

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

**Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary
provenientes de batata do Sul do Brasil associada ao estudo da resistência em
Solanum spp.**

VICTOR HUGO CASA COILA

Pelotas, 2014

VICTOR HUGO CASA COILA

**Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary
provenientes de batata do Sul do Brasil associada ao estudo da resistência em
Solanum spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fitossanidade (área do conhecimento: Fitopatologia).

Orientador: Dr. Cesar Bauer Gomes
Coorientadora: Dra. Cândida Renata Jacobsen de Farias
Coorientador: Ph.D. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

Pelotas, 2014

VICTOR HUGO CASA COILA

Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary provenientes de batata do Sul do Brasil associada ao estudo da resistência em *Solanum* spp.

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Fitossanidade, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 14-03-2014

Banca examinadora:

.....
Dr. Cesar Bauer Gomes - Pesq. Embrapa Clima Temperado (Orientador)
Doutor em Agronomia (Fitopatologia) pela Universidade Federal de Viçosa

.....
Prof. Dr. Cândida Renata Jacobsen de Farias.
Doutor em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Edegar Antonio Rossetto.
Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Ph. D. Arione da Silva Pereira - Pesq. Embrapa Clima Temperado.
Doutor em Horticultura/Fitomelhoramento pela University of Guelph (Canada)

.....
Dr. Ailton Reis - Pesq. Embrapa Hortaliças.
Doutor em Agronomia (Fitopatologia) pela Universidade Federal de Viçosa

.....
Dr. Cley Donizeti Martins Nunes - Pesq. Embrapa Clima Temperado
Doutor em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

A Dios y a la santa tierra, a mis amados padres Víctor Eulogio e Fabiana, a mis hermanos y sobrinos, a mi enamorada Josiane y a mis hermanos que ya se fueron Pedro Alan, Pedro Víctor e Libia.

DEDICO!

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade, pela oportunidade da realização deste curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Clima Temperado, pelo fornecimento de infra-estrutura para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Programa do Estudante Convênio de Pós-Graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (PEC-PG/CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao pesquisador Dr. Cesar Bauer Gomes, pela orientação, acompanhamento desta pesquisa e por todo o apoio que me foi dado durante este tempo.

Ao pesquisador Ph D. Arione da Silva Pereira pelo fornecimento dos genótipos de batata para a execução do trabalho.

À pesquisadora Dra. Caroline Marques Castro pelo fornecimento do material para execução do trabalho.

Ao professor Ph D. Eduardo Mizubuti (UFV) pelo apoio durante a realização de parte do trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade pela contribuição acadêmica durante a minha formação.

Ao pesquisador Ph. D. Nilceu Nazareno do IAPAR pela ajuda incondicional durante as coletas realizadas nas lavouras de batata.

Ao pesquisador Dr. Ailton Reis pelo apoio brindado.

Aos pesquisadores Odoni e Giovani Olegario da Embrapa Canoinhas, pelo apoio durante as coletas realizadas no estado de Santa Catarina.

Ao professor Dr. Edemar Antonio Rossetto pela amizade ao longo dos anos.

À Josiane minha namorada por todo o apoio e incentivo durante estes anos.

A todos os amigos e colegas, Dediel Rocha, Israel Lima, Débora Cristina, Lúcia Somavilla, Michele Santiago, Daniele de Brum, Fernanda Cruz, Chaiane Signorini, Vanessa, Fernando Cabezas, Caroline Wille, Bianca Obes, Caroline Vaz, Elen, Priscila Rossatto, Emerson Lenz, Anderson, Laerte Terres, Monalize, Jaqueline, Aline, Gabriele, Elis, Gelson, Claudiomar.

Aos amigos da equipe da batata da Embrapa Clima Temperado.

Aos amigos Miller, Braz e Milene da Universidade Federal de Viçosa pelo grande apoio brindado durante a execução dos trabalhos realizados nessa Universidade.

Resumo

Casa-Coila, Victor Hugo. **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) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2014.

Phytophthora infestans, agente causador da requeima, é um patógeno altamente destrutivo na cultura da batata em diferentes regiões do globo, e, no Brasil, especialmente na região Sul. O entendimento das características genéticas e fenotípicas das populações de *P. infestans* existentes no Sul do país é de grande importância para o planejamento de medidas de controle a serem adotadas no manejo integrado da doença. Dessa forma, teve-se por objetivos nesse trabalho: 1) investigar a variabilidade genética de populações do patógeno coletados nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, através do estudo de grupos de compatibilidade (GC) e por análise por marcadores microsatélites (SSR); 2) avaliar a sensibilidade de isolados de *P. infestans* provenientes do Sul do Brasil a fungicidas sistêmico (metalaxyl) e protetor (clorotalonil) bem como a virulência desses isolados em uma série diferenciadora de clones de batata contendo genes R (resistência); e, 3) avaliar a resistência de diferentes genótipos de batata a dois isolados (GC A1 e A2) de *P. infestans*, em condições de campo e em laboratório (método do disco de folha e folha destacada), além de prospectar fontes de resistência ao patógeno em acessos de batata silvestre. De acordo com o estudo da variabilidade genética de *P. infestans*, os resultados evidenciaram que a população predominante em batata ainda é do GC A2 com 49,12% de ocorrência no Sul do país. Contudo, novas populações foram encontradas no estado de Santa Catarina e do Paraná em função da ocorrência de isolados A1 e autoférteis. Diversidade genética entre as populações estudadas foi detectada através de nove *primers* microsatélites cujos isolados do patógeno, coletados nos três estados, agruparam-se em quatro grupos distintos pela análise de coordenadas principais. Avaliando-se a virulência dos isolados, verificou-se elevada diversidade de raças (n=86), sendo o maior número de patótipos de *P. infestans* observado no estado do Rio Grande do Sul. Avaliando-se a sensibilidade dos isolados do oomiceto a metalaxyl, foram encontrados isolados resistentes; porém, não houve evidências de resistência dos isolados estudados a clorotalonil. Na avaliação da resistência de genótipos de batata a *P. infestans*, em condições de campo, verificou-se interação significativa entre genótipos e isolados, identificando-se material genético com resistência aos dois isolados do patógeno; todavia, observaram-se diferenças na agressividade

entre os dois isolados do patógeno, sendo aquela relacionada ao isolado do GC A2 foi a mais agressiva na maioria dos materiais avaliados. Comparando-se a reação a campo de diferentes genótipos de batata aos dois isolados de *P. infestans* com a severidade *in vitro* a esses mesmos isolados, verificou-se correlação positiva entre ambas as variáveis. No entanto, quando analisada a agressividade dos isolados a campo conjuntamente com as duas metodologias *in vitro*, verificou-se melhor relação entre esses ensaios para os genótipos resistentes e suscetíveis. Na avaliação da reação *in vitro* dos acessos de batata silvestre a *P. infestans*, foram encontrados acessos com reduzida severidade a uma raça complexa do patógeno, o que pode ser indicativo de uma possível fonte de resistência para uso em programas de melhoramento de batata visando resistência a requeima.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum*, requeima, grupos de compatibilidade, diversidade genética, genes R, insensibilidade, resistência genética, acessos silvestres.

Abstract

Casa-Coila, Victor Hugo. **Characterization of *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary potato isolates from south of Brazil in association with the study of resistance in *Solanum* spp.** 2014. 126f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2014.

Phytophthora infestans, the causal agent of late blight, is a highly destructive pathogen of potato crops in different regions of the world. In Brazil, it is especially important in the southern region. The knowledge of genetic and phenotypic characteristics of *P. infestans* populations in the South of Brazil is very important for planning control measures in integrated disease management. Thus, the objectives of this study were: 1) to investigate the genetic variability of pathogen populations collected in Rio Grande do Sul, Santa Catarina, and Paraná states through the study of mating type (MT) and by analysis of microsatellite (SSR) markers; 2) to evaluate the sensitivity of *P. infestans* isolates from southern Brazil to systemic (metalaxyl) and protector (chlorothalonil) fungicides, as well as the virulence analyze of these isolates in a differential series of potato clones containing resistant genes R; and 3) to evaluate the resistance of different potato genotypes to two *P. infestans* isolates (MT A1 and A2) in the field and at laboratory conditions (leaf disk and detached leaf methods), besides to prospect sources of resistance to the pathogen in wild potato accesses. According to the study of genetic variability of *P. infestans*, the predominant population in potato is still the MT A2 at the rate of 49.12% occurrence in the South of the country. However, new populations have been found in Santa Catarina and Parana states as MT A1 and self-fertile. Genetic diversity among the studied populations was detected with nine microsatellite primers whose the pathogen isolates collected at three states were separated into four distinct groups by principal coordinates analysis. Evaluating the virulence of *P. infestans* isolates, there was a high diversity of strains (n= 86), and in Rio Grande do Sul state it was detected the largest number of pathotypes. Evaluating the sensitivity of the isolates to metalaxyl, resistant populations of oomycete were found; however, there is no evidence of resistance of *P. infestans* isolates to chlorothalonil. Evaluating the resistance of potato genotypes to *P. infestans* under field conditions, there was a significant interaction between genotypes and *P. Infestans* isolates. It was identified potato genetic materials with resistance to two isolates. However, there were differences in the aggressiveness between pathogen isolates (A1 and A2), where the MT A2 isolate was the most aggressive in majority of genotypes. Comparing the

response of different potato genotypes to two isolates of *P. infestans* in the field with in vitro severity to the same isolates, in general, there were positive correlations among these variables. Nevertheless, comparing the aggressiveness of *P. infestans* isolates in the field with both in vitro methodologies, it was observed a higher relationship between these tests for the resistant and susceptible genotypes. By the evaluation of in vitro reaction of wild potato accessions to *P. infestans*, it was found accessions with reduced severity to a complex race of the pathogen, which may be indicative of sources of resistance for use in potato breeding programs for resistance to late blight.

Keywords: *Solanum tuberosum*, late blight, mating types, genetic diversity, R genes, insensitivity, genetic resistance, wild accessions.

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1	Formação de oósporos em pareamentos entre três isolados (6 SvM, Campo2 e PL3b) de <i>Phytophthora infestans</i> e o padrão A1 (A,B,C); e, oósporo formado pelo isolado autofértil PGR-2 (D). Pelotas/RS, 2014.....	40
Figura 2	Localização e distribuição de grupos de compatibilidade de <i>Phytophthora infestans</i> (A1, A2, A1A2 e autoférteis), isolados ou em combinação, por município, nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Pelotas/RS, 2014.....	41
Figura 3	Formação <i>in vitro</i> de oósporo do isolado autofértil CON-2 (Contenda-PR) <i>Phytophthora infestans</i> em folha destacada de batata 10 dias após a inoculação. Pelotas/RS, 2014.....	43
Figura 4	Análise de coordenadas principais (PCoA) de 63 isolados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes da região Sul do Brasil e correspondentes aos períodos de coleta 2010-2012 (grupos 1,2,3,4) e 2004-2005-RS (grupo 1) com base na diversidade de nove marcadores (SSR) e de 43 alelos. Pelotas/RS, 2014.....	47
Figura 5	Alelos de isolados autoférteis de <i>Phytophthora infestans</i> , (A) alelos do isolado MF-07 (Santa Catarina), gerado pelo <i>primer</i> Pi02, alelos do isolado PGR-3 (Paraná), gerado pelo <i>primer</i> Pi33 (B). Pelotas/RS, 2014.....	49

Capítulo II

Figura 1	Frequência (%) e número (n) de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> , provenientes do Sul do Brasil, (■) resistentes, (■) moderadamente resistentes e (■) sensíveis ao fungicida metalaxyl. Pelotas, RS, 2014.....	66
Figura 2	Frequência (%) de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> (n= número de isolados), em diferentes classes de valores de CE ₅₀ (concentração efetiva) estimado para o fungicida clorothalonil. Pelotas/RS, 2014.....	70

Capítulo III

Figura 1	Dados de temperatura máxima (◆), média (○) e mínima (■), durante o período de avaliação da severidade de requeima em batata, em condições de campo. Pelotas/RS, 2014.....	81
Figura 2	Dados de umidade relativa do ar em percentagem (○) e de precipitação pluvial em mm (■), durante o período de avaliação da severidade de requeima em diferentes genótipos de batata inoculados com <i>Phytophthora infestans</i> , em condições de campo. Pelotas/RS, 2014.....	82
Figura 3	Discos foliares de batata inoculados com o isolado A2 (A,B,C) e A1 (D,E,F) de <i>Phytophthora infestans</i> . Pelotas/RS, 2014.....	84
Figura 4	Folhas destacadas de batata inoculadas com <i>Phytophthora infestans</i> exibindo diferentes níveis de infecção e esporulação do patógeno. Pelotas/RS, 2014.....	85
Figura 5	Severidade de requeima em genótipos de batata infectados com o isolado A2 (A) e A1(B) de <i>Phytophthora infestans</i> , 28 dias após a inoculação (DAI), em condições de campo. Pelotas/RS, 2014.....	88

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1	Identificação e procedência de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> caracterizados por grupo de compatibilidade e utilizados para a extração de DNA. Pelotas/RS, 2014.....	30
Tabela 2	Sequência de marcadores microssatélite utilizados na caracterização molecular de 63 isolados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de lavouras de batata do Sul do Brasil. Pelotas/RS, 2014.....	32
Tabela 3	Identificação, origem, localização geográfica e determinação de grupos de compatibilidade de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> coletados no Sul do Brasil, durante os anos 2010-2012. Pelotas/RS, 2014.....	35
Tabela 4	Número de alelos e diversidade gênica obtidos com nove marcadores microssatélite. Pelotas/RS, 2014.....	44
Tabela 5	Avaliação do índice de desequilíbrio de ligação de populações de <i>Phytophthora infestans</i> coletadas no Sul de Brasil, através do Índice de Associação. Pelotas/RS, 2014.....	45
Tabela 6	Análise de variância molecular (AMOVA) de amostras de <i>Phytophthora infestans</i> coletados no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Pelotas/RS, 2014.....	45

Tabela 7	Valores de diferenciação genética entre populações de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina e do Rio Grande do Sul da coleta 2010-2012 e isolados de RS da coleta 2004-2005, avaliados através da estatística F_{st} . Pelotas/RS, 2014.....	46
----------	---	----

