia de inibição do crescimento micelial da colônia em meio de cultura (ICM), os valores de EC50 variaram entre 0,20 e 8,16 µg mL⁻¹ com clorotalonil e de 0,1 e 34,10 µg mL⁻¹ com propamocarbe. Para dimetomorfe a metodologia utilizada foi a de microtitulação colorimétrica e o EC₅₀ variou entre 0,03 e 1,46 µg mL⁻¹.

Na Sérvia, Rekanović e colaboradores (2011) determinaram o EC₅₀ de 14 isolados de *P. infestans* para o princípio ativo propamocarbe, encontrando valores que variaram de 12,1 a 31,1 mg L⁻¹.

Em 2014, Casa-Coila, utilizando a metodologia de inibição do crescimento micelial da colônia em meio de cultura (ICM), avaliou 131 isolados de *P. infestans* quanto à sensibilidade a clorotalonil, encontrando EC₅₀ mínimo de 0,01 e máximo de 4,67 µg/mL.

Saville e colaboradores (2015) avaliaram a sensibilidade à ciazofamida para isolados de sete linhagens clonais diferentes (US-8, US-11, US-20, US-21, US-22, US-23 e US-24) e não encontraram nenhum isolado insensível ao princípio ativo.

De maneira geral, os valores do EC₅₀ obtidos pelo método de microtitulação colorimétrica são inferiores aos valores de EC₅₀ obtidos pelo método de inibição do crescimento micelial da colônia em meio de cultura (ICM). Isso se deve ao fato de o método de microtitulação utilizar meio de cultura líquido, por aumentar a superfície de contato entre este e o esporângio do patógeno, o que pode interferir na relação dose-resposta entre oomiceto e a concentração do fungicida. Outro possível motivo seria o fato dos esporos/esporângios ficarem submersos na solução com o princípio ativo na microtitulação, ao contrário do método de inibição do crescimento micelial da colônia em meio de cultura (ICM), onde parte da colônia do fungo fica sobre o meio de cultura (que neste método é sólido) com fungicida (RAPOSO, et al., 2015; VALENCIO, 2017).

6. CONCLUSÕES

O grupo de compatibilidade de *Phytophthora infestans* predominante nos isolados brasileiros coletados neste trabalho foi o A1.

A reprodução sexuada de isolados autoférteis de *Phytophthora infestans* foi detectada no Estado de São Paulo, nas cidades de Divinolândia e Itobi; no Paraná, em Campo do Tenente; e em Minas Gerais, em Serra do Salitre/MG.

Foram detectados, no total, 42 alelos nos 12 loci de microssatélites estudados nos 155 isolados de *Phytophthora infestans* deste estudo.

Foram encontradas 16 variações de perfis polimórficos, sendo a variação 4 a mais abundante (71,6% dos isolados), seguida pelas variações 2 e 7 (9,0% e 7,1% dos isolados, respectivamente).

Foram identificadas duas linhagens clonais de *Phytophthora infestans* entre os isolados brasileiros do presente estudo, a linhagem 2_A1 e a linhagem US-1.

A linhagem 2_A1 está amplamente disseminada nas áreas produtoras de batata das regiões Sul e Sudeste, tendo desalojado linhagens anteriormente dominantes como a BR-1.

A maioria dos isolados apresentaram alta sensibilidade aos princípios ativos ciazofamida, clorotalonil, dimetomorfe e propamocarbe.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, Z. G.; ABAD, J. A. Another look at the origin of late blight of potatoes, tomatoes, and pear melon in the Andes of South America. **Plant Disease**, Saint. Paul, v. 81, n. 6, p. 682-688, 1997.
- ACUÑA, I. et al. Genotipificación y determinación de EC50 para los principales ingredientes activos en las poblaciones de *Phytophthora infestans* del sur de Chile. In: ACUÑA, I., RESTREPO, S., GABRIEL, J. (Eds). Resúmenes del Segundo Taller de la red de Cooperación Latinoamericana sobre el estudio del tizón tardío de las solanáceas. **Revista Latinoamericana de la papa**, v. 20, n. 1, p. 45-64. Apresentação no Segunda Taller Tizón Latino, Panamá, 2016.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 919p.
- ALOR-ROMERO, N. A. **Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata**. 2015. 165f. Tese (Doutorado) - Departamento de Producción y Protección Vegetal de Neiker , Universidad de Lleida & Neiker-Tecnalia. 2015.
- AMES, M.; SPOONER, D. M. DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. **American Journal Of Botany**, v. 95, n. 2, p. 252-257, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3732/ajb.95.2.252>. Acesso em: 13 nov. 2018.
- AZEVEDO, L.A.S. **Fungicidas sistêmicos: prática e teoria**. Campinas: O Autor, 2007. 290 p.
- BARBOZA, E. A. **Ocorrência e diversidade de Pythium e Phytophthora em fontes de água utilizada para irrigação na Região do Distrito Federal**. 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- BEKETOVA, M. P. et al. On molecular identification of *Phytophthora infestans* genotypes. **Russian Agricultural Sciences**, v. 40, n. 6, p. 435–438. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3103/S1068367414060068>. Acesso em: 05 dez. 2018.
- BELABID, L. et al. Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 3, n. 1, p. 25-31, 2004.