Capítulo II

Tabela 1	Número de raças e patótipos de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes da Região Sul do Brasil determinadas em série diferenciadora de clones de batata contendo genes-R de resistência. Pelotas/RS, 2014.....	58
Tabela 2	Porcentagem de isolados virulentos a cada um dos clones de batata da série diferenciadora (R1-R11), e número de genes R infectados com <i>Phytophthora infestans</i> . Pelotas/RS, 2014.....	62
Tabela 3	Diversidade de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> quanto ao número de raças e índice de Gleason (Hgr) por origem (região/estado) e grupo de compatibilidade. Pelotas/RS, 2014.....	62
Tabela 4	Número de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> relacionados a número de gene <i>Avr</i> e relações entre número de isolados que produziram reação compatível entre genes R da planta e <i>Avr</i> do patógeno. Pelotas/RS, 2014.....	64
Tabela 5	Reação de Isolados de <i>Phytophthora infestans</i> , por grupo de compatibilidade, ao fungicida metalaxyl. Pelotas/RS, 2014.....	66
Tabela 6	Período de coleta e sensibilidade de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> (n= 131) de batata provenientes da região Sul do Brasil ao fungicida clorothalonil. Pelotas/RS, 2014.....	69
Tabela 7	Sensibilidade de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> , coletados no Sul do Brasil aos fungicidas metalaxyl e clorothalonil, grupo de compatibilidade (GC), hospedeiros, procedência e período de coleta. Pelotas/RS, 2014.....	72

Capítulo III

Tabela 1	Genótipos de batata utilizados para avaliação de resistência à <i>Phytophthora infestans</i> em condições de campo e “ <i>in vitro</i> ”. Pelotas/RS, 2014.....	80
----------	---	----

Tabela 2	Origem de acessos silvestres de <i>Solanum</i> spp. avaliados quanto à severidade <i>in vitro</i> de <i>Phytophthora infestans</i> . Pelotas/RS, 2014.....	87
Tabela 3	Médias de valores da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), severidade e reação de resistência a requeima de 24 genótipos de batata inoculados com dois isolados de <i>Phytophthora infestans</i> , em condições de campos. Pelotas/RS, 2014.....	90
Tabela 4	Médias de produtividade de massa de tubérculos (MT) em 24 genótipos de batata inoculados com dois isolados de <i>Phytophthora infestans</i> , em condições de campo. Pelotas/RS, 2014.....	92
Tabela 5	Severidade <i>in vitro</i> de dois isolados de <i>Phytophthora infestans</i> em discos foliares de 24 genótipos de batata. Pelotas/RS, 2014.....	96
Tabela 6	Severidade <i>in vitro</i> de dois isolados de <i>Phytophthora infestans</i> em folhas destacadas de 24 genótipos de batata. Pelotas/RS, 2014.....	98
Tabela 7	Índice de severidade <i>in vitro</i> de <i>Phytophthora infestans</i> em diferentes acessos de <i>Solanum</i> spp. avaliados pelo bioteste de disco foliar. Pelotas/RS, 2014.....	101

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	9
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	13
Sumário.....	16
1 Introdução geral.....	18
2 Capítulo I - Caracterização da variabilidade genética de isolados de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de batata do Sul do Brasil.....	23
2.1 Introdução.....	23
2.2 Material e Métodos.....	26
2.3 Resultados e Discussão.....	33
2.4 Conclusões.....	50
3 Capítulo II - Complexidade genética e sensibilidade de populações de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de batata e tomate do Sul do Brasil aos fungicidas metalaxyl e clorothalonil.....	51
3.1 Introdução.....	51
3.2 Material e Métodos.....	53
3.3 Resultados e Discussão.....	56
3.4 Conclusões.....	76

4 Capítulo III - Resistência genética de cultivares, clones e acessos silvestres de batata a <i>Phytophthora infestans</i>	77
3.1 Introdução.....	77
3.2 Material e Métodos.....	79
3.3 Resultados e Discussão.....	88
3.4 Conclusões.....	103
Referências.....	105
Apêndices.....	117

Introdução Geral

Com uma área de 128,276 ha destinadas ao plantio de batata e uma produção de 3.569,750 toneladas de tubérculos, o Brasil ocupa a 23ª posição quanto à produção de batata, terceiro alimento mais consumido no globo. De acordo com os dados do último ano agrícola, no País, obteve-se a maior produção de batata na região Sudeste (50,5%), seguida pela região Sul (40,5%), sendo os estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, responsáveis por 22,8, 15,5 e 3,9% da produção nacional (ABBA, 2013; IBGE, 2014).

No Brasil, o sistema de produção de batata absorve um elevado número de pessoas, (aproximadamente 20 pessoas/ha/ano) nas diversas atividades, razão pelo qual a cultura desempenha um importante papel sócio-econômico no país (ZAMBOLIM et al., 2011). No entanto, o bataticultor enfrenta problemas tanto na produção como na comercialização dos tubérculos (ABBA, 2010a). Dentre essas limitações, doenças como a requeima causado pelo oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont. De Bary), a pinta-preta causada pelos fungos *Alternaria solani* Sorauer e *Alternaria grandis* Simmons, a canela preta causada pela bactéria *Pectobacterium* spp., o nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) o nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.), vírus Y (*Potato virus Y* - PVY), e o vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll virus* - PLRV,) interferem negativamente no processo produtivo (NAZARENO; JACCOUD FILHO, 2003; RODRIGUES et al., 2010; LOPES; DUARTE; CARVALHO, 2010; SOUZA-DIAS, 2011; LIMA-MEDINA, 2013).

A requeima ou mela é considerada a doença mais prejudicial e destrutiva na cultura da batata e do tomate, sob condições meteorológicas favoráveis. Dessa forma, elevada umidade relativa do ar, baixas temperaturas e falta de medidas de

controle eficientes, durante o desenvolvimento da cultura, favorecem a ocorrência da doença, o que pode resultar na perda total da lavoura em uma semana (HARRISON, 1992; NOWICKI et al., 2012; CHMIELARZ et al., 2014).

A primeira descrição de *P. infestans* foi realizado por De Bary (1876) em lavouras de batata, sendo esse organismo relacionado á grande fome na europa, no final do século XIX, onde mais de 600 mil irlandeses morreram em função da devastação das lavouras por esse patógeno (ZADOKS, 2008). Embora até pouco tempo *P. infestans* tenha sido considerado como fungo, esse organismo pertence ao filo Oomycota do Reino Stramenopila, diferenciando-se dos fungos verdadeiros por apresentar celulose na parede celular das hifas, esporos biflagelados, sequências de DNA diferenciadas, entre outras características (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; TRIGIANO; AMENT; LAMOUR, 2010).

O gênero *Phytophthora* é heterotático e necessita de dois tipos de talo, denominados grupo de compatibilidade A1 e A2, para que ocorra a reprodução sexual. Quando esses dois grupos entram em contato, a reprodução sexuada é obtida pela união do oogônio e anterídio, os quais se fundem, formando o oósporo, esporo sexual de resistência (FRY et al., 1992; TRIGIANO; AMENT; LAMOUR, 2010). A espécie *P. infestans* é um patógeno policíclico, que, sob condições meteorológicas favoráveis, desenvolve-se na planta infectando hastes, folhas e ocasionalmente tubérculos, formando estruturas de reprodução assexuada denominadas de esporângios, propágulos comumente encontrados nos tecidos infectados pelo organismo. Essas estruturas são dispersas por correntes de ar e pela água da chuva para outras plantas sadias. Em temperaturas superiores a 15 °C, os esporângios podem germinar diretamente sobre o tecido da planta; porém, quando as temperaturas forem mais baixas (5 a 10 °C), podem liberar vários zoósporos biflagelados, que germinam ao entrarem em contato com o tecido foliar (MIZUBUTI; FRY, 2006; TRIGIANO; AMENT; LAMOUR, 2010; DANIES et al., 2013).

A reprodução assexuada de *P. infestans* leva à baixa variabilidade genética do patógeno; no entanto, se um isolado do grupo de compatibilidade (CG) A1 e A2 ocorrerem em uma mesma lavoura, a possibilidade de recombinação sexual eleva o nível de variabilidade do oomiceto, podendo surgir híbridos mais agressivos. Além disso, na ausência do hospedeiro, os oósporos formados podem persistir no solo constituindo-se como inóculo primário para novas infecções (MAYTON et al., 2000; PORTER; DASGUPTA; JOHNSON, 2005).

Phytophthora infestans tem seu centro de origem provável na região central do México, de onde se disseminou para outras partes do globo como variantes da linhagem clonal caracterizada e denominada US-1, pertencente ao CG A1 (SPIELMAN et al., 1991; GOODWIN; COHEN; FRY, 1994). Exceto no México, onde havia os dois grupos de compatibilidade de *P. infestans*, até meados de 1970, a linhagem clonal US-1 foi mundialmente predominante (SPIELMAN et al., 1991; GOODWIN; COHEN; FRY, 1994; BIRCH; COOKE, 2013). Porém, no início dos anos 80, constatou-se o aparecimento de isolados A2 na Europa ocidental (HANS; ISELIN, 1984). Posteriormente, a migração do GC A2 foi reportada em outros continentes.

No Brasil, a presença do GC A2 possivelmente se deu pela introdução de batata semente infectada e importada da Europa, desalojando a antiga população US-1 (REIS et al., 2003). Ainda, segundo o mesmo autor, em estudo realizado no início desse século, foi notada uma certa especificidade de isolados de *P. infestans* pelo hospedeiro, onde populações de tomate foram associadas ao GC A1 e, de batata, ao GC A2, sendo a linhagem clonal predominante em batata caracterizada como BR-1 (GOODWIN; COHEN; FRY, 1994). Nos últimos levantamentos realizados, tem sido observado a predominância do GC A2. No entanto, há menos de 10 anos, foi detectada a ocorrência de isolados dos grupos A1 e A2 em lavouras de batata dos estados de Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo (OLIVEIRA, 2010; SANTANA et al., 2013).

Mudanças na composição genética de populações de *P. infestans*, numa determinada região, podem ocorrer em função da migração de populações de outros locais, pela reprodução sexual, e ou por mutações ocorridas nas populações já existentes (AKINO; TAKEMOTO; HOSAKA, 2014). Até o momento, tem sido observado incremento na diversidade do patógeno em diversas partes do globo, muitas vezes, com o aparecimento de populações mais agressivas (DANIES et al., 2013; COOKE et al., 2012). No Brasil, as populações de *P. infestans* mudaram significativamente ao longo dos anos, e, segundo Oliveira (2010), a alta diversidade do patógeno tem sido mantida pelo fluxo gênico e eventos raros de recombinação. A coexistência dos GC A1 e A2, encontradas no Rio Grande do Sul, há menos de uma década (SANTANA et al., 2013), possibilita a ocorrência de reprodução sexuada, e, como consequência, isolados recombinantes podem estar presentes nestes locais, aumentando a diversidade de raças do patógeno.

Isolados de *P. infestans* autoférteis foram reportados na década de 80 na Inglaterra (TANTIUS et al., 1986), e, mais recentemente, na China, México e Egito. Esses isolados têm a capacidade de formar oósporos sem a presença dos padrões de compatibilidade e incrementam o risco de início de epidemias de requeima, pois os oósporos formados, podem permanecer viáveis durante vários anos no solo e dar início a novos ciclos da doença quando novas lavouras de batata são instaladas (HAN et al., 2013; ORONA et al., 2013; EL-GANAINY et al., 2013). Além disso, os oósporos podem originar uma população do patógeno mais diversa e, portanto, promoverem a ocorrência de isolados mais agressivos.

A principal medida de controle da requeima é baseada no uso de fungicidas, pois a maioria das cultivares de batata são suscetíveis ao patógeno (GISI et al., 2011; ABBA, 2010b). Entre os ingredientes ativos empregados no controle de *P. infestans*, o fungicida sistêmico metalaxyl ainda é utilizado em combinação com outros princípios ativos como os fungicidas protetores clorothalonil e mancozeb (AGROFIT, 2014). A aplicação de fungicidas muitas vezes é realizada em intervalos fixos, podendo variar entre três a cinco dias, quando as condições climáticas são favoráveis ao patógeno (NAZARENO et al., 1999; COOKE et al., 2011). Devido à intensificação do uso de fungicidas na produção de batata, populações de *P. infestans* resistentes a fungicidas sítio-específico como o metalaxyl, têm sido observadas em diversas partes do globo incluindo o Brasil (REIS et al., 2005; ZHU et al., 2008; LI et al., 2009). Assim, tal fato implica em aumento do custo de produção para o agricultor em virtude deste grande número de aplicações por safra.

Entre outras estratégias de manejo, o uso de cultivares com resistência estável e durável é um dos métodos mais desejados em função dos menores gastos com fungicidas, da redução dos riscos de contaminação do meio ambiente e a saúde do homem (EVENHUIS et al., 2009; KESSEL et al., 2010; PEREIRA et al., 2012). No entanto caracteres indesejáveis como aparência e qualidade culinária dos tubérculos, fora do padrão comercial aceitável, e, maturação tardia de cultivares de batata resistentes à requeima, restringem seu uso pelos produtores (FORBES et al., 2012; PEREIRA et al., 2012); além disso, a resistência raça-específica de algumas cultivares de batata é facilmente vencida pelo patógeno (LANDEO, 2002). Dessa forma, tais dificuldades são uma barreira a ser superada dentro dos programas de melhoramento genético de batata.

Ao longo dos anos, uma série de marcadores fenotípicos e genotípicos vem sendo utilizado no estudo da diversidade de *P. infestans*, dentre esses, a realização de trabalhos relacionados a grupos de compatibilidade do patógeno (JUDELSON, 1996), sensibilidade de isolados a fungicidas (SUJKOWSKI et al., 1995; COOKE et al., 2011), virulência de isolados em série diferenciadora de clones de batata (MALCOLMSON; BLACK, 1966; TOOLEY et al., 1986), isoenzimas (FORBES et al., 1998), haplótipos mitocondriais (GRIFFITH; SHAW, 1998; SANTANA et al., 2013), estudo através de marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) com a sonda RG-57 (GUO et al., 2010); e, na última década, o uso de marcadores microssatélites, também conhecidos como de sequências simples repetidas (SSR) (COOKE; LEES, 2004). Todos esses marcadores permitem mapear as migrações e composição da estrutura genética de *P. infestans*. Porém, apesar de se ter indícios da ocorrência de populações recombinantes de *P. infestans* na Região Sul do Brasil, estudos mais específicos a cerca de sua variabilidade genética são necessários para comprovar tal hipótese.

Dessa forma, teve-se por objetivo geral do estudo, contribuir para o desenvolvimento da bataticultura por meio do monitoramento das populações de *P. infestans* em lavouras do Sul do País, gerando conhecimentos para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento e do manejo da queima na cultura da batata. E, como objetivos específicos: 1) monitorar a diversidade de isolados de *P. infestans* no Sul do Brasil por grupos de compatibilidade e marcadores moleculares; 2) estudar a diversidade genética e complexidade desses isolados quanto à virulência em uma série diferenciadora de clones de batata, bem como avaliar sua sensibilidade a fungicidas sítio-específicos e não específicos; e, 3) avaliar a agressividade de isolados de *P. infestans* em diferentes genótipos de batata e prospectar fontes de resistência ao patógeno em germoplasma de batata silvestre.

2 CAPÍTULO I – Caracterização da variabilidade genética de isolados de *Phytophthora infestans* provenientes de batata do Sul do Brasil

2.1 Introdução

No Brasil, a produção de batata, na safra 2013, foi de 3.569.750 toneladas de tubérculos, sendo a região Sul, composta pelos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, responsável por aproximadamente 40,5% da produção do País (IBGE, 2014). No entanto, a cultura é afetada por vários problemas fitossanitários, dentre eles, doenças foliares como a pinta-preta e a requeima causadas pelo fungo *Alternaria solani* Sorauer *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, respectivamente (NAZARENO; JACCOUD FILHO, 2003).

Phytophthora infestans, é um dos patógenos mais destrutivos na cultura de batata por causar necrose nas folhas, hastes e tubérculos resultando em perdas significativas naquelas regiões produtoras que apresentam condições climáticas ideais para o desenvolvimento da doença (HARRISON, 1992; FORBES, 2012). Campos de produção de batata e tomate infectados com o patógeno podem ser devastados por completo em sete a dez dias (NOWICKI et al., 2012). Além disso, essas epidemias são favorecidas pela rápida reprodução assexuada do patógeno e facilidade de liberação dos esporângios os quais se disseminam pela água da chuva, vento e pela irrigação (HARRISON, 1992; FRY et al., 2013). Esse organismo pertence ao Reino Stramenopila (Chromista), Filo Oomycota, Classe Oomycetes, ordem Pythiales e família Phytiaceae; o qual se diferencia dos fungos verdadeiros por apresentar celulose na parede celular e núcleos diploides (2N), sequências de

DNA diferenciadas, além de outras características distintas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; TRIGIANO; AMENT; LAMOUR, 2010).

Phytophthora infestans é um microrganismo heterotático com dois grupos de compatibilidade, A1 e A2. E quando coexistem os dois GC, a interação das hifas de cada grupo induz a formação de anterídio e oogônio que se fundem formando o oósporo, o que significa que o patógeno tem a capacidade de reproduzir-se sexuadamente (FRY et al., 1992; BRURBERG et al., 2011). Este fato pode elevar o nível de variabilidade do fungo, possibilitando o surgimento de recombinantes mais agressivos. Além disso, por ser uma estrutura de resistência, o oósporo sobrevive em condições adversas e constitui-se como inóculo no início de novas infestações (MAYTON et al., 2000).

Até o final da década de 1970, a população mundial de *P. infestans*, exceto no México, consistia numa única linhagem clonal denominada US-1 (SPIELMAN et al., 1991; GOODWIN; COHEN; FRY, 1994; COOKE et al., 2011; YOSHIDA et al., 2013). O primeiro registro da ocorrência do GC A2 em lavouras de batata, fora do México, foi no continente europeu, no início dos anos 80 (HANS; ISELIN, 1984). Desde então, este GC foi constatado em outros países, entre eles o Brasil como a linhagem clonal BR-1 (A2) (BROMMONSCHENKEL; MATSUOKA, 1986; GOODWIN; COHEN; FRY, 1994), cuja predominância foi reportada por Reis et al. (2003) em lavouras de batata. Já durante os últimos anos, também foi constatada a ocorrência do GC A1 em lavouras de batata do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, apesar do GC A2 ainda ser predominante (OLIVEIRA, 2010; SANTANA et al., 2013).

De acordo com Mc Donald e Linde (2002), populações de fitopatógenos com alto potencial evolutivo apresentam maior probabilidade de superar a resistência genética do que aquelas com baixo potencial. Entre os mecanismos de variabilidade genética associados a esses patógenos, citam-se a mutação, recombinação sexual e fluxo gênico. As mutações ocorrem por mudanças diretas na sequência do DNA de genes individuais, criando assim, novos alelos nas populações com o surgimento de novas estirpes; a recombinação sexual permite o intercambio genético entre os organismos, resultando em progênies melhor adaptadas; e, as migrações de populações, ocorrem através do fluxo gênico onde genótipos migram de uma população para outra geograficamente separada. Nesse contexto, *P. infestans* pode aumentar seu potencial evolutivo no diagrama de riscos pelo alto fluxo de genótipo e pela reprodução sexuada (Mc DONALD; LINDE, 2002; NI et al., 2011).

A migração de *P. infestans* tem resultado em mudanças nas populações do patógeno (GUO et al., 2010; COOKE et al., 2012; ROJAS et al., 2014), e, quando coexistem os dois grupos de compatibilidade no mesmo local, a ocorrência de reprodução sexuada pode ser responsável pelo aumento da variabilidade genética (HAN et al., 2013). Até o momento, tem sido observado incremento na diversidade do patógeno em diversas partes do mundo, muitas vezes, com o aparecimento de populações mais agressivas como a linhagem 13_A2, detectada no continente europeu (COOKE et al., 2012). No Brasil, diferenças na agressividade de diferentes isolados de *P. infestans* em genótipos de batata, foram encontradas recentemente por CASA-COILA et al. (2012), sob condições de campo.

O surgimento de novas populações de *P. infestans* através da migração ou recombinação sexual, em muitos casos, resultou em incremento da diversidade genética (WIDMARK et al., 2011; CHMIELARZ et al., 2014). Os últimos estudos realizados no Brasil demonstram que as populações desse patógeno têm sofrido mudanças e existe uma grande diversidade de isolados mantida pelo alto fluxo gênico (OLIVEIRA, 2010). No Rio Grande do Sul, existem evidências de recombinação entre as populações dos dois grupos de compatibilidade encontradas; ao contrário das populações provenientes do Paraná e de Santa Catarina que, mantinham-se clonais até então (OLIVEIRA, 2010; SANTANA et al., 2013).

Tradicionalmente, a caracterização de populações de *P. infestans* tem sido realizada por meio de uma série de marcadores, dentre eles, o estudo dos grupos de compatibilidade, que é o primeiro indicador de grandes mudanças. Adicionalmente, são utilizados os padrões eletroforéticos das isoenzimas *glucose-6-fosfato isomerase* (*Gpi*) e *peptidase* (*Pep.*) resistência a metalaxyl, análise do padrão de bandas RFLP, análise do padrão de bandas do DNA mitocondrial (mtDNA) e virulência a plantas hospedeiras diferenciadoras (FRY et al., 1993; GUO et al., 2010).

Nos últimos anos, o uso de marcadores microssatélites codominantes tem contribuído significativamente no entendimento da genética de populações de *P. infestans* (LEES et al., 2006). A compreensão da diversidade genética das populações atuais do patógeno, no Brasil, passa pelo conhecimento de como ocorre a variabilidade, se existe migração de novas linhagens, pressão de seleção, ocorrência de isolados mais agressivos, e, se as populações A1 e A2 encontradas, estão recombinação-se. Estas informações contribuem de forma direta no manejo

da doença, considerando-se principalmente a obtenção de cultivares resistentes à requeima. Dessa forma, foram objetivos do presente estudo: 1) caracterizar populações de *P. infestans* coletadas no Sul do Brasil, com base na identificação dos grupos de compatibilidade e de marcadores microssatélite; e, 2) verificar a ocorrência de recombinantes sexuais na região de estudo.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Coleta de isolados de *Phytophthora infestans* em regiões produtoras de batata dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná

Foram coletados 188 isolados de *P. infestans*, dentre os quais, 176 durante os anos 2010-2013, e, 12 entre 2004 e 2005. As amostras foram obtidas a partir de folhas e haste de batata com sintoma típico de requeima nas principais regiões produtoras do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR). Coletou-se maior número de amostras no estado do RS, em função da maior incidência de requeima nas lavouras de batata, obtendo-se, assim, uma quantidade mais elevada de subamostras comparativamente aos estados do PR e de SC, onde houveram poucos focos de infecção do patógeno. Adicionalmente, foram obtidos dois isolados de plantas de tomateiro dos estados do PR (2010) e do RS (2011). As coletas foram realizadas na safra de outono-inverno e primavera-verão de cada ano, sendo cada amostra georrefenciada com o auxílio de um equipamento GPS (Global Positioning System) *Garmin* (Apêndice A).

A condução das coletas foi realizada com o apoio da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) e Embrapa Clima Temperado, no RS, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), em SC, e, do Instituto Agrônomo de Paraná (IAPAR), no PR. No RS, foram coletadas amostras em lavouras da região Sul (municípios de Cristal, São Lourenço do Sul, Pelotas, Canguçu e Rio Grande), da região Norte (municípios de Ibiraiaras, São José dos Ausentes, Bom Jesus e São Francisco de Paula), da região Central (município de Silveira Martins) e região da Serra (municípios de Nova Petrópolis, Santa Maria do Herval e Morro Reuter). Em SC, foram coletadas amostras nas regiões do Planalto Norte (municípios de Itaiópolis, Canoinhas, Major Vieira, Três Barras e Mafra) e Planalto Serrano (município de São Joaquim). No PR, foram

coletadas amostras na região Metropolitana (municípios de Guarapuava, Araucária, Lapa, Contenda, Balsa Nova, Campo Largo, Castro e Ponta Grossa), na região Centro-Sul (município de Pinhão) e no Sudoeste Paranaense (municípios de Palmas e São Mateus do Sul).

O ponto de coleta mais setentrional foi em Castro-PR ($-24^{\circ} 47' 27''$ S, $-50^{\circ} 0' 43''$ W) e o extremo meridional foi em Rio Grande-RS ($-32^{\circ} 02' 06''$ S, $-52^{\circ} 5' 56''$ W). De leste a oeste, a amplitude foi de leste em Araucária-PR ($-25^{\circ} 35' 35''$ S, $-49^{\circ} 24' 37''$ W) a oeste em Silveira-Martins-RS ($-29^{\circ} 40' 10.52''$ S, $-53^{\circ} 37' 51.37''$ W) (Figura 2).

2.2.2 Isolamento de *Phytophthora infestans*

Todos os procedimentos de isolamento e manutenção foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado. Para condução dos isolamentos, as amostras de folhas ou de caules infectadas, foram submetidas à câmara úmida em caixas gerbox com papel filtro umedecido. A seguir, o material foi mantido em BOD a $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24h, com a finalidade de induzir a esporulação do patógeno. Após este período, os esporângios foram transferidos para placas de Petri contendo meio Centeio-ágar-B (FRY LAB, 2005). A manutenção dos isolados foi realizada por repicagens periódicas em tubos de ensaio contendo meio centeio, mantidos em geladeira a 5°C .

2.2.3 Identificação dos grupos de compatibilidade

A caracterização *in vitro* dos grupos de compatibilidade (GC) dos isolados foi realizada pelo pareamento entre um isolado de *P. infestans* cujo GC era desconhecido com um conhecido A1 (US-1) ou A2 (BR-1), em meio V8 clarificado (FRY LAB, 2005). O procedimento foi realizado através da transferência de um disco de micélio com 5mm de diâmetro do isolado padrão e outro do desconhecido, para novas placas com o meio V8, a uma distância de aproximadamente 3cm um do outro. A seguir, as placas foram incubadas no escuro, durante três a quatro semanas a $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A avaliação consistiu na observação da presença de oósporos na zona de contato entre ambos os isolados, sob microscópio óptico. Os isolados

que produziram oósporo quando pareado com A1 e não produziram com o padrão A2, foram identificados como pertencentes ao GC A2 e vice-versa.

2.2.4 Determinação de isolados autoférteis

Foram obtidas culturas monoesporângicas de 28 isolados com suspeita de autofertilidade. Para isso, primeiramente foram obtidos esporângios da superfície do meio de cultura de centeio com sete a dez dias de idade, e a seguir, efetuou-se sua transferência para um tubo *ependorf* contendo 2mL de água esterilizada. Imediatamente, a suspensão obtida foi transferida para placas de Petri contendo meio ágar-água a 1% e incubada em BOD a $17 \pm 1^\circ\text{C}$. Decorridas 48 a 72h da incubação, foi realizado o isolamento monospórico dos esporângios cujo tubo de germinação era visível, realizando-se duas culturas monoesporângicas para cada isolado.

Após o crescimento da colônia do isolado monoesporângico, fragmentos do meio contendo o oomiceto, foram pareados com os padrões A1, A2 e com o mesmo isolado (autopareamento) em meio de cultura V8 clarificado (FRY LAB, 2005). A seguir, as placas foram mantidas em BOD a $17 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, durante três a quatro semanas. Decorrido esse período, a zona de contato entre as colônias do patógeno foi observada sob microscópio óptico conforme detalhado no item 2.2.3. Assim, isolados que produziram oósporos com o padrão A1, A2, e, quando autopareado, foram determinados como autoférteis.

2.2.5 Caracterização molecular de isolados de *Phytophthora infestans* por marcadores microssatélites

2.2.5.1 Extração de DNA

Para estudar a diversidade de 63 isolados de *P. infestans*, provenientes de lavouras de batata do Sul do Brasil (Tabela 1), coletados na safra de 2004-2005 e 2010-2012, primeiramente realizou-se a extração do DNA de cada amostra. Para tanto, discos de micélio, crescidos em meio de centeio-ágar-B com 10 dias de idade, foram transferidos para 100mL de meio líquido de ervilha (GOODWIN; SUJKOWSKI; FRY, 1995). Após 10 a 14 dias de incubação em BOD a $17 \pm 1^\circ\text{C}$, o micélio de cada

isolado foi filtrado, seco em papel filtro esterilizado e armazenado em freezer a -20°C. A seguir, a extração de DNA do micélio de cada amostra foi realizada conforme o protocolo de extração do *Mini kit DNeasy Plant* (QIAGEN), e conservado a -20°C até a sua utilização.

Tabela 1 - Identificação e procedência de isolados de *Phytophthora infestans* caracterizados por grupo de compatibilidade e utilizados para a extração de DNA. Pelotas/RS, 2014.