- BLUM, M. M. C. **Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas**. 2009. 174 f. Tese de doutorado em fitopatologia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.
- BODKER, L.; NIELSEN, B.J. Preventive and curative effect of fungicides against potato late blight under field conditions. **PPV-Special Report**, v.7, p.261-264, 2001.
- BODKER, L.; NIELSEN, B.J. Field Experiments with preventive and curative control of potato late blight. **PPO-Special Report**, v.8, p.211-215, 2002.
- BOSCO, L. C. et al. Sistema de previsão de requeima em cultivos de batata em santa Maria, RS. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 649-660, 2010.
- BRADSHAW, N.J.; SCHEPERS, H.T.A.M. Experiences with RH-117281 (zoxamide) – a new fungicide for the control of potato blight. **PPV-Special Report**, v. 7, p. 173- 183, 2001.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed**. FRAC monograph. 2. ed. rev. Brussels, v.1, p. 1-60, 2007.
- BROMMONSCHENKEL, S.H. Patogenicidade, compatibilidade, citogenética e padrões isoenzimáticos de isolados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary do Brasil. (Tese de Mestrado). Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 1988.
- BRYLIŃSKA, M. et al. Evaluation of PCR markers for *Phytophthora infestans* mating type determination. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, n. 1, p. 33-44, 2018. Disponível em : <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1445-4> Acesso em: 21 dez. 2018.
- CASA-COILA, V. H. et al. First Report of *Phytophthora infestans* Self-Fertile Genotypes in Southern Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 101, n. 9, p. 1682-1682, 2017.
- CASA-COILA, V.H. **Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary provenientes de batata do Sul do Brasil associada ao estudo da resistência em *Solanum* spp.** 2014. 126f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.
- CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biological Reviews**, v. 73, n. 3, p. 203–266, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1998.tb00030.x> Acesso em: 21 nov. 2018.

- CENTER FOR AGRICULTURE AND BIOSCIENCES INTERNATIONAL (CABI), 2019. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40970>. Acesso em: 14 janeiro 2019.
- CERQUEIRA, A. O. **Caracterização, distribuição e Genética populacional de *Phytophthora capsici* em *Hevea brasiliensis* na Bahia, Brasil**. 2014. 82f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Santa Cruz, Iheus, Bahia, 2014.
- CHAVES, S.C. **Genotypes Shape the Population Structure of *Phytophthora infestans* in the Central Region of Colombia**. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 109, n. 1, p. , 2019.
- CHOWDAPPA, P. et al. Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in South India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 64, n. 1, p. 191–199, 2015.
- CLINTON, G. P. Oospores of potato blight. **Science**. v. 33, n. 854, p. 744–747, 1911. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/1637606>. Acesso em: 08 jan, 2018.
- COOKE, D. E. L.; LEES, A. K. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. **Plant Pathology**. v. 53, p. 692-704, 2004.
- CROSIER, W. Studies in the biology of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, **Cornell University Agricultural Experiment Station**, Memoir, Ithaca, n. 155, p. 1-40, 1934.
- DAHLIN, P. **Analysis of sterol metabolism in the pathogenic oomycetes *Saprolegnia parasitica* and *Phytophthora infestans***. 2016. 60f. Tese. Universidade de Estocolmo, Estocolmo, 2016.
- DANIES, G. et al. Phenotypic characterization of recent clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v.97, n. 7 p.873-881, 2013.
- DAVIS, J. E.; KUBISIAK, T. L.; MILGROOM, M. G. Polymorphic sequence-characterized codominant loci in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, n.2, p.195–197, 2005.
- DE WEILLE, G.A. Forecasting crop infection by the potato blight fungus. A fundamental approach to the ecology of a parasite–host relationship. Koninklijk Nederlands Meteorologisch Instiuit, **Mededelingen Verhandelingen**, v. 82, p. 1-144, 1964.

- DEKKER, J. How to detect and measure fungicide resistance. In: *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology*, 1987. 299 p.
- DELGADO, R.A. et al. 2013. Large subclonal variation in *Phytophthora infestans* populations associated with Ecuadorian potato landraces. **Plant Pathology**, v. 62, n. 5, p. 1081–8, 2013.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.
- DOBROWOLSKI, M. P. et al. Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by microsatellites. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 6, p. 695–704, 2003.
- EBERSOLD, D. Ranman, the new marathon fungicide. **PPO-Special Report**, Edinburgh, v.8, p.225-230, 2002
- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic Spectrum of Benzimidazole Compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.
- ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. *Phytophthora* diseases worldwide. **American Phytopathological Society (APS Press)**, Saint Paul, 1996. 562 p.
- EUROBLIGHT – A potato late blight network for Europe. Disponível em: <http://agro.au.dk/forskning/internationale-platforme/euroblight/currently/news/nyhed/artikel/results-of-the-euroblight-potato-late-blight-monitoring-in-2018/> Acesso em: 14 de julho de 2019.
- FABRITIUS, A. L.; JUDELSON, H. S. Mating-type loci segregate aberrantly in *Phytophthora infestans* but normally in *Phytophthora parasitica*: Implications for models of mating-type determination. **Current Genetics**, v. 32, p. 60–65, 1997
- FERNÁNDEZ- PAVÍA, S. P.; GRÜNWARD, N. J.; FRY, W. E. Formation of *Phytophthora infestans* oospores in nature on tubers in central Mexico. **Plant Diseases**, Saint Paul, v. 86, p. 73, 2002.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 412 p.
- FLIER; W. G. et al. The population structure of *Phytophthora infestans* from de Toluca Vallery of central México suggests genetic differentiation between populations

- from cultivated potato and wild *Solanum* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 382-390, 2003.
- FLIER, W. G.; GRUNWALD, N. J.; FRY, W. E.; TURKENSTEEN, L. J. Formation, production and viability of oospores of *Phytophthora infestans* from potato and *Solanum demissum* in the Toluca Valley, central Mexico. **Mycological Research**, Inglaterra, v.105, n.8, p.998-1006, 2001.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), Roma, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/>. Acesso em: 21 jan. 2019.
- FORBES GA. Global overview of late blight. Proceedings Regional Workshop on Potato Late Blight for East and Southeast Asia and the Pacific. In: GLOBAL OVERVIEW OF LATE BLIGHT, Yezin Agricultural University, Myanmar, 2004. Disponível em: https://research.cip.cgiar.org/confluence/download/attachments/37192023/Proceedings_Gilb_final_completo.pdf?version=1&modificationDate=1273690250000. Acesso em: 21 mar. 2016.
- FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Classificação e descrição botânica. IN: PEREIRA, S. A.; DANIELS, J. (Eds.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 69-79.
- FRY LAB: Biology of *Phytophthora infestans* and Management of Late Blight – Cornell University – Department of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology. 2014, Disponível em: <http://www.plantpath.cornell.edu/Fry/Protocols-Culture.html>. Acesso em: 03 mar. 2014.
- FRY, W. E. et al. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 107-129, 1992.
- FRY, W. E. et al. Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. In: LAMOUR, K. Kamoun, S. (Ed.). **Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools**, Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, p. 139–164, 2009.
- FRY, W. E.; GOODWIN, S. B. Resurgence of the Irish potato famine fungus. **BioScience**, Washington, v. 47, p. 363-371, 1997.