Nº ¹	Isolado	GC ²	Município	Estado\PC ³	Nº	Isolado	GC	Município	Estado\PC
1	CAMPO2	A2	Pelotas	RS-11	33	PGR-7	AF ⁵	Ponta Grossa	PR-12
2	Pel2f	A1A2	Pelotas	RS-11	34	PGR-3	AF	Ponta Grossa	PR-12
3	Emb-c	A2	Pelotas	RS-11	35	PR-01-a	AF	Palmas	PR-11
4	10 MR	ND ⁴	Morro Reuter	RS-10	36	CON-2	AF	Contenda	PR-12
5	5 NP	A2	Nova Petrópolis	RS-10	37	PR-17	AF	Araucária	PR-12
6	3 NP	ND	Nova Petrópolis	RS-10	38	PGR-1	AF	Ponta Grossa	PR-12
7	3 SvM	A1A2	Silveira Martins	RS-10	39	PR-27	A2	Lapa	PR-11
8	6 SvM	A2	Silveira Martins	RS-10	40	CON-1	AF	Contenda	PR-12
9	IBI6-d	ND	Ibiraiaras	RS-11	41	PR-10	AF	Castro	PR-11
10	CRI-2	A1	Cristal	RS-11	42	PRGU-5	AF	Ponta Grossa	PR-11
11	BJ-05	A2	Bom Jesus	RS-12	43	MF-07	AF	Mafra	SC-12
12	BJ-03	A2	Bom Jesus	RS-12	44	SC-16	ND	São Joaquim	SC-11
13	SJA-10	A1	São Jose dos Ausentes	RS-12	45	SC-C8	AF	Canoinhas	SC-12
14	1 CANG	A2	Canguçu	RS-10	46	SC-C4	AF	Canoinhas	SC-12
15	SL-5b	A1A2	São Lourenço do Sul	RS-11	47	SC-C2	AF	Canoinhas	SC-12
16	SL-01b	A2	São Lourenço do Sul	RS-11	48	SC-08	A2	Canoinhas	SC-11
17	Pel-05	A2	Pelotas	RS-12	49	SC-11	A2	Itaiópolis	SC-11
18	Pel-6	A1A2	Pelotas	RS-12	50	SC-03	A1	São Mateus do Sul	PR-11
19	4 CANG	A1	Canguçu	RS-10	51	15-SC	A2	Três Barras	SC-11
20	8 SMH	A2	Santa Maria do Herval	RS-10	52	SC-C11	A2	Major Viera	SC-12
21	CLAR-1	A2	Campo Largo	PR-12	53	SC-12-1	A2	Itaiópolis	SC-11
22	PL-3b	A2	Palmas	PR-11	54	151	A2	Santa Maria do Herval	RS-05
23	PR-03-a	AF	Pinhão	PR-11	55	166c	A2	São Jose dos Ausentes	RS-05

Nº ¹	Isolado	GC ²	Município	Estado\PC ³	Nº	Isolado	GC	Município	Estado\PC
24	PRGU1	A2	Guarapuava	PR-11	56	96	A2	Santa Maria	RS-04
25	PR-18	ND	Araucária	PR-11	57	89	A2	Silveira Martins	RS-04
26	PR-20	A2	Araucária	PR-11	58	157	A2	S. Francisco de Paula	RS-05
27	PR-3b	A2	Pinhão	PR-11	59	87	A1	Silveira Martins	RS-04
28	BN-02	AF	Balsa Nova	PR-12	60	149	A1	Santa Maria do Herval	RS-05
29	PR-24	A2	Contenda	PR-11	61	68	A1	Morro Redondo	RS-04
30	PL-01	A2	Palmas	PR-11	62	82	A2	Cristal	RS-04
31	CON-8	AF	Contenda	PR-12	63	99	A1	Canguçu	RS-04
32	PGR-2	AF	Ponta Grossa	PR-12					

¹Numeração válida para o estudo de Coordenadas principais; ²GC = Grupo de compatibilidade A1 e A2; ³PC= Período de coleta;

⁴ND = Não determinado; ⁵AF= Autofértil.

2.2.5.2 Análise por microsatélite multiplex

Todos os procedimentos relacionados a análise molecular dos isolados de *P. infestans* foram realizados no Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Os isolados foram caracterizados utilizando-se nove loci polimórficos microsatélites: PiG11 (KNAPOVA; GISI, 2002), Pi63_(Long), Pi70, Pi02, Pi04, Pi33, Pi56_(Long), Pi89 e D13 (LEES et al., 2006; COOKE, 2009). O iniciador de cada um dos *primers* foi marcado com três cores fluorescentes: FAM (Pi02, Pi63, D13, Pi70), NED (Pi33, Pi89, G11) e HEX (Pi04, Pi56) (Applied Biosystems) (Tabela 2). Três reações de PCR multiplex separadas foram realizadas em 9µL da reação Type it® Kit microsatélite (QIAGEN, USA). Para cada reação de amplificação [Mix 1 (Pi02, Pi89), Mix 2 (PiG11, Pi04, Pi70, Pi56_(Long), Pi63_(Long)) ou Mix 3 (Pi33, D13)] foi utilizado 1µL de 20ng de DNA. O PCR multiplex foi realizado em termociclador MyGene series peltier thermal MG96G, programado para uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min., seguido de 30 ciclos de 95°C por 30s de desnaturação, 60°C por 1min. 30s de anelamento e 72°C por 30s de extensão, e uma extensão final de 60°C por 30min.

Tabela 2 – Sequência de marcadores microsatélite utilizados na caracterização molecular de 63 isolados de *Phytophthora infestans* provenientes de lavouras de batata do Sul do Brasil. Pelotas/RS, 2014.

Primer	Sequência <i>primer</i> (5'-3')	Label	Tm ²	Referência
Pi02	F: CAGCCTCCGTGCAAGA	FAM	57	LEES et al. (2006)
Pi02	R: AAGGTGCGCGAAGACC	FAM		
Pi04	F: AGCGGCTTACCGATGG	HEX	57	LEES et al. (2006)
Pi04	R: CAGCGGCTGTTTCGAC	HEX		
Pi33	F: TGCCGACGACAAGGAA	NED	60	LEES et al. (2006)
Pi33	R: CGGTCTGCTGCTGCTC	NED		
Pi56cap	F: AACTATCTATCGGCGTGCAT	HEX	57	LEES et al. (2006)
Pi56 _(Long)	R: CAGGCCGCAATTGTAAGA	HEX		
Pi63	F: ATGACGAAGATGAAAGTGAGG	FAM	57	LEES et al. (2006)
Pi63 _(Long)	R: CGTATTTTCTGTTTATCTAACACC	FAM		
Pi70	F: ATGAAAATACGTCAATGCTCG	FAM	57	LEES et al. (2006)
Pi70	R: CGTTGGATATTTCTATTTCTTCG	FAM		
Pi89	F: GAGAACGCACAATGTAAGGC	NED	57	LEES et al. (2006)
Pi89	R: ACATAAATACACGCTGAACGG	NED		
D13	F: TGCCCCCTGCTCACTC	FAM	60	LEES et al. (2006)
D13 _(Long)	R: GCTCGAATTCATTTTACAGACTTG	FAM		
PiG11	F: TGCTATTTATCAAGCGTGGG	NED	57	KNAPOVA; GISI (2002)
PiG11	R: TACAATCTGCAGCCGTAAGA	NED		

¹Marcação com fluorescência, ²Tm = Temperatura de anelamento do *primer*.

Após a amplificação por PCR de cada amostra (isolado), os produtos foram diluídos em água Milli Q autoclavada e analisados quanto à marcação fluorescente através do sequenciador ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems, USA). A partir da genotipagem, os alelos das amostras de *P. infestans* foram avaliados através do software Gene Marker® 1,91 (Soft Genetic LLC®), sendo a determinação final do tamanho do alelo, baseada na sequência de bases de cada primer microssatélite (COOKE, 2009).

2.2.6 Análise dos dados

A análise de recombinação das populações de *P. infestans* foi avaliada através do Índice de associação (I_a^h), que quantifica a associação geral dos loci, calculado através do software GenoDive versão 2.0b23 (MEIRMANS, 2013). Para analisar a distribuição da variação genética entre e dentro de populações por análise de variância molecular (AMOVA), foi utilizado o software Arlequin v.3.0, (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005), cuja significância estatística foi testada em 999 permutações. A diferenciação genética par a par (F_{st}) entre populações de *P. infestans* foi calculado através do programa GenoDive versão 2.0b23 (MEIRMANS, 2013), submetido a teste de randomização com 1000 interações. A análise tridimensional de coordenadas principais foi realizada através da distância genética de Bruvo's utilizando-se o software GenoDive versão 2.0b23 (MEIRMANS, 2013).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Identificação dos grupos de compatibilidade

Dentre os isolados de *P. infestans* coletados no Sul do Brasil, determinou-se o grupo de compatibilidade de 116 provenientes de 71 lavouras de batata e duas de tomate de 29 municípios dos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e do Paraná (Tabela 3).

Entre os isolados de batata avaliados, 49,12% foram identificados como pertencentes ao GC A2, 15,78% ao GC A1, 10,52% ao grupo A1A2 e 24,56% foram autoférteis, sendo, os dois isolados de tomate caracterizados como A1. No Rio

Grande do Sul, dos 57 isolados caracterizados, 52,63% foram identificados como do grupo A2, 26,33% do grupo A1, e, 21,10% do grupo A1A2. Em Santa Catarina, de um total de 18 isolados, 55,55% foram caracterizados como A2, 38,88% autoférteis e 5,55% como A1. Já no estado do Paraná, de um total de 39 isolados, 53,84% foram identificados como autoférteis, 41,03% A2, e 5,13% como do grupo A1 (Tabela 3, Figuras 1 e 2).

No presente estudo detectou-se a ocorrência de isolados de *P. infestans* A1, A2 e A1A2 no RS, sendo os grupos A1 e A2, em proporções semelhantes aquelas reportadas por Santana et al. (2013) nessa mesma região; e, um leve aumento foi observado na percentagem de isolados A1A2. Entretanto, no estado do Paraná e em Santa Catarina, registra-se é o primeiro relato de ocorrência dos isolados do GC A1 (municípios de São Joaquim em SC e São Mateus do Sul e Palmas no PR); assim como também, a presença de isolados autoférteis em quatro lavouras de batata de SC, e em nove do PR, além das populações A2 já reportadas anteriormente como predominantes (REIS, 2001; SANTANA et al., 2013). No último levantamento realizado no Brasil, a presença de isolados A1 e A2 também foi constatada em lavouras de batata do estado de Minas Gerais e São Paulo, ampliando a diversidade de isolados até então relatada como predominantemente do GC A2 (OLIVEIRA, 2010).

Tabela 3 - Identificação, origem, localização geográfica e determinação de grupos de compatibilidade de isolados de *Phytophthora infestans* coletados no Sul do Brasil, durante os anos 2010-2012. Pelotas/RS, 2014.

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado ¹	Ano ²	Latitude	Longitude	Altitude	GC ³	Lavouras ⁴
1 CANG	Batata	Canguçu/RS	2010	-31,1707	-52,3658	152	A2	1
4 CANG	Batata	Canguçu/RS	2010	-31,0744	-52,2617	264	A1	2
1 NP	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010	-29,2305	-51,0158	652	A1	3
2 NP	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010	-29,2305	-51,0158	652	A1	3
5 NP	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010	-29,1247	-51,0338	741	A2	4
8 SMH	Batata	S. M. do Herval/RS	2010	-29,29	-51,0044	670	A2	5
1 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	-29,3825	-53,3555	462	A2	6
2 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	-29,3751	-53,3538	458	A2	7
3 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	-29,3742	-53,3404	484	A1A2	8
4 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	-29,3911	-53,3358	470	A2	9
6 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	-29,3833	-53,33	478	A2	10
9 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	-29,4454	-53,3439	87	A2	11
CRI-02	Batata	Cristal/RS	2011	-31,0215	-52,0617	66	A1	12
CRI-02(b)	Batata	Cristal/RS	2011	-31,0216	-52,0618	66	A1	12
CRI-03	Batata	Cristal/RS	2011	-31,0224	-52,0654	46	A2	13
CRI-05(a)	Batata	Cristal/RS	2011	-31,0254	-52,0649	80	A1	14
CRI-06	Batata	Cristal/RS	2011	-31,0337	-52,0757	115	A2	15
CRI-07(b)	Batata	Cristal/RS	2011	-31,0337	-52,0757	115	A2	15
SL-01(b)	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011	-31,124	-51,5648	63	A2	16
SL-01(c)	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011	-31,124	-51,5648	63	A2	16
SL-03	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011	-31,1244	-51,5648	63	A2	16
SL-04(b)	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011	-31,1056	-52,024	55	A2	17
SL-05(b)	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011	-31,1305	-53,0528	97	A1A2	18

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado ¹	Ano ²	Latitude	Longitude	Altitude	GC ³	Lavouras ⁴
SL-05(c)	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011	-31,1305	-53,0528	97	A1A2	18
EMB-C	Batata	Pelotas/RS	2011	-	-		A2	19
BR-CI	Batata	Pelotas/RS	2011	-	-		A2	20
CAMPO-2	Batata	Pelotas/RS	2011	-	-		A2	21
Pel-02 (a)	Batata	Pelotas/RS	2011	-31,3624	-52,3148	200	A1A2	22
Pel-02 (b)	Batata	Pelotas/RS	2011	-31,3651	-52,3149	200	A1A2	22
Pel-02 (d)	Batata	Pelotas/RS	2011	-31,3651	-52,3151	205	A1A2	22
Pel-02 (e)	Batata	Pelotas/RS	2011	-31,3627	-52,315	207	A1A2	22
Pel-02 (f)	Batata	Pelotas/RS	2011	-31,3625	-52,3149	208	A1A2	22
Pel-03	Batata	Pelotas/RS	2011	-31,362	-52,3143	209	A1A2	23
Pel 05	Batata	Pelotas/RS	2012	-	-		A2	24
Pel 06	Batata	Pelotas/RS	2012	-	-		A1A2	25
Pel 07	Batata	Pelotas/RS	2012	-	-		A1A2	26
Pel -08	Batata	Pelotas/RS	2013	-	-		A1	27
Pel 11	Batata	Pelotas/RS	2013	-	-		A2	28
RG-01	Batata	Rio Grande/RS	2013	-32,035	-52,0988		A2	29
IBI-01 (b)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	-28,2304	-51,3516	814	A2	30
IBI-01 c	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	-28,2303	-51,3515	814	A2	30
IBI-04 (a)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	-28,2256	-51,3643	835	A1	31
IBI-04 (b)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	-28,2256	-51,3643	835	A1	31
SJA-08	Batata	S. J. dos Ausentes	2012	-28,4319	-50,0754	1193	A1	32
SJA-10	Batata	S. J. dos Ausentes	2012	-28,3659	-49,5511	1165	A1	33
SJA-12	Batata	S. J. dos Ausentes	2012	-28,3657	-49,5513	1185	A1	33
SJA-13	Batata	S. J. dos Ausentes	2012	-28,365	-49,5506	1170	A1	33
SJA-14	Batata	S. J. dos Ausentes	2012	-28,3825	-49,5632	1267	A1	34
SJA-15	Batata	S. J. dos Ausentes	2012	-28,3828	-49,5628	1221	A1	34

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado¹	Ano²	Latitude	Longitude	Altitude	GC³	Lavouras⁴
SJA-16	Batata	S. J. dos Ausentes	2012	-28,3826	-49,5632	1219	A2	35
SJA-17	Batata	S. J. dos Ausentes	2012	-28,3823	-49,5631	1221	A2	35
BJ-02	Batata	Bom Jesus/RS	2012	-28,3718	-50,2506	1079	A2	36
BJ-03	Batata	Bom Jesus/RS	2012	-28,3719	-50,2509	1075	A2	36
BJ-04	Batata	Bom Jesus/RS	2012	-28,3716	-50,2508	1073	A2	36
BJ-05	Batata	Bom Jesus/RS	2012	-28,3717	-50,250	1075	A2	37
BJ-07	Batata	Bom Jesus/RS	2012	-28,3655	-50,2941	1055	A2	38
SFP-08	Batata	S. F. de Paula/RS	2012	-29,2739	-50,2026	920	A2A1	39
SC-08	Batata	Canoinhas/SC	2011	-26,1124	-50,2158	784	A2	40
SC-C01	Batata	Canoinhas/SC	2012	-26,0511	-50,2305	792	AF	41
SC-C02	Batata	Canoinhas/SC	2012	-26,051	-50,2302	786	AF	41
SC-C04	Batata	Canoinhas/SC	2012	-26,0446	-50,235	766	AF	42
SC-C08	Batata	Canoinhas/SC	2012	-26,0518	-50,3224	785	AF	43
SC-11	Batata	Itaiópolis/SC	2011	-26,2418	-49,4927	892	A2	44
SC-12	Batata	Itaiópolis/SC	2011	-26,2412	-49,4919	888	A2	44
SC-12 (1)	Batata	Itaiópolis/SC	2011	-26,2412	-49,4919	888	A2	44
SC-15	Batata	Três Barras/SC	2011	-26,1737	-50,0702	793	A2	45
SC-SJ-07	Batata	São Joaquim/SC	2011	-28,1655	-49,1835	1350	A1	46
SC-C11	Batata	Major Viera/SC	2012	-26,2131	-50,2048	776	A2	47
SC-C12	Batata	Major Viera/SC	2012	-26,2121	-50,2041	790	A2	47
MF-01	Batata	Mafra/SC	2012	-26,1001	-49,5106	903	A2	48
MF-03	Batata	Mafra/SC	2012	-26,1002	-49,5107	900	A2	48
MF-04	Batata	Mafra/SC	2012	-26,1004	-49,5108	906	A2	48
MF-05	Batata	Mafra/SC	2012	-26,1006	-49,5109	898	AF	48
MF-06	Batata	Mafra/SC	2012	-26,1009	-49,5105	889	AF	48
MF-07	Batata	Mafra/SC	2012	-26,1006	-49,5104	886	AF	48

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado ¹	Ano ²	Latitude	Longitude	Altitude	GC ³	Lavouras ⁴
SC-03	Batata	S. Mateus do Sul/PR	2011	-26,011	-50,3451	762	A1	49
PR-03(a)	Batata	Pinhão/PR	2011	-25,4816	-51,4357	1076	AF	50
PR-03(b)	Batata	Pinhão/PR	2011	-25,4816	-51,4357	1076	A2	50
PR-07 c	Batata	Ponta Grossa/PR	2011	-25,1256	-50,0755	847	A2	51
PGR-01	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	-25,1228	-50,0712	799	AF	52
PGR-02	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	-25,1227	-50,0712	794	AF	52
PGR-03	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	-25,1226	-50,0711	794	AF	52
PGR-04	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	-25,1224	-50,071	787	AF	52
PGR-05	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	-25,1234	-50,0654	822	AF	52
PGR-06	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	-25,124	-50,0701	824	AF	52
PGR-07	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	-25,1256	-50,0708	814	AF	52
PR-10	Batata	Castro/PR	2011	-24,515	-49,535	1016	AF	53
PR-15	Batata	Araucária/PR	2011	-25,4222	-49,2356	896	A2	54
PR-17	Batata	Araucária/PR	2011	-25,4409	-49,2341	899	AF	55
PR-20	Batata	Araucária/PR	2011	-25,4225	-49,2343	908	A2	56
AR-02	Batata	Araucária/PR	2012	-25,4416	-49,2337	918	A2	57
PR-24	Batata	Contenda/PR	2011	-25,4013	-49,2949	928	A2	58
CON -1	Batata	Contenda/PR	2012	-25,3849	-49,3424	901	AF	59
CON-2	Batata	Contenda/PR	2012	-25,3852	-49,3426	899	AF	59
CON-3	Batata	Contenda/PR	2012	-25,3855	-49,3425	891	AF	60
CON-4	Batata	Contenda/PR	2012	-25,3852	-49,3421	893	AF	60
CON-5	Batata	Contenda/PR	2012	-25,3857	-49,3328	907	AF	61
CON-6	Batata	Contenda/PR	2012	-25,3856	-49,3337	896	AF	61
CON-8	Batata	Contenda/PR	2012	-25,3859	-49,3331	905	AF	61
PR-25	Batata	Lapa/PR	2011	-25,4651	-49,4542	902	A2	62
PR-26	Batata	Lapa/PR	2011	-25,4651	-49,4542	902	A2	62

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado ¹	Ano ²	Latitude	Longitude	Altitude	GC ³	Lavouras ⁴
PR-27	Batata	Lapa/PR	2011	-25,4651	-49,4542	902	A2	62
PR-01-a	Batata	Palmas/PR	2011	-26,2922	-52,0319	1111	AF	63
PR-PL01	Batata	Palmas/PR	2011	-26,1947	-51,551	1126	A2	64
PR-PL04	Batata	Palmas/PR	2011	-26,3636	-51,3902	1257	A2	65
PL-03(a)	Batata	Palmas/PR	2011	-26,3356	-51,4629	1273	A1	66
PL-03(b)	Batata	Palmas/PR	2011	-26,3356	-51,4629	1273	A2	66
PRGU-01	Batata	Guarapuava/PR	2011	-25,2039	-51,4022	1049	A2	67
PRGU-05	Batata	Guarapuava/PR	2011	-25,1236	-51,4159	1120	A2	68
CLAR-01	Batata	Campo Largo/PR	2012	-25,234	-49,2918	974	A2	69
CLAR-02	Batata	Campo Largo/PR	2012	-25,234	-49,2917	998	A2	69
CLAR-06	Batata	Campo Largo/PR	2012	-25,2303	-49,2839	994	AF	70
CLAR-07	Batata	Campo Largo/PR	2012	-25,2301	-49,2838	1001	AF	70
BN-02	Batata	Balsa Nova/PR	2012	-25,3331	-49,3627	897	AF	71
TOM-D	Tomate	Pelotas/RS	2010	-	-		A1	72
PR-TOM	Tomate	Araucária/PR	2011	-25,4225	-49,2343	908	A1	73

¹Estado: RS = Rio Grande do Sul, SC = Santa Catarina, PR = Paraná, ²Ano de coleta; ³GC = Grupo de compatibilidade (A1,A2, A1A2), AF= isolado autofértil; ⁴Lavouras de batata e tomate.

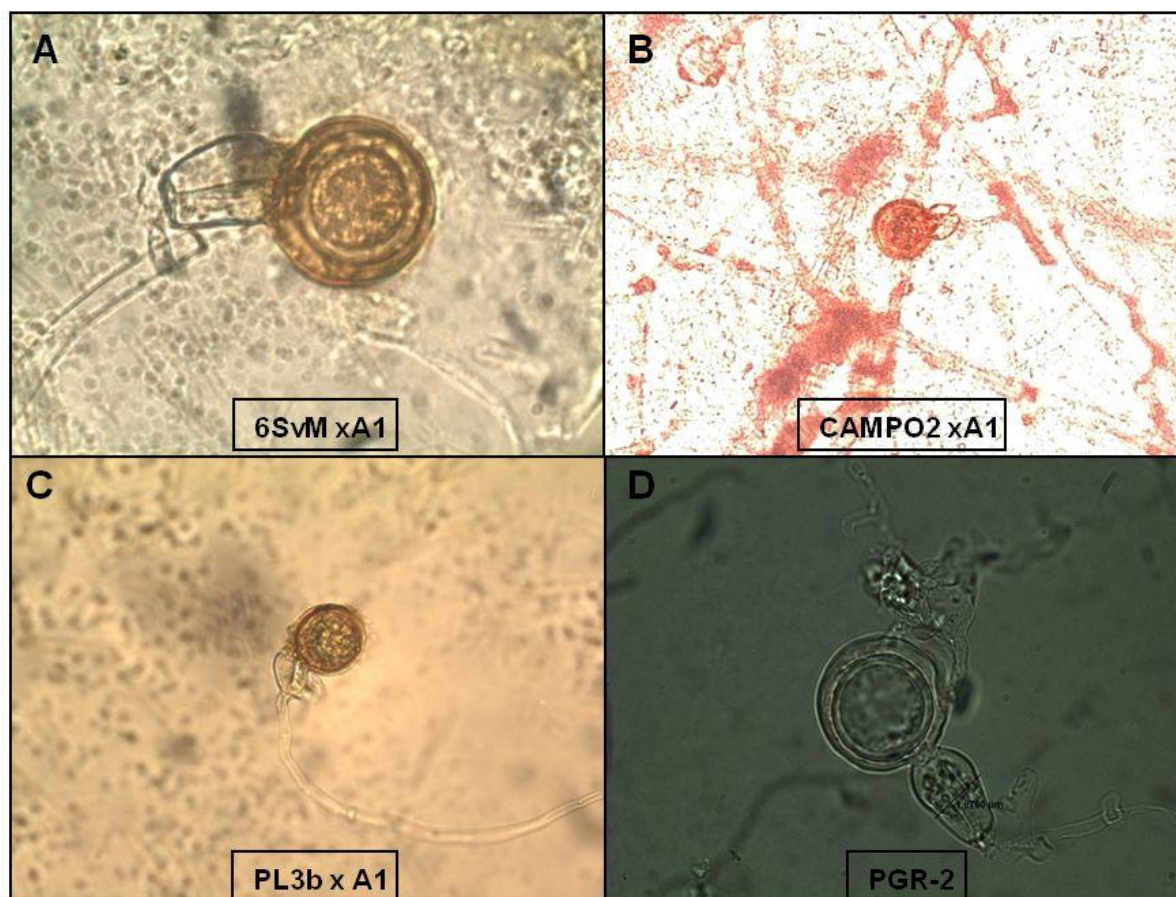


Figura -1 Formação de oósporos em pareamentos entre três isolados (6 SvM, Campo2 e PL3b) de *Phytophthora infestans* e o padrão A1 (A,B,C); e, oósporo formado pelo isolado autofértil PGR-2 (D). Pelotas/RS, 2014.

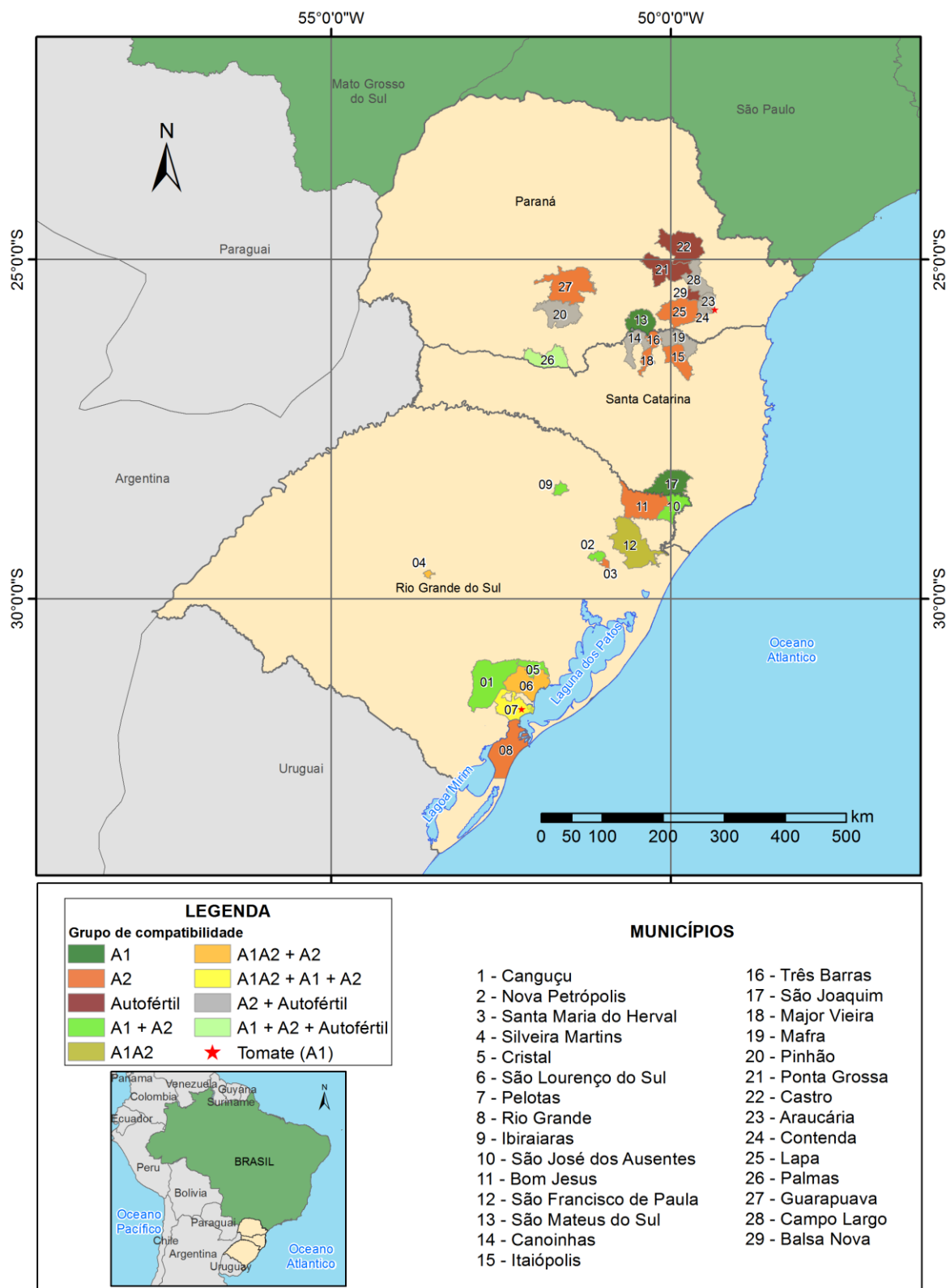


Figura 2 – Localização e distribuição de grupos de compatibilidade de *Phytophthora infestans* (A1, A2, A1A2 e autoférteis), isolados ou em combinação, por município, nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Pelotas/RS, 2014.