- FRY, W. E.; GRUNWALD, N. J. 2010. Introduction to Oomycetes. **The Plant Health Instructor**, Saint Paul, 2010. Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/oomycete/introduction/Pages/IntroOomycetes.aspx>. DOI: 10.1094/PHI-I-2010-1207-01. Acesso em: 21 mar. 2016.
- FRY, W. E.; MIZUBUTI, E. S. Potato late blight. In: JONES, D. G. (Ed.). **The Epidemiology of Plant Diseases**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 371-388.
- FRY, W. E. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, p. 385-402, 2008.
- FRY, W. E. Role of early and late blight suppression in potato pest management. In: ZENDER, G. W.; POWLESON, M. L.; JANSSON R. K.; RAMAN, K. V. **Advances in potato pest: biology and management**. Saint. Paul, 1994. p. 166-177.
- FYFE, A. M.; SHAW, D. S. An analysis of self-fertility in field isolates of *Phytophthora infestans*. **Mycological Research**, v. 96, n. 5, p. 390–394, 1992.
- Fungicide Resistance Action Committee - FRAC, Disponível em: <http://www.frac.info/resistance-overview/mechanisms-of-fungicide-resistance> Acesso em: 04 dez. 2018.
- Fungicide Resistance Action Committee - FRAC, Disponível em: http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-microtiter-method-sporangia-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=479a419a_4 Acesso em: 17 out. 2017.
- GALINDO, J.; GALLEGLY, M. E. The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 50, p. 123 - 128, 1960.
- GALLEGLY, M. E.; GALINDO, J. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 48, p. 274–277, 1958.
- GAMBOA, S. et al. Análisis genético de la población actual de *Phytophthora infestans* en Perú / Genetic analysis of the current population of *Phytophthora infestans* in Peru. In: PEREZ, W., ANDRADE-PIEDRA, J.L., LUCCA, F., RESTREPO, S., Y ACUÑA, I. 2018. **Memorias del 3er. Taller de la Red de Cooperación Latinoamericana sobre el estudio del Tizón Tardío de las Solanáceas** (Tizón

Latino). Cusco, Perú. 27 de Mayo del 2018. Centro Internacional de la Papa (CIP, Perú), Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA, Chile), Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria (INTA, Argentina) y Universidad de los Andes (UNIANDÉS, Colombia), 2018. 19 p.

GARCÍA, B. I. L. **Risco climático de ocorrência da requeima da batata na região dos Andes, Venezuela.** 2005. 132 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba, 2005.

GARRY, G. et al. 2005. Genetic diversity and host differentiation among isolates of *Phytophthora infestans* from cultivated potato and wild Solanaceous hosts in Peru. **Plant Pathology**, v. 54, n. 6, p. 740–8, 2005.

GENET, J.L. et al. Effect of temperature on the curative and anti-sporulant action of cymoxanil for control of *Phytophthora infestans*. **Fifth Workshop of an European Network for development of an Integrated Control Strategy of potato late blight**, Munich, p.107-117, 2000.

GEORGOPOULOS, S. G. Detection and measurement of fungicide resistance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S. G. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen: Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. p. 24-31.

GOMEZ-ALPIZAR, L.; CARBONE, I.; RISTAINO, J. B. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 104, n. 09, p. 3306 - 3311, 2007.

GOODWIN, S. B.; COHEN, B. A.; FRY, W. E. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 91, p. 591–11,595, 1994.

GOODWIN, S. B.; DRENTH, A.; FRY, W.E. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. **Current Genetics**, v. 22, p. 107–15, 1992a.

GOODWIN, S. B. et al. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 955-61, 1992b.

- GOSS, E. M. et al. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 111, n. 24, p. 8791–8796, 2014.
- GRÜNWARD, N. J. et al. Analysis of Genotypic Diversity Data for Populations of Microorganisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 738- 746, 2003.
- GRUNWARD, N. J. et al. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 9, p. 882–890, 2001.
- GUO, J. et al. *Phytophthora infestans* isolates form Northern China show high virulence diversity but low genotypic diversity. **Plant Biology**. Stuttgart, v. 11, n. 1, p. 57-67, 2009.
- GILCHRIST RAMELLI, E. et al. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Antioquia, Colombia. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín , v. 62, n. 2, p. 5031-5037, 2009. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000200001 Acesso em: 07 jul. 2017.
- GOLD, R. et al. Initium® – An Innovative Fungicide of a New Chemical Class for the Control of Oomycetes. **BCPC Congress**, 2009.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, n. 41, p. 95-98, 1999.
- HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Ohio, v.69, n.10, p.1685-1693, 1982.
- HARRISON, J.G. Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage - a review. **Plant Pathology**, v. 41, n. 4, p. 384-416, 1992.
- HARRISON, J. G.; LOWE, R. Effects of humidity and air speed on sporulation of *Phytophthora infestans* on potato leaves. **Plant Pathology**, v. 38, n. 4, p. 585-591, 1989.
- HARTILL, W.F.T. et al. Effects of temperature and Leaf wetness on the potato late blight. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 18, n. 4, p. 181-184, 1990.