As constantes migrações de linhagens de *P. infestans* são reportadas em diversas partes do mundo, e, muitas vezes, com o ressurgimento ou surgimento de linhagens mais agressivas (NYONGESA et al., 2012; COOKE et al., 2012). Populações atípicas do patógeno nestes últimos anos, no Brasil, vêm sendo constatadas com o surgimento de isolados do grupo de compatibilidade A1 e autoférteis nos estados de PR e SC, conforme detectado nesse estudo (Figura 2). Uma possibilidade do aparecimento de isolados A1 em lavouras de batata no PR e em SC é a migração de isolados das populações já existentes no Rio Grande do Sul (SANTANA, 2006). Outra possibilidade, principalmente relacionada à detecção dos isolados autoférteis, pode estar vinculada à importação de batatas-semente infectadas do continente europeu cuja presença já foi relatada em países da Ásia, África, Europa e América do Norte (TANTIUS et al., 1986; HAN et al., 2013; ORONA et al., 2013; EL-GANAINY et al., 2013). A migração do patógeno através de sementes de tubérculos infectadas como uma alternativa para o incremento da variabilidade genética (GUO et al., 2010; SJÖHOLM et al., 2013), poderia ser uma hipótese, ou, também, estas populações poderiam estar presentes em baixa frequência nos campos de batata e não haviam sido detectadas até o momento.

Da mesma forma, como existem evidências de ocorrência de reprodução sexual entre populações de *P. infestans* no Rio Grande do Sul (OLIVEIRA, 2010; SANTANA et al., 2013), há a possibilidade do surgimento de novas linhagens recombinantes, tais como aquelas encontradas na Europa por Widmark et al. (2011). Não obstante, é necessária a coexistência de ambas as populações numa mesma área, e recombinantes ocorrerão se existir compatibilidade genética que permita a produção de oósporos viáveis (GISI et al., 2011). O surgimento de isolados A1 no PR e em SC, além de isolados do GC A2 já existentes, poderia gerar recombinantes; no entanto, ciclos de reprodução assexual dos isolados A1 recém encontrados, não seriam suficientes para quebrar o desequilíbrio de ligação (OLIVEIRA, 2010).

Por outro lado, a ocorrência de isolados autoférteis eleva o risco de reprodução sexuada, que, conseqüentemente, afeta a diversidade genotípica do patógeno (HAN et al., 2013). Isolados autoférteis já foram reportados em outras partes do mundo e alguns autores os caracterizaram como sendo SF-A2 ou SF-A1 com base na formação de maior número de oósporos, quando pareados com o padrão A1 ou A2 (TANTIUS et al., 1986; ORONA et al., 2013; EL-GANAINY et al., 2013; HAN et al., 2013).

De acordo com Orona et al. (2013), os oósporos de *P. infestans* são mais resistentes a condições ambientais adversas e permanecem viáveis no solo durante vários anos, dificultando-se o seu controle. Assim, a formação de oósporos do isolado autofértil CON-2, (Contenda-PR), observada em folha de batata inoculada *in vitro* (Figura 3), permite inferir que é possível a ocorrência natural de oósporos nas lavouras onde foram feitas as coletas dos isolados autoférteis. Isto é possível, uma vez que os oósporos são formados em folhas de batata naturalmente infectadas e permanecem viáveis no solo servindo como fonte de inoculo para os próximos ciclos produtivos (FLIER et al., 2001). Entretanto, estudos posteriores devem ser conduzidos com isolados monozoosporângicos a fim de se confirmar sua autofertilidade. Além disso, a contagem de número de oósporos provenientes do pareamento desses isolados com os padrões A1 e A2, seria importante para confirmar a formação de esporos sexuais nas folhas infectadas de batata das regiões onde foram encontrados os isolados autoférteis.

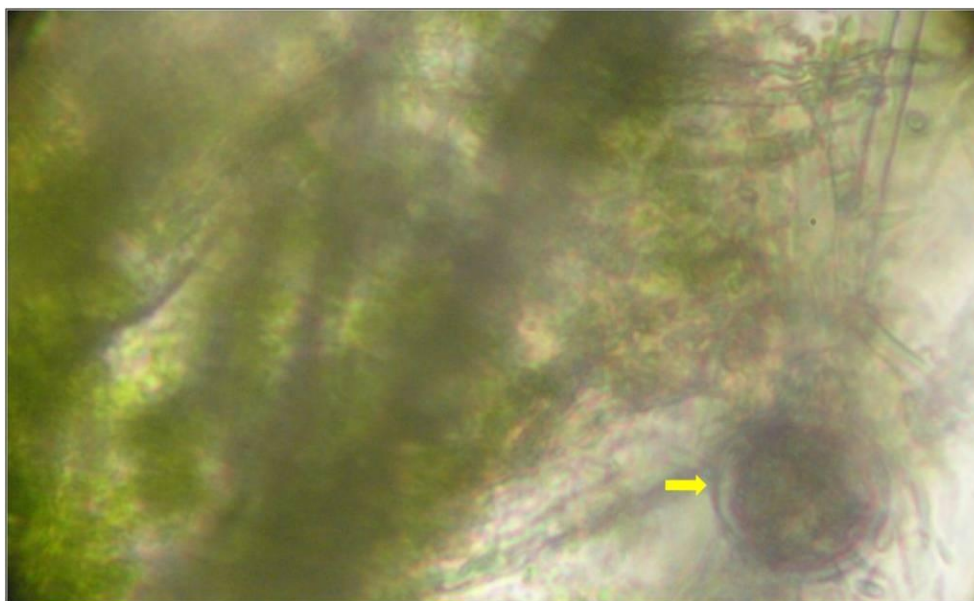


Figura 3 – Formação *in vitro* de oósporo do isolado autofértil CON-2 (Contenda-PR) *Phytophthora infestans* em folha destacada de batata 10 dias após a inoculação. Pelotas/RS, 2014.

2.3.2 Análise molecular

No estudo da análise genética de *P. infestans*, os nove marcadores microssatélites utilizados foram polimórficos para os 63 isolados, detectando-se 43 alelos, sendo que os *loci* Pi56, Pi63 e Pi33 foram aqueles que apresentaram o

menor número de alelos (3), e os *loci* G11, Pi04, Pi02 e D13 com sete, seis, seis, seis alelos, respectivamente, o maior número. Maior diversidade gênica entre os isolados foi encontrada com os *loci* Pi02 e G11 com valores de 0,64 e 0,63 de diversidade, respectivamente, sendo ambos os *loci* mais informativos em estudos de genética de populações de *P. infestans* (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de alelos e diversidade gênica obtidos com nove marcadores microsatélite. Pelotas/RS, 2014.

Primer	Sequência repetitiva ¹	Número de alelos	Tamanho (bp) ²	Diversidade gênica
Pi02	(GT) ₁₁	6	142-168	0,64
Pi89	(AT) ₉	5	177-211	0,40
G11	(TC) ₄₉	7	138-212	0,63
Pi04	(GT) ₆	6	160-172	0,58
Pi70	(AAG) ₈	4	189-195	0,52
Pi56	(AT) ₁₀	3	252-255	0,48
Pi63	(GAG) ₈	3	272-281	0,51
Pi33	(CAG) ₅	3	203-209	0,50
D13	(CT) ₂₇	6	106-166	0,41

¹Sequência repetitiva do microsatélite; ²Faixa de tamanho de alelos em pares de base(bp).

O índice de associação I_a^h e r_d^h para o teste de recombinação entre pares de loci, possibilitaram a observação de que as quatro populações de *P. infestans* provenientes do RS, PR, SC da coleta 2010-2012 e do RS coleta 2004-2005, foram significativas com valores de 0,40, 2,83, 2,21 e 1,94 (Tabela 5); ou seja, estas populações estão em desequilíbrio de ligação, porém, não há indícios de recombinação sexuada. No entanto, as populações provenientes do RS e coletadas entre 2010-2012, são as que apresentaram a menor taxa de índice de associação ($I_a^h = 0,40$), valor próximo ao equilíbrio de ligação ($I_a^h = 0,00$) que é o que define a existência de recombinação sexual. Assim, baixas frequências das populações recombinantes podem estar contribuindo para a não detecção do equilíbrio de ligação, principalmente nas populações de RS onde existem os dois grupos de compatibilidade.

Tabela 5 – Avaliação do índice de desequilíbrio de ligação de populações de *Phytophthora infestans* coletadas no Sul de Brasil, através do índice de associação. Pelotas/RS, 2014.

População	N ^a	I _a ^h	r _d ^h
RS 2010-2012	20	0,40**	0,06**
PR 2010-2012	22	2,83**	0,43**
SC 2010-2012	11	2,21**	0,30**
RS 2004-2005	10	1,94**	0,52**
Total	63	1,92**	0,27**

a= numero de isolados; I_a^h = índice de associação, **altamente significativo.

Com base nos resultados do AMOVA (Tabela 6), a percentagem de variação genética entre as quatro populações de *P. infestans* (três populações da coleta 2010-2012 e uma população da coleta 2004-2005) foi 29%, o que indica que existem diferentes frequências alélicas entre as populações. E, a variação dentro das populações foi 71%, evidenciando maior variabilidade entre os isolados de cada população.

Tabela 6 – Análise de variância molecular (AMOVA) de amostras de *Phytophthora infestans* coletados no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Pelotas/RS, 2014.

Fonte de variação	GL	SQ	Componente de variação	% Variação
Dentro populações	59	6.606,755	111,979	0,710
Entre populações	3	2.415,976	45,755	0,290

As populações de *P. infestans* que apresentam valores de pares F_{st} próximos a zero foram aquelas que resultaram em pequena diferenciação genética. De acordo com a tabela 7, as populações provenientes do estado do Paraná apresentam moderada diferenciação genética comparadas às populações do Rio Grande do Sul das coletas de 2010-2012 ($F_{st} = 0,139$) e de 2004-2005 ($F_{st} = 0,118$); e, as populações geneticamente menos distantes, foram aquelas provenientes da relação entre a coletas de isolados em 2004-2005 e 2010-2012, no Rio Grande do Sul.

Tabela 7 – Valores de diferenciação genética entre populações de *Phytophthora infestans* provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina e do Rio Grande do Sul da coleta 2010-2012 e isolados de RS da coleta 2004-2005, avaliados através da estatística F_{st} . Pelotas/RS, 2014.

Estado	Rio Grande do Sul*	Paraná*	Santa Catarina*	RS-2004-2005
Rio Grande do Sul*		0,139	0,044	0,019
Paraná*	0,139		0,035	0,118
Santa Catarina*	0,044	0,035		0,033
RS-2004-2005	0,019	0,118	0,033	

* Coleta 2010-2012

A análise pelas coordenadas principais (PCoA), baseada na distancia genética de Bruvo's, permitiu observar quatro agrupamentos bem estruturados de um total de 63 isolados de *P. infestans*, verificando-se diferenciação genética entre esses (Anexo 2, Figura 4).

O primeiro agrupamento está composto por isolados dos três estados da coleta 2010-2012 e todos os isolados da coleta 2004-2005, cuja proporção do número de isolados foi: RS (A1 = 3, A2 = 6, A1A2 = 4), SC (A2 = 3), PR (A2 = 5) e isolados RS 2005 (A2=6, A1=4); o segundo grupo foi composto por um isolado do GC A1 proveniente do PR, nove isolados do GC A2 e quatro isolados cujo GC não foi determinado, pertencentes aos três estados. Já o terceiro grupo, foi composto por 12 isolados autoférteis do PR e um isolado autofértil do estado de SC, e o quarto agrupamento correspondeu a três isolados autoférteis do estado de Santa Catarina. Além dos grupos formados, observa-se que um isolado A2 do RS (14) encontra-se isolado dos agrupamentos formados.

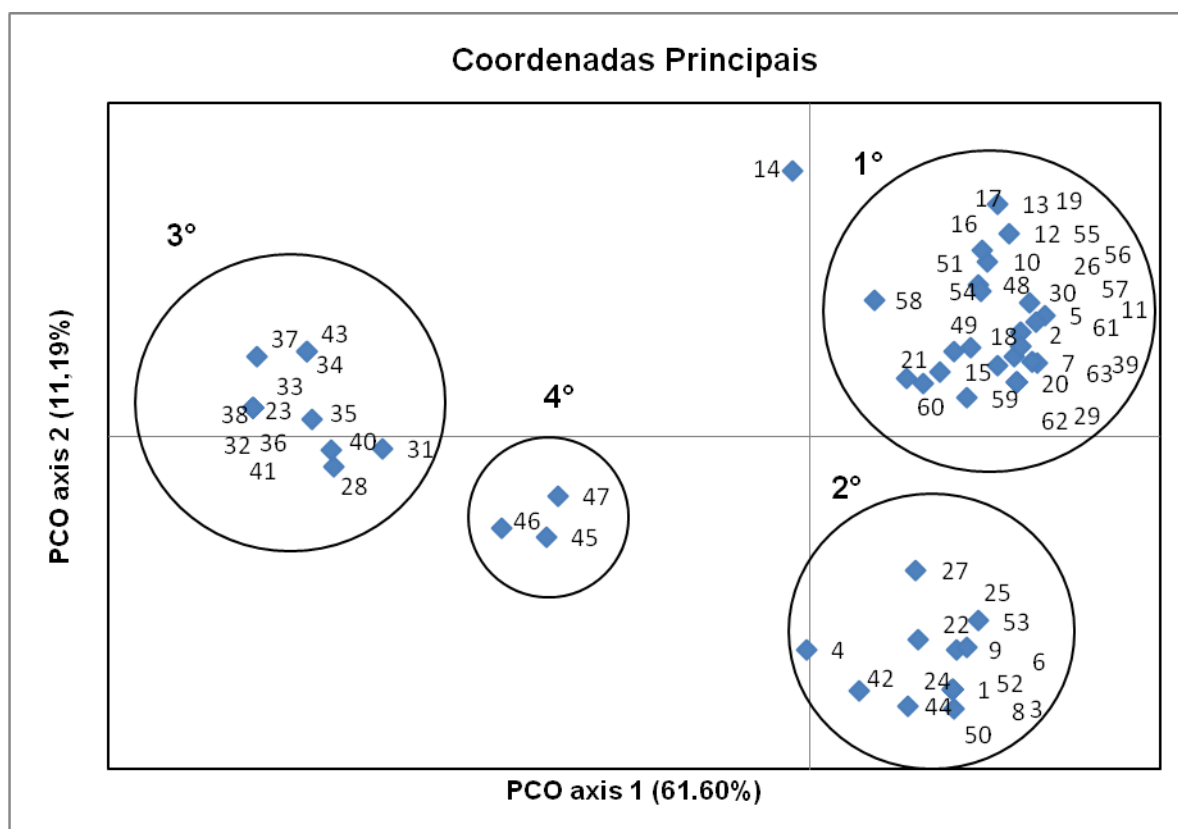


Figura 4 – Análise de coordenadas principais (PCoA) de 63 isolados de *Phytophthora infestans* provenientes da região Sul do Brasil e correspondentes aos períodos de coleta 2010-2012 (grupos 1,2,3,4) e 2004-2005-RS (grupo 1) com base na diversidade de nove marcadores (SSR) e de 43 alelos. Pelotas/RS, 2014.

A análise de microssatélites (SSR) revelou diversidade de populações de *P. infestans*, e que os nove marcadores utilizados foram polimórficos para o total de amostras avaliadas, detectando-se 43 alelos diferentes de um total de 63 isolados, o que confirma esses marcadores como adequados para genotipagem de *P. infestans* (COOKE; LEES, 2004).

De acordo com o índice de associação, não há indícios de ocorrência de recombinação dentro das populações de *P. infestans* coletadas no período 2010-2012. No entanto, o menor valor do índice de associação ($I_a = 0,40$), mais próximo ao equilíbrio de ligação encontrada na coleta 2010-2012, no RS, não descarta que eventos de recombinação possam estar ocorrendo neste estado, já que em estudo anterior realizado por Oliveira (2010), foram encontradas evidências de reprodução sexual em amostras provenientes desse estado. Além disso, outros fatores podem estar interferindo na falta de detecção da quebra de desequilíbrio de ligação no presente estudo, como por exemplo, a baixa frequência de recombinação no RS; a

ocorrência de fatores evolutivos como migração de populações novas e mais agressivas, e ou a baixa frequência de populações recombinantes.

A análise molecular indica que 29% de variação ocorreu entre populações de cada estado. Esse fato está de acordo com os valores de diferenciação genética par-par F_{st} , encontrados no presente estudo, onde a população do PR é mais distante das populações do RS, e as populações do RS de ambas as coletas 2004-2005 e 2010-2012, são as mais próximas. Diferenças entre populações foram também relatados no Equador com 18% de variação entre populações e valor de 0,18 de F_{st} , indicando uma clara relação entre genótipos e origem geográfica (DELGADO et al., 2013). Uma baixa diferenciação genética entre isolados dos diferentes países nórdicos também foi evidenciada pelo baixo valor de F_{st} (0,01 – 0,05) (SJÖHOLM et al., 2013).

A maior variação genética encontradas dentro das populações (71%) indica a existência de várias frequências alélicas dentro de cada uma. Em trabalhos realizados na europa oriental (Dinamarca, Finlândia, Noruega e Suécia), foi observado também que a maior variação alélica ocorreu dentro de cada população (BRURBERG et al., 2011).

Os agrupamentos formados através das coordenadas principais confirmam o fato de existirem diferenças genéticas entre e dentro das populações dos três estados, já que dois dos quatro agrupamentos (1 e 2), contém amostras pertencentes aos três estados, e os outros dois grupos estão associados com sua origem geográfica. De acordo com Brurberg et al. (2011), a falta de associação entre populações de *P. infestans* e origem geográfica sugere que a expansão da população é a partir de uma única população diversa, ao contrário dos resultados encontrados no presente estudo, onde populações autoférteis do PR e SC agruparam-se em grupos diferentes aos isolados A2 dos mesmos estados.

No Brasil, as populações de *P. infestans* vêm experimentando mudanças genéticas no decorrer dos anos (OLIVEIRA, 2010). Este fato é observado na ocorrência de isolados autoférteis com frequência alélica distinta aos dos outros isolados das diversas populações (Figura 5), e, também pelas diferenças de agrupamento das populações da coleta 2004-2005 do RS, que em sua totalidade, agruparam-se em um único grupo (primeiro agrupamento). Porém, os isolados coletados no mesmo estado, durante os anos 2010-2012, agruparam-se em dois diferentes grupos (1° e 2°). Estes agrupamentos permitem inferir a ocorrência de

diferenciação genética de *P. infestans* ao longo dos anos, já que componentes de ambos os agrupamentos são geneticamente distintos. De acordo com vários estudos, mudanças ou aparição de novos genótipos do patógeno ao longo dos anos, ocorre pela migração de novas populações, reprodução sexual ou mutação exercida pela pressão de seleção de fungicidas (ACUÑA et al., 2011; WIDMARK et al., 2011; COOKE et al., 2012; DANIES et al., 2013).

Com base nestes resultados, infere-se que a variabilidade genética das populações de *P. infestans*, no Sul do Brasil, ocorre majoritariamente pelo fluxo gênico, conforme os dados de desequilíbrio de ligação, diferenciação genética par-par e os diversos agrupamentos existentes. Para detectar com maior precisão a ocorrência de recombinação, principalmente nas populações de *P. infestans* do Rio Grande do Sul, uma análise molecular através de marcadores (SSR), poderia ser mais elucidativa pela utilização de um maior número de sub-amostras do patógeno dos locais onde foram encontradas as populações A1 e A2, uma vez que os recombinantes poderiam estar presentes em baixa frequência no momento da coleta realizada nesse estudo, dificultando assim a sua detecção.

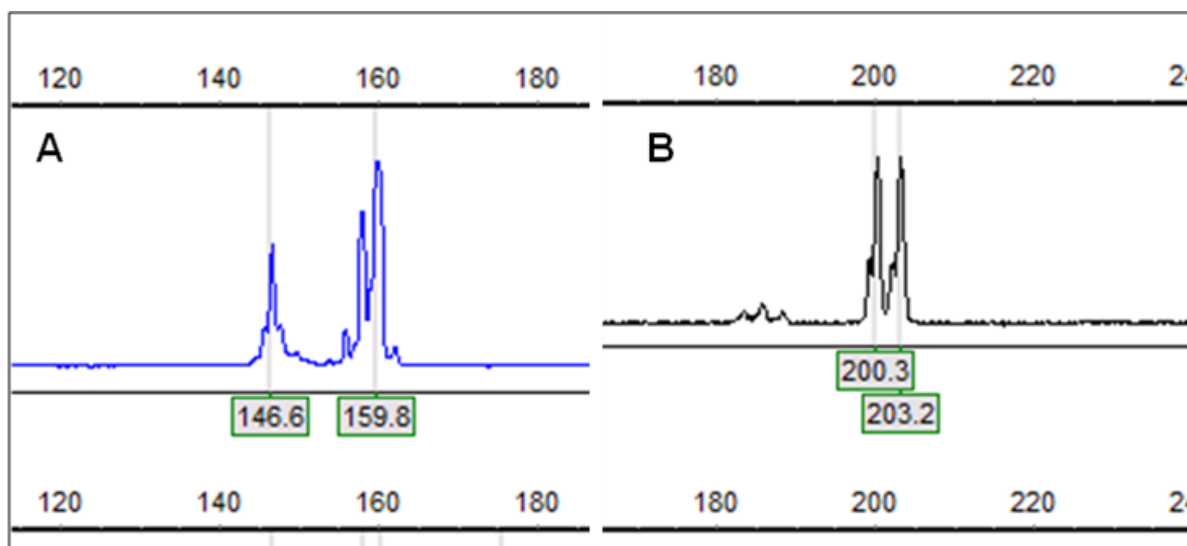


Figura 5 – Alelos de isolados autoférteis de *Phytophthora infestans*, (A) alelos do isolado MF-07 (Santa Catarina), gerado pelo *primer* Pi02, alelos do isolado PGR-3 (Paraná), gerado pelo *primer* Pi33 (B). Pelotas/RS, 2014.

2.4 Conclusões

- Há predominância da população de *P. infestans* do grupo de compatibilidade A2 em lavouras de batata do Sul do Brasil, e ocorrem isolados autoférteis do patógeno em diferentes áreas de produção dos estados de Santa Catarina e do Paraná;

- Existe diversidade genética dentro e entre as populações de *P. infestans* coletadas no Sul de Brasil, mas não é possível afirmar a existência de recombinação sexual do patógeno no RS;

3 CAPÍTULO II – Complexidade genética e sensibilidade de populações de *Phytophthora infestans* provenientes de batata e tomate do Sul do Brasil aos fungicidas metalaxyl e clorothalonil

3.1 Introdução

Perdas totais na produção de batata e do tomate têm sido associadas ao oomiceto *P. infestans*, patógeno considerado como a principal ameaça para ambas as culturas nas mais variadas regiões de cultivo do mundo (CHOWDAPPA et al., 2013; FRY et al., 2013; DU et al., 2013).

O sequenciamento recente de amostras de *P. infestans*, obtidas de folhas de batata infectadas e herborizados, relacionadas às epidemias de 1840, evidenciaram que essas populações pertenciam a uma linhagem denominada HERB-1, a qual persistiu por aproximadamente 50 anos. Essas populações diferem da linhagem US-1, que, por muito tempo foi tida como a responsável por grandes epidemias em campos de produção de batata na Irlanda (YOSHIDA et al., 2013; BIRCH; COOKE, 2013). De acordo com estudos recentes, a linhagem US-1 desalojou a linhagem HERB-1 no início do século XX, sendo dominante, ao nível mundial, até o final da década de 70 (YOSHIDA et al., 2013). Ao longo do tempo, a migração de populações de *P. infestans* continuou ocorrendo; um exemplo claro foi à ocorrência do GC A2 em diversas partes do mundo incluindo o Brasil (HOLH; ISELIN, 1984; BROMMONSCHENKEL; MATSUOKA, 1986; COOKE et al., 2012).

Epidemias de requeima como aquelas que ocorreram em lavouras de batata e tomate no início dos anos 90, nos Estados Unidos e Canadá, resultaram em perda total na produção (FRY; GOODWIN, 1997). Nos últimos anos, o surgimento da linhagem de *P. infestans* 13_A2 no noroeste da europa, desalojou outras linhagens do oomiceto, ocasionando doença até em cultivares de batata que eram

considerados resistentes (COOKE, et al., 2012). Em função dessas migrações, o surgimento de linhagens de *P. infestans* mais agressivas tem sido reportado continuamente. Dessa forma, a coexistência de populações de ambos os grupos de compatibilidade (A1 e A2), na mesma área, incrementa a possibilidade de surgimento de novos genótipos; além de representar maior risco de ocorrência de isolados resistentes a fungicidas (WIDMARK et al., 2011; ROJAS et al., 2014).

Os genes R de resistência qualitativa a *P. infestans* foram descritos em *Solanum demissum* há mais de um século e têm sido utilizados para transferir resistência a *S. tuberosum*, criando-se uma alta expectativa para o controle de *P. infestans*. No entanto, esta resistência infelizmente não é durável por ser raça-específica (FRY, 2008; AKINO; TAKEMOTO; HOSAKA, 2014). Onze genes de resistência foram identificados em espécies silvestres de *S. demissum*, e, a partir desses hospedeiros, foi desenvolvida uma série diferenciadora de genes R (R1-R11), utilizada para a classificação das raças de *P. infestans* (MALCOLMSON; BLACK, 1966; KIM et al., 2012). O gene R codifica receptores que reconhecem a secreção de efetores como as proteínas (*Avr*) produzidas por *P. infestans*. Estas proteínas induzem resistência no hospedeiro que contem o gene R; e o inverso ocorre no hospedeiro que não possui o gene de resistência (AKINO; TAKEMOTO; HOSAKA, 2014). No entanto, estes genes de resistência podem ser vencidos por diferentes raças do patógeno (FRY, 2008).

O principal método de controle da requeima em batata se dá pelo uso de fungicidas, sendo na maioria dos casos, uma medida indispensável durante o período de produção. Dois grupos de fungicidas são os mais utilizados, os sistêmicos que incluem mefenoxam/metalaxyl, e, protetores como clorothalonil (SUJKOWSKI et al., 1995; COOKE et al., 2011; NOWICKI et al., 2012). Todavia, nos últimos anos, a proporção de isolados de *P. infestans* resistentes a metalaxyl tem sido incrementada, tornando-se menos eficaz o uso deste princípio ativo no manejo da doença (LI et al., 2009; GISI et al., 2011).

Segundo Ma e Michailides (2005), a resistência do patógeno aos fungicidas ocorre principalmente pela alteração do sítio bioquímico alvo do fungicida, exercida comumente pelo uso de fungicidas sítio-específicos como o metalaxyl, o qual interfere na síntese de RNA ribossômico do patógeno. Já a ocorrência de insensibilidade a fungicidas protetores multi-sítios como o clorothalonil, ainda não tem sido reportada em *P. infestans*, muito provavelmente por interagirem

inespecificamente em várias etapas bioquímicas do metabolismo do organismo fitoparasita (KATO et al., 1997; REIS et al., 2005; GISI; SIEROTZKI, 2008; OLIVEIRA, 2010). Dessa forma, a avaliação da sensibilidade de isolados desse oomiceto a fungicidas protetores como clorothalonil, constitui-se como informação importante no permanente monitoramento do patógeno.