- HAAS, B. J. et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature**, London, v. 461, p. 393-398, 2009.
- HENFLING, J. W. **El tizón tardío de la papa: *Phytophthora infestans***. 2 ed. Lima: Centro Internacional de La Papa, 1987. 25 p.
- HENSEN, I.; OBERPRIELER, C.; WESCHE, K. Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill.(Ranunculaceae) in Central Germany. **Flora**, Jena, v. 200, n. 1, p. 3-14, 2005.
- HERMANN, D.; BARLETT, D.W.; FISCHER, W.; KEMPF, H.J. The behavior of mandipropamid in plants. In: BCPC CROP SCIENCE & TECHNOLOGY, 2005, Glasgow. Proceedings. Glasgow: BCPC, 2005. p. 93-98.
- HIJMANS, R. J.; FORBES, G. A.; WALKER, T. S. Estimating the global severity of potato late blight with GIS-linked disease forecast models. **Plant Pathology**, v. 49, n. 6, p. 697-705, 2000.
- HOOVER, W. J. **Compendium of potato diseases**. American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota, USA. 1981. 125 p.
- HU, J.H.; HONG, C.X.; STROMBERG, E.L.; MOORMAN, G.W. Effects of propamocarb hydrochloride on mycelial growth, sporulation, and infection by *Phytophthora nicotianae* isolates from Virginia nurseries. **Plant Disease**, v. 91, n. 4, p. 414– 420, 2007.
- HUGGENBERGER, F.; KNAUF-BEITER, G. Mandipropamid a new fungicides for the control of late blight in potatoes. **PPO-Special Report**, v.12, p. 67-76, 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> Acesso: 25 de jan. de 2019.
- INTERNATIONAL POTATO CENTER - CIP. Lima, 2019. Disponível em: <https://cipotato.org/crops/potato/>. Acesso em: 22 janeiro 2019.
- IVORS K. et al. Use of microsatellite markers derived from whole genome sequence data for identifying polymorphism in *Phytophthora ramorum*. In: FRANKEL, S. J.; SHEA, P. J.; HAVERTY, M.I., (Ed.). Proceedings of the sudden oak death second science symposium: the state of our knowledge. General Technical Report. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, 2006a.

- IVORS K. et al. Microsatellite markers identify three lineages of *Phytophthora ramorum* in US nurseries, yet single lineages in US forest and European nursery populations. **Molecular Ecology**, v.15, p. 1493–1505, 2006b.
- JAMES, T. Y.; LIOU, S.-R.; VILGALYS, R. The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.41, n.8, p.813–825, 2004.
- JOHNSON, D.A.; CUMMINGS, T.F.; GEARY, B. Postinfection activity of selected late blight fungicides. **Plant Disease**, v. 84 n. 10, p. 1116 - 1120, 2000.
- JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. (Ed.). **Compendium of tomato diseases**. Saint Paul: APS Press, 1991. 73 p.
- JUDELSON, H. S. Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of the oomycete *Phytophthora infestans*. **Molecular and General Genetics**, v. 252, v. 1-2, p. 155–161, 1996.
- JUDELSON, H.S.; BLANCO, F.A. The spores of *Phytophthora*: Weapons of the plant destroyer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 47-58, 2005.
- JUDELSON, H. S. et al. Metabolic adaptation of *Phytophthora infestans* during growth on leaves, tubers and artificial media. **Molecular plant pathology**, v. 10, n. 6, p. 843-855, 2009.
- JUDELSON, H. S.; SPIELMAN, L. J.; SHATTOCK, R. C. Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans*. **Genetics**, v. 141, n. 2, p. 503–512, 1995.
- KAMOUN, S. et al. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 4, p. 413-34, 2015.
- KAMOUN, S.; HUITEMA, E.; VLEESHOUWERS, V. G. A. A. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 5, p. 196-200, 1999.
- KAMOUN, S. Molecular genetics of phytopathogenic oomycetes. **Eukaryotic Cell**, Washington, v.2, p.191-199, 2003.
- KATO, M. et al. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 09, p. 973– 978, 1997.

- KNAPOVA G, GISI U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. **Plant Pathology**, v. 51, n. 05, p. 641- 653, 2002.
- KANDEL, K. P. **Transcriptomic studies of the early stages of potato infection by *Phytophthora infestans***. 2014. 245f. Tese (Doutorado). Universidade de Dúdea, Dundee, Escócia, 2014.
- KIM, K. J.; LEE, Y. S. Genetic DNA marker for A2 mating type in *Phytophthora infestans*. **The Journal of Microbiology**, v. 40, p. 254–259, 2002.
- KIRK, W. W. et al. Evaluation of potato late blight management utilizing host plant resistance and reduced rates and frequencies of fungicide applications. **Crop Protection**, v. 24, n. 11, p. 961-970, 2005.
- LATIJNHOUWERS, M.; DE WIT, P. J. G. M.; GOVERS, F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. **Trends in Microbiology**, Cambridge v. 11, n. 10, p. 462-469, 2003.
- LATORSE, M.P. et al. Tuber blight control: effect of foliar applied fungicides such as Infinito on viability of sporangia of *Phytophthora infestans*. **PPO-Special Report**, v.12, p.37-47, 2007.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. Revisão **Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.6, p.197-230, 1998.
- LEES, A. K. et al. Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. **Plant Pathology**, v. 55, n. 3, p. 311-319, 2006.
- LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. EMBRAPA-CNPQ; EMBRAPA-SPI, 1994. 67 p.
- LI, Y. et al. A new set of highly informative SSR markers for *Phytophthora infestans* population analysis assembled into an efficient multiplex. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 1098-1105, 2010.
- LI, Y. 2012. Multiplex SSR analysis of *Phytophthora infestans* in different countries and the importance for potato breeding. Tese de Doutorado. Universidade de Wageningen, Wageningen, Holanda.
- LI, Y., et al., 2013. Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Journal of Microbiological Methods**, 92:316-322. DOI: Doi 10.1016/J.Mimet.2012.11.021.

- LEGARD, D. E.; LEE, T. Y.; FRY, W.E. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: aggressiveness on tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, 85:1356-1361, 1995.
- LUCCA, M. F.; RESTREPO, S.; ACUÑA, I.; ZANOTTA, S. Genotipificación de poblaciones de *Phytophthora* en Latino América / Genotyping of *Phytophthora* populations in Latin America. In: PEREZ, W., ANDRADE-PIEDRA, J.L., LUCCA, F., RESTREPO, S., Y ACUÑA, I. **Memorias del 3er. Taller de la Red de Cooperación Latinoamericana sobre el estudio del Tizón Tardío de las Solanáceas** (Tizón Latino). Cusco, Perú. 27 de Mayo del 2018. Centro Internacional de la Papa (CIP, Perú), Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA, Chile), Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria (INTA, Argentina) y Universidad de los Andes (UNIANDES, Colombia), 2018. 19 p.
- LUCCA, M. F.; RESTREPO, S. Genetic population structure of *Phytophthora* spp. causing late blight on potato crops and Solanaceous hosts in Latin America. **Apresentação no 10th World Potato Congress (WPC) / XXVIII Congreso de La Asociación Latino Americana de La Papa (ALAP)**, Cusco – Peru, 2018.
- LOOMIS, T. A. Fundamentos de toxicología. 3. Ed. Zaragoza: Acribia, 1995. p. 444.
- LUDWIG, A. BOLLER, T. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, n. 1-2, p. 61–66, 1990.
- MARIETTE, N. et al. Aggressiveness and genetic structure of french populations of *Phytophthora infestans* from 2001 to 2008. Are the most aggressive isolates the fittest? In: Book of acts of 19th Triennial Conference European Association for Potato Research (EAPR). Brussels (Belgium) 6-11 July, 2014. 52 p.
- MARTIN, M.D. et al. 2013. Reconstructing genome evolution in historic samples of the Irish potato famine pathogen. **Nature Communications**. 4. Doi: 10.1038/ncomms3172. Acesso em: 14 de julho de 2019.
- MARTIN, M. D. et al. Genomic characterization of a South American *Phytophthora* hybrid mandates reassessment of the geographic origins of *Phytophthora infestans*. **Molecular Biology and Evolution**. 33, 478-91, 2015.
- MARTIN, E.A. 2019. The interplay of landscape composition and configuration: new pathways to manage functional biodiversity and agroecosystem services across Europe. *Ecology Letters*, v. 22, n. 7, p. 1083-1094. Doi: <https://doi.org/10.1111/ele.13265>. Acesso: 14 de julho de 2019.

- MAZÁKOVÁ, J. et al. Mating type distribution of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech Republic in 2007 and 2008. **Plant Protection Science**, Czech Republic, v. 46, n. 03, p. 89–97, 2010.
- MAZIERO, J. M. N. **Influencia da temperatura e do tempo de molhamento foliar nos componentes epidemiológicos de *Phytophthora infestans* e validação do simulador Blight no Brasil**. 2001. 73f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- MAYTON, H. et al. Oospore survival and pathogenicity of single oospore recombinant progeny from a cross involving US-17 and US-8 genotypes of *Phytophthora infestans*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 11, p. 1190-1196, 2000.
- MILLER, J. S.; HAMM, P. B.; JOHNSON, D. A. Characterization of the *Phytophthora infestans* population in the Columbia Basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 6, p. 656-660, 1997.
- MILGROOM, M. G.; PEEVER, T. L. Population biology of plant pathogens – The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 06, p. 608-617, 2003.
- MINOGUE, K. P.; FRY, W. E. Effects of temperature, relative humidity, and rehydration rate on germination of dried sporangia of *Phytophthora infestans*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, p.1181-1184, 1981.
- MITANI, S. et al. Biological properties of the novel fungicide cyazofamid against *Phytophthora infestans* on tomato and *Pseudoperonospora cubensis* on cucumber. **Pest Management Science**, v. 58, n. 2, p. 139-145, 2002.
- MIYAKE Y. et al. Fungicidal activity of Benthiavalicarb-isopropyl against *Phytophthora infestans* and its controlling activity against late blight diseases. **Journal Pesticide Science**, v. 30, n. 04, p. 390-396, 2005.
- MIZUBUTI, E. S. G.; FRY, W. E. Potato late blight. In: COOKE, B. M.; JONES, D. G.; KAYE, B. **The epidemiology of plant diseases**. Amsterdam: Springer, 2006. p. 445-471.
- MIZUBUTI, E. S. G.; FRY, W. E. Temperature effects on developmental stages of isolates from three clonal lineages of *Phytophthora infestans*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 08, p. 837-843, 1998.

- MOSA, A. A. et al. Occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* on potato in Japan. **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 55, n. 05, p. 615–620, 1989.
- MOURA, R. M. Relembrando Anton de Bary e sua obra fitopatológica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 337–343, 2002.
- MYCOBANK DATABASE, 2019. Disponível em: <http://www.mycobank.org/BioIoMICSDetails.aspx?Rec=21649>. Acesso em: 10 de julho de 2019.
- NAZARENO, N. R. X.; JACCOUND FILHO, D. S. Doenças fúngicas. In: PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. (Ed.). O cultivo da batata na região sul do Brasil. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 239-276, 2003.
- NAZARENO, N. R. X. et al. Controle da requeima da batata através do monitoramento das variáveis climáticas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 170-174, 1999.
- NIEDERHAUSER, J. S. *Phytophthora infestans*: The Mexican connection. In: LUCAS, J. A.; SHATTOCK, R. C.; SHAW, D. S.; COOKE, L. R. (Ed.) *Phytophthora*. Cambridge University Press, Cambridge, 1991. p. 25-45.
- NJOROGE, A.W. et al. Genotyping of *Phytophthora infestans* in eastern-Africa reveals a dominating invasive European lineage. **Phytopathology**, v. 109, n. 04, p. 670-680, 2019. Disponível em: https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHYTO-07-18-0234-R?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0234-R> Acesso em: 11 mar. 2019.
- OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicología**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. 704 p.
- OGUNDIWIN, E.A. et al. Construction of 2 intraspecific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Genome**, Ottawa, v. 48, n. 04, p. 698–711. 2005.
- OLIVA, R. F. et al. Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans sensu lato* in Ecuador. **Plant Pathology**, v. 51, n. 06, p. 710–719, 2002.

- OLIVEIRA, S. A. S. **Genetic structure, aggressiveness and fungicide sensitivity of *Phytophthora infestans* populations from the south and southeast regions of Brazil.** 2010. 96f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.
- OYARZUN, P. J. et al. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 03, p. 265-271, 1998.
- PORTER, L. D.; DASGUPTA, N.; JOHNSON, D. A. Effects of tuber depth and soil moisture on infection of potato tubers in soil by *Phytophthora infestans*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, n. 02, p.146-152, 2005.
- PROSPERO, S.; BLACK, J. A.; WINTON, L. M. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death. **Molecular Ecology**, v. 04, n. 04, p. 672-674, 2004.
- QI, J. Characterization of a *Phytophthora* mating hormone. **Science**, Washington v. 309, n. 5742, p. 1828-1828, 2005.
- RAMPERSAR, S. N. A Rapid Colorimetric Microtiter Bioassay to Evaluate Fungicide Sensitivity Among *Verticillium dahliae* Isolates. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 03, p. 248-255, 2011.
- RAPOSO, R. et al. Application of an Automated Quantitative Method to Determine Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* . **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 03, p. 294-296, 2015.
- REIMANN, S. et al. Initium®: a new fungicidal active ingredient for the control of Oomycetes. **PPO-Special Report**, v.14, p.89-94, 2010.
- REIS, A. **Caracterização das populações de *Phytophthora infestans* das regiões Sul e Sudeste do Brasil.** 2001. 88f. (Tese de Doutorado). Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- REIS, A. et al. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from southern and southeastern Brazil from 1998 to 2000. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 08, p. 896-900, 2003.
- REIS, A. et al. Sensitivity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans* to commonly used fungicides in tomato and potato crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 12, p. 1279-1284, 2005.

- REIS, E. M.; REIS, A. C.; FORCELINI, C. A. **Manual de fungicidas. Guia para o controle químico de doenças de plantas.** Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, 2007. 153 p.
- REIS, A.; RIBEIRO, F. H. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* do Distrito Federal e de Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n. 03, p. 270-276, 2006.
- REKAD, F. Z. et al. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in northwestern Algeria during 2008–2014, **Fungal Biology**, v. 121, n. 05, p. 467-477, 2017.
- REKANOVIC, E. et al. Sensitivity of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary Isolates to Fluazinam, Fosetyl-Al and Propamocarb-hydrochloride. **Journal Pesticides and Phytomedicine**, Belgrade, v. 26, n. 02, p. 111-116, 2011.
- RIBEIRO, O.K. A Historical Perspective of Phytophthora. In: *Phytophthora: a global perspective* (Lamour K, ed.): 1–10. Wallingford: CAB International, 2013.
- RISTAINO, J. B.; GUMPERTZ, M. L. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. **Annual Review of Phytopathology**. v. 38, p. 541-547, 2000.
- RUPP, J. V. Diversidade genética em progênies de milho doce utilizando marcadores SSR. 2008. 38f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2008.
- RUSSELL, P.E. A century of fungicide evolution. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 143, n. 01, p. 11–25, 2005.
- RUSSEL, P. E. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management.** 2004. 60f. FRAC, Cambridge, 2004.
- SALAMAN, R. N.; BURTON, W. G. **The History and Social Influence of the Potato.** Cambridge University Press, Cambridge, 1985. 599 p.
- SANGER, F., et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463–5467, 1977.
- SANTANA, F. M. 2006. **Distribuição e caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary associados à batata (*Solanum tuberosum* L.) na região sul do Brasil.** 2006. 76f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

- SANTANA, F. M.; GOMES, C. B.; ROMBALDI, C.; BIANCHI, V. J.; REIS, A. Characterization of *Phytophthora infestans* populations of southern Brazil in 2004 and 2005. *Phytoparasitica*, v.41, p.557-568, 2013.
- SATO, N. Effect of sporulating temperature on the limit temperature of indirect germination of the sporangia of *Phytophthora infestans*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 60, p. 60-65, 1994a.
- SATO, N. Effect of water temperature on direct germination of the sporangia of *Phytophthora infestans*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 60, p. 162-166, 1994b.
- SAVILLE, A. C.; MARTIN, M. D.; RISTAINO, J. B. (2016) Historic Late Blight Outbreaks Caused by a Widespread Dominant Lineage of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 12, p. 1-22, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0168381> . DOI: 10.1371/journal.pone.0168381. Acesso em: 04 dez 2018.
- SAVILLE, A. et al. Fungicide sensitivity of US genotypes of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary to six oomycete-targeted compounds. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 05, p. 659-666, 2015.
- SCHUMANN, G. L. The Irish potato famine and the birth of plant pathology. In: **Plant Diseases: Their Biology and Social Impact**. Minnesota: American Phytopathological Society, 1991. 397 p.
- SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v.354, n. 02, p.311-313, 2006.
- SCHUMANN, G. L.; D'ARCY, C. J. **Requeima da batateira e tomateiro**. 2000. Disponível em: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Oomycetes/Pages/LateBlightPort.aspx>. Acesso em: 01/10/2013.
- SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO (SEAB) - DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL (DERAL) - SEAB-DERAL. **Batata: aspectos economicos**. Curitiba: SEAB-DERAL, 1998. 40 p.
- SHARVELLE, E. G. **The nature and uses of modern fungicides**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1961. 308 p.

- SOUZA DIAS, J. A. C.; IAMAUTI, M. T.; FISCHER, I.H. Doenças da batateira. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). *Manual de fitopatologia Vol 2: Doenças de plantas cultivadas*. 5.ed. Ouro Fino-MG: Ceres, 2016. p. 125-147.
- SOUZA, J. R. **Potencialidade de Fungicidas e Agente Biológico no Controle de Requeima do Tomateiro**. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, 2013.
- STAMMLER, G.; BENZINGER, G.; SPEAKMAN, J. A rapid and reliable method for monitoring the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to boscalid. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 11-12, p. 746-748, 2007.
- STEVENSON, R.; LORIA, R.; FRANC, G. D.; WEINGARTNER, D. P. **Compendium of potato diseases**. Saint. Paul: APS, 2001. 134 p.
- STEVENSON, W. R. An integrated program for managing potato late blight. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 1047-1048, 1983.
- STEVENSON, W.; KIRK, W.; ATALLAH, Z. K. Managing foliar disease: early blight, late blight and white mold. In: JOHNSON, D. A. (Ed.). **Potato health management**. APS: Saint Paul, 2008. p. 209-222.
- SUASSUNA, N.D., MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Epidemiological components related to fitness contribute to the host specificity of *Phytophthora infestans* populations in Brazil. *Phytopathology*, v. 91, 2001.
- SUASSUNA, N. D.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. **Plant Pathology**, v. 53, n. 04, p. 405-413. 2004.
- SUGITA, T. et al. Analysis for Resistance to *Phytophthora* Blight (*Phytophthora capsici* Leon.) Using an Intraspecific Doubled-Haploid Population of *Capsicum annuum*". **Breeding Science**, v. 56, n. 02, p. 137-145, 2006.
- SUJKOWSKI, L.S. The influence of temperature on *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. **Journal of Phytopathology**, v. 120, n. 03, p. 271-275, 1987.
- TAFFOREAU, S. et al. Consento: New experiences on the control of late blight 2007-2008. A summary of recent data with Consento in Europe. **PPO-Special Report**, v.13, p.135-142, 2009.

- TAFFOREAU, S. et al. Infinito: Profile of a novel potato late blight fungicides. Summary of three years of development trials in Europe. **PPO-Special Report**, v.11, p.77-88, 2006.
- TANTIUS, P. H. et al. Occurrence of the A2 mating type and self-fertile isolates of *Phytophthora infestans* in England and Wales. **Plant Pathology**, v. 35, n. 04, p. 578–581, 1986.
- TAYLOR, M. C. et al. Relative performance of five forecasting schemes for potato late blight (*Phytophthora infestans*) I. Accuracy of infection warnings and reduction of unnecessary, theoretical, fungicide applications. **Crop Protection**, v. 22, n. 02, p. 275-283, 2003.
- TENZER, I. et al. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 09, p. 748–753, 1999.
- TÖFOLI, J. G. **Ação de fungicidas e indutores de resistência no controle da requeima e pinta preta na cultura da batata**. 2011. 176f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2011.
- TÖFOLI, J. G. et al. Ametoctradin: a new fungicide for potato late blight control. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 83, p. 1-6, 2016.
- TOFOLI, J. G.; MELO, P. C. T.; DOMINGUES, R. J. Ação protetora, residual, curativa e anti esporulante de fungicidas no controle da requeima e da pinta preta da batata em condições controladas. **Biológico**, v. 79, n. 2, p. 209-221, 2012.
- TOFOLI, J. G.; MELO, P. C. T.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. Requeima e pinta preta na cultura da batata: importância, características e manejo sustentável. **Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 33-40, 2013.
- TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; ZANOTTA, S. **Doenças fúngicas da batata**. In: SALAS, F.J.S.; TOFOLI J.G. (Eds.). *Cultura da batata: pragas e doenças*. 1. ed. Instituto Biológico: São Paulo, 2017. 222 p.
- THOMPSON J. M.; COOKE, L. R. The effect of mandipropamid on infection of potato leaves by *Phytophthora infestans*: an SEM study. **PPO-Special Report**, v.13, p.229- 236, 2009.

- TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.T. **Doenças do tomateiro – *Lycopersicon esculentum* Mill.** IN: GALLI, F. Manual de Fitopatologia – Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo: Ceres, 1980. 706 p.
- TOOLEY, P. W.; FRY, W. E.; VILLAREAL GONZALEZ, M. J. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. **Journal of Heredity**, v. 76, n. 06, p. 431-435, 1985.
- TORGESON, D. C. Determination and Measurement of Fungitoxicity. In: TORGESON, D. C. **Fungicides: An Advanced Treatise**, New York: Academic Press, v. 1, 1967. 742 p.
- TRIGIANO, R. N.; AMENT, M. H.; LAMOUR, K. H. Oomycota Organismos Similares a Fungos. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. (Ed.). **Fitopatologia conceitos e exercícios de laboratório**. 2.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010, p. 215-225.
- TRENTIN, G. **Avaliação de sistemas de previsão de ocorrência de *Phytophthora infestans* em batata**. 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- TURNER, R.S. After the famine: Plant pathology, *Phytophthora infestans*, and the late blight of potatoes, 1845-1960. **Historical Studies in the Physical and Biological Sciences**, v. 35, n. 02, p. 341-70, 2005.
- USABLIGHT, 2017. Disponível em: <https://usablight.org/>. Acesso em: 22 de novembro de 2017.
- VALENCIO, S. A. X. **Microtitulação colorimétrica para avaliar a sensibilidade de *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* spp. a fungicidas e caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp.** 2017. 101f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.
- VARGAS, A. et al. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Colombia: First report of the A2 mating type. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 01, p. 82-88, 2009.
- VARTANIAN, V.G.; ENDO, R. M. Survival of *Phytophthora infestans* in seeds extracted from infected tomato fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 03, p. 375-378, 1985.

- VEGA, B. et al. A rapid resazurin-based microtiter assay to evaluate Qoi sensitivity for *alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 09, p. 1262-1270, 2012.
- VEGA-SANCHEZ, M. E. et al. Host adaptation to potato and tomato within the US-1 clonal lineage of *Phytophthora infestans* in Uganda and Kenya. **Plant Pathology**, v. 49, n. 05, p. 531– 539, 2000.
- VIGNA, B.B.Z. et al. New microsatellite markers developed from *Urochloa humidicola* (Poaceae) and cross amplification in different Urochloa species. **BMC Research Notes**, v. 4, p. 523, 2011.
- WALE, S.; PLATT, H. W.; CATTLIN, N. **Disease pests and disorders of potatoes. A Color Handbook**. Amsterdam: Elsevier, 2008. 179 p.
- WANG, J. et al. High levels of diversity and population structure in the potato late blight pathogen at the Mexico centre of origin. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 04, p. 1091–1107, 2017.
- WANG, Z. et al. Development of an improved isolation approach and simple sequence repeat markers to characterize *Phytophthora capsici* populations in irrigation ponds in Southern Georgia. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5467-5473, 2009.
- WANG, X. W.; HAN, M.; GUO, L. Y. Comparison of molecular markers in mating type determination of *Phytophthora infestans*. **Mycosystema**, Beijing, v. 35, n. 12, p. 1535-1546, 2016.
- WATANABE, E. Y. **Produtividade de um clone de batata submetido às adubações mineral e orgânica**. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de concentração: Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.
- WERE, H. K. et al. Occurrence and distribution of potato pests and diseases in Kenya. **Potato Research**, v. 56, n. 04, p. 325– 42, 2013.
- WERNER, S. et al. Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. **FEMS Microbiology Letters**, United Kingdom, v. 208, n. 2, p. 169-173, 2002.

- WIDMARK , A. K. et al. *Phytophthora infestans* in a single field in southwest Sweden early in spring: symptoms, spatial distribution on genotypic variation. **Plant Pathology**, v. 56, n. 04, p. 573-579, 2007.
- YOSHIDA, K. et al. 2013. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. **eLife**, Cambridge, 2013. doi: 10.7554/eLife.00731.
- ZHANG, X. et al. An integrated BAC and genome sequence physical map of *Phytophthora sojae*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 19, n. 12, p. 1302-1310, 2006.
- ZHU, W. et al. Increased frequency of self-fertile isolates in *Phytophthora infestans* may attribute to their higher fitness relative to the A1 isolates. **Scientific Reports**, v. 6, n. 29428, p. 1-10, 2016.

8. ANEXOS

	16	16	17	17	17															
Final names	3	7	3	5	7															
SS	27	28		28	28	28	29	29	29	29	30	30	30	30	30	31	31	31	31	31
R4	8	1	282	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6
SCRI name				28	28	28	29	29	29	29	30	30	30	30	30	31	31	31	31	31
Eucablight name				4	7	9	1	3	6											
SCRI size (bp)	27	28	281	28	28	28	28	29	29	29	29	30	30	30	30	31	31	31	31	31
	8,2	0,5	,41	3,6	5,6	7,7	9,7	1,8	3,6	5,7	7,6	9,7	1,8	3,9	5,7	7,9	9,8	2,0	4,0	6,2
Ying Li PRI name	2	4		7	5	8	2	6	1	0	2	3	5	8	1	0	6	7	2	7
Ying Li PRI size	0	1	283	5	7	9	1	3	5	7	9	1								
	0,0	1,0	,00	4,9	7,2	9,1	0,9	2,9	4,9	7,0	8,8	1,3								
Final names	27	28	283	28	28	28	29	29	29	29	30	30	30	30	31	31	31	31	31	31
	9	1		5	7	9	1	3	5	7	9	1	3	5	7	9	1	3	5	7

SCRI to change names to match those chosen by PRI - agreed - but again not changed in error so kept as even numbers

SSR 6	SCRI name	x	210		X	216	218	220	X	x	x	x	X	X	old non-pigtail primers
	Eucablight name					217	219	221							old non-pigtail primers
	SCRI name	232	234	235	236	240	242	244	246	254	256	258	260	262	with Pigtail primers April 2010 onwards
	SCRI size (bp)	231, 77		234, 90	236, 11	239, 63	241, 76	243, 82	245, 75	253, 73	255, 76	257, 62	259, 79	262, 72	with Pigtail primers April 2010 onwards
	Ying Li PRI name			235		240	242	244	246						with Pigtail primers
	Ying Li PRI size			235, 41		239, 17	241, 56	243, 52	245, 14						with Pigtail primers
	final names	232	234	235	236	240	242	244	246	254	256	258	260	262	
SSR 8	SCRI name	256	258	260	264	266									
	Eucablight name			261	263	265	267								
	SCRI size (bp)	255, 66	258, 05	259, 72	263, 94	265, 80									
	Ying Li PRI name		258	260	264	266									
	Ying Li PRI size	257, 91	259, 55	263, 65	265, 45										
	final names	256	258	260	264	266									
SSR 11	SCRI name	328	331	341	356										
	Eucablight name		330	338	352										
	SCRI size (bp)	328, 35	330, 68	340, 76	356, 01										
	Ying Li PRI name		330	340	356										
	Ying Li PRI size	330, 35	339, 82	355, 70											
	final names	328	330	340	356										
															SCRI to change names to suit those chosen by PRI agreed so done - if cannot not changed in error so JH names kept!

Anexo 2. Continuação da lista de alelos e tamanhos de produtos dos 12 marcadores usados pelo para o estudo molecular por microssatélite (SSR)

this area alleles were originally named 2bp larger than should have been
 now corrected as the allele name and peak size match even with the 2bp longer pt primer

172	176	188	198	200	202	204	206	208	210	212	214	216	218	220	222	232	246	266
171, 71	175, 22	188, 48	196, 31	198, 27	200, 21	202, 43	204, 07	205, 82	207, 92	209, 93	213, 62	217, 45	219, 45	232, 24				
172	176	198	200	202	204	206	208	210	na	214	na	218	220	222				
173, 21	176, 72	198, 27	200, 21	202, 43	204, 07	206, 82	207, 92	209, 93		213, 62		217, 45	219, 45	221, 40				
172	173	181																
171, 80	173, 10	180, 62																
172	176	198	200	202	204	206	208	210		214		218	220	222	232	246	266	

Now re-worked with G11 pt primer. Some of the PR1 need to be checked. 140bp and its associated at SCR1 and are now re-named. The 200-222 range should now have been recorded. These peaks are weaker than the shorter peak sometimes seen as homozygotes and then are. Thus evidence that they are not artefacts. Do not delete for re-naming of alleles shown in n plus in accompanying files.

271	273	277	279	281	283	285	289	293										
272, 46	274, 76	278, 64	280, 68	282, 99	284, 93	286, 69	289, 63	293, 38										
			280	284		289		297										
			279, 76	284, 39		289, 27		296, 65										
271	273	277	279	281	283	285	289	293	297									

PR1 to change names to suit those chosen by SCR1 NB 225 and larger only found in Ecuador (P. and na)

156	158	160	162	164	166	168	170	172	174	176	184	188	190	206	208	210	212	214	216
156, 43	158, 64	160, 59	162, 37	164, 41	166, 57	168, 36	170, 41	172, 46	174, 41	176, 58	185, 11	188, 85	190, 80	206, 65	208, 69	210, 78	212, 71	214, 73	217, 00
156	158																		
155, 91	157, 80																		
156	158	160	162	164	166	168	170	172	174	176	184	188	190	206	208	210			216

IMPORTANT - Don't in peak size) about 148 and smaller which are remaining. At SCR1 we have seen across the whole range which means not an error (see figure to left). No occurs. Unsure why PR1 not recorded control isolates C2,C3 and C91