Em estudos de caracterização de populações de *P. infestans*, características fenotípicas como virulência do patógeno baseadas em serie diferenciadora com genes maiores e sensibilidade a fungicidas, são frequentemente investigados em função da grande diversidade de raças encontradas (MALCOLMSON; BLACK, 1965; SUJKOWSKI et al., 1995; REIS et al., 2005; GUO et al., 2008; DELGADO et al., 2013; DANIES et al., 2013). Considerando-se que a implementação de estratégias de controle da requeima está diretamente associada ao conhecimento dessas características (GISI et al., 2011) e à necessidade de estudos sobre o comportamento das populações de *P. infestans* no Sul do País, teve-se por objetivo nesse trabalho: 1) avaliar a diversidade e complexidade de isolados de *P. infestans* provenientes de batata do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina quanto a virulência, em serie diferenciadora de clones de batata com genes R de resistência; e, 2) estudar a sensibilidade *in vitro* desses isolados a fungicidas de ação sistêmica e protetora.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Avaliação da virulência de isolados de *Phytophthora infestans*

Cento e quarenta e cinco isolados de *P. infestans*, coletados em lavouras do RS, SC e PR, foram avaliados quanto a sua virulência *in vitro* em discos foliares de uma série diferenciadora de 11 clones de batata contendo genes R (R1-R11) de *S. demissum* (MALCOLMSON; BLACK, 1966). Como testemunha, utilizou-se a cultivar Craigs Royal (R0), sem genes de resistência vertical.

As plantas da série diferenciadora foram obtidas a partir do cultivo de tubérculos em vasos com substrato, mantidos em casa de vegetação. Decorridos 40 dias do plantio, as folhas de cada genótipo foram colhidas durante as primeiras horas do dia para uso imediato na instalação do experimento. Das folhas coletadas, exceto o folíolo apical, foram obtidos discos foliares através do uso de um furador de

rolhas de 15mm de diâmetro. A seguir, os discos foliares foram dispostos sobre papel filtro umedecido com água esterilizada, pela face abaxial, no interior de uma placa de Petri.

Para obtenção do inóculo, os isolados (Tabela 1) foram crescidos em meio centeio sacarose ágar-B (FRY LAB, 2005) durante 10 a 12 dias. Posteriormente, preparou-se uma suspensão aquosa de cada isolado de *P. infestans* contendo 10^5 esporângios/mL. Subsequentemente, procedeu-se à inoculação de cada isolado em discos foliares de cada um dos genótipos da série diferenciadora, utilizando-se uma alíquota de 20µL da suspensão/disco conforme metodologia de Sozzi, Schwinn e Gisi (1992). O ensaio seguiu o delineamento completamente casualizado com três repetições de uma placa de Petri contendo cinco discos foliares/tratamento (isolado). A seguir, o material foi mantido em BOD a $17 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16h luz durante seis dias. Quando necessário, adicionou-se água esterilizada à placa para evitar o ressecamento do papel.

A virulência dos isolados de *P. infestans* foi avaliada, sob microscópio estereoscópico com base na escala de notas de severidade de doença (SD), conforme metodologia de Sozzi, Schwinn e Gisi (1992), a qual variou de 0 a 5, onde 0 = sem sintomas; 1 = necrose foliar; 2, 3, 4 e 5 que corresponderam a 5%, 5 a 20%, 20 a 50%, e > 50% da superfície do disco de folha coberto pela esporulação do oomiceto. A partir desses dados, foi determinada a reação de compatibilidade e incompatibilidade de virulência entre cada isolado de *P. infestans* e o conjunto de clones com um único gene R de resistência. Quando a esporulação foi claramente visível no disco de folha (a partir da nota 2), a reação da doença foi considerada compatível e quando não foi possível de ser nitidamente observada (notas inferiores a 2), foi classificada como incompatível conforme metodologia descrita por Flier e Turkensteen (1999).

A diversidade de raças dos isolados estudados foi estimada utilizando-se o índice de Gleason corrigido com a finalidade de minimizar o erro: $H_{gr} = (N_p - 1 / N_i - 1)$, onde N_p é o número de raças diferentes e N_i é o número de isolados avaliados (GROTH; ROELFS, 1987; REIS, 2001).

3.2.2 Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Phytophthora infestans* a metalaxyl

Cento e trinta e três isolados de *P. infestans* provenientes de plantas de batata, foram avaliados *in vitro* quanto à sensibilidade ao fungicida metalaxyl (Apron 350®, Syngenta Co., Greens-boro 204, NC, USA). O teste foi realizado em meio centeio sacarose ágar-B (FRY LAB, 2005) nas concentrações de 0, 5 e 100µg de princípio ativo/mL, a fim de permitir a discriminação do nível de sensibilidade do patógeno segundo o protocolo de Matuszak et al. (1994). Para tanto, discos de meio centeio da região mais ativa do crescimento do patógeno, previamente crescidos durante 10 a 12 dias e com 5 mm de diâmetro, foram transferidas para meio de centeio preparado com as diferentes concentrações do fungicida. Para cada tratamento avaliado com cada isolado de *P. infestans*, foram utilizadas três placas de Petri contendo o meio nas respectivas concentrações do princípio ativo metalaxyl. A seguir, as placas foram mantidas em BOD a $17 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, durante nove a 12 dias, dependendo da velocidade de crescimento de cada isolado.

A avaliação do ensaio se deu pela medição do crescimento micelial de cada isolado, mensurando-se o diâmetro das colônias (mm) de cada placa, em duas direções perpendiculares. A partir da média dos diâmetros das colônias de cada isolado, foi calculado a porcentagem de crescimento micelial entre a dose zero e as demais concentrações. A seguir, os dados de porcentagem de crescimento micelial foram utilizados para determinação da sensibilidade dos isolados ao fungicida. Para tanto, isolados com valores percentuais de crescimento micelial $\leq 40\%$, nas doses 5 e 100µg/mL em relação à testemunha (sem fungicida), foram consideradas sensíveis (S); moderadamente resistentes (MR), quando o crescimento micelial foi $\geq 40\%$ em relação à testemunha na dose 5µg/mL, e $< 40\%$ na dose 100µg/mL; e, como resistentes (R), quando o crescimento micelial foi $\geq 40\%$ a ambas as doses (5 e 100µg/mL) em relação à testemunha (MATUSZAK et al., 1994; REIS, et al., 2005).

3.2.3 Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Phytophthora infestans* a clorothalonil

Avaliou-se o efeito do fungicida protetor Bravonil 750 PM® com princípio ativo clorothalonil, nas concentrações 0, 1, 5, 10µg/mL, sobre o crescimento micelial *in vitro* de 131 isolados de *P. infestans* provenientes das lavouras de batata e tomate

do Sul do Brasil, cujas coletas foram realizadas no período de 2004-2005 e 2010-2012.

Discos de meio centeio sacarose ágar-B (FRY LAB, 2005) de 5mm de diâmetro, contendo micélio de *P. infestans* (10 a 12 dias de idade), foram transferidos para o centro das placas de Petri com meio de centeio nas diferentes concentrações do fungicida acima referidas, utilizando-se para cada dose, três repetições (REIS et al., 2005). A seguir, o material foi mantido em BOD a $17 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, durante nove a 12 dias, dependendo da velocidade de crescimento micelial de cada isolado.

A avaliação da sensibilidade dos isolados ao fungicida foi realizada através da medição do diâmetro da colônia (mm) em duas direções perpendiculares. Para cada concentração de fungicida testada, a inibição de crescimento micelial foi calculado através da formula:

$$I_i = (C_{ck} - C_i) / C_{ck} \times 100$$

Onde:

C_{ck} = média de diâmetro da colônia da testemunha,

C_i = média de diâmetro da colônia do tratamento com o fungicida.

A seguir, as concentrações de fungicidas, para cada isolado, foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$) e, a partir desses dados, calculou-se uma regressão linear entre inibição de crescimento micelial e $\log_{10}$ das concentrações, através do software R (R version 3.0.2, 2013). Finalmente o cálculo da concentração efetiva (CE_{50}) foi obtido pela equação de regressão correspondente para cada isolado, cujos valores foram representados em $\mu\text{g/mL}$. A determinação da sensibilidade dos isolados a clorothalonil foi feita através da percentagem de crescimento micelial com base em trabalhos realizados por Sujkowski et al. (1995), Reis et al. (2005) e Oliveira (2010).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Avaliação da virulência dos isolados de *Phytophthora infestans*

Entre os isolados de *P. infestans* estudados ($n = 145$), foram encontrados 86 diferentes raças, das quais a mais complexa foi 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11(1,37%) contendo 11 genes de virulência e ocorrendo no RS. No entanto, as raças mais

predominantes e frequentes, foram 0,1,3,4,6,7,8,10,11 (6,20%), e 0,1,3,4,7,8,10,11 (6,20%), presentes nos três estados e com oito e sete genes de virulência, respectivamente. Além disso, considerando-se todas as raças detectadas, 77,90% delas foram virulentas a mais de quatro genótipos diferenciadores (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de raças e patótipos de *Phytophthora infestans* provenientes da Região Sul do Brasil determinadas em série diferenciadora de clones de batata contendo genes-R de resistência. Pelotas/RS, 2014.

Raças	Patótipos	Nº clones infectados*	Número Isolados	Isolados	Locais de coleta			GC**
					RS	SC	PR	
1	0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	11	2	IBI-4b, IBI-3b	2	-	-	A1-ND
2	0,1,2,3,4,6,7,8,9,10,11	10	6	Pel-03, Brcl-e, Pel-4, Cris-2b, Cris-10, Cri-1b	6	-	-	A1A2-ND-ND-A1-ND-ND
3	0,1,2,3,4,5,6,7,8,10,11	10	1	BJ-05	1	-	-	A2
4	0,1,3,4,5,6,7,8,9,10,11	10	1	Pel-2b	1	-	-	A1A2
5	0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,11	10	1	Campo-2	1	-	-	A2
6	0,1,2,3,4,6,7,9,10,11	9	3	IBI-1b CRI-1a, CRI-08 ^a	3	-	-	A2-ND-ND
7	0,1,3,4,5,6,7,8,10,11	9	1	MF-03	-	1	-	A2
8	0,1,2,3,5,6,7,9,10,11	9	1	CRI-6	1	-	-	A2
9	0,1,2,3,4,5,6,7,9,11	9	1	IBI-06 a	1	-	-	ND
10	0,1,2,3,4,6,7,8,9,11	9	2	IBI-3a, IBI-4 a	2	-	-	ND- A1
11	0,1,2,3,4,6,7,8,9,10	9	1	Pel-12	1	-	-	ND
12	0,1,2,3,4,6,9,10,11	8	1	Cris-7 a	1	-	-	ND
13	0,1,2,3,6,7,9,10,11	8	1	1-CANG	1	-	-	A2
14	0,1,2,4,6,7,9,10,11	8	1	Cris-8b	1	-	-	ND
15	0,1,3,4,6,7,8,10,11	8	9	IBI-6b, SJA-4, SJA-15, SJA-7, SJA-18, SJA-17, SC-12, SC-18, AR-02	6	2	1	ND-ND-A1-ND-ND-A2-A2-ND-A2
16	0,1,3,4,5,7,8,10,11	8	3	IBI-2b, BJ-08, BJ-01	3	-	-	ND-ND-ND
17	0,1,3,4,5,6,7,9,10	8	1	SFP-08	1	-	-	A2A1
18	0,1,2,3,4,6,7,9,11	8	3	SL-01b, SL-01a, CRI-4 ^a	3	-	-	A2-ND-ND
19	0,1,2,3,4,6,7,8,9	8	1	SC-C9	-	1	-	ND
20	0,1,2,3,4,6,7,11	7	1	CRI-7b	1	-	-	A2
21	0,1,2,3,7,8,9,11	7	1	2 SvM	1	-	-	A2

Raças	Patótipos	N° clones infectados*	Número Isolados	Isolados	Locais de coleta			GC**
					RS	SC	PR	
22	0,1,3,4,6,7,10,11	7	2	IBI,01e, PR-PL3a	1	-	1	ND-A1
23	0,1,3,4,7,8,10,11	7	9	151, SJA-13, SJA-8, SFP-3, 3CANG, IBI-01f, MF-01, SC-SJ7, PRGU1	6	2	1	A2-A1-A1-ND-ND-ND-A2-A1-A2
24	0,2,3,6,7,9,10,11	7	1	CRI-5b	1	-	-	ND
25	0,1,3,4,6,7,8,11	7	1	IBI-6d	1	-	-	ND
26	0,2,3,4,6,7,9,11	7	1	SFP-01	1	-	-	ND
27	0,2,3,4,7,8,9,11	7	1	SJA-10	1	-	-	A1
28	0,2,3,4,6,7,8,9	7	1	IBI-05	1	-	-	ND
29	0,1,2,3,4,6,7,9	7	6	SL-04c, CRI-03, SL-4d, Emb-C, IBI-01c, 3NP	6	-	-	ND-A2-ND-ND-A2-ND
30	0,1,2,4,7,9,11	6	1	9 SvM	1	-	-	A2
31	0,1,3,7,8,10,11	6	3	BJ-02, BJ-08, SC-C11	2	1	-	A2-ND-A2
32	0,1,3,4,7,10,11	6	4	5NP, SC-C12, SC-C7, SJA-6	2	2	-	A2-A2-ND-ND
33	0,1,3,4,8,10,11	6	1	SC-11	-	1	-	A2
34	0,3,4,7,8,10,11	6	1	MF-04	-	1	-	A2
35	0,1,4,7,8,10,11	6	1	PGR-1			1	Autofértil
37	0,1,3,6,7,8,11	6	1	SJA-9	1	-	-	ND
38	0,1,3,4,7,8,11	6	6	SJA-16, SFP-6, IBI-2a, IBI-1d, 2CANG, PR-20	5	-	1	A2-ND-ND-ND-ND-A2
39	0,1,3,4,7,8,10	6	2	PR-14, PR-15	-	-	2	ND-A2
40	0,1,2,3,4,5,7	6	1	11MR	1	-	-	ND
41	0,1,3,7,10,11	5	1	CLAR-2	-	-	1	A2
42	0,1,2,4,9,11	5	1	SL-4 a	1	-	-	ND
43	0,1,3,7,8,11	5	1	BJ-07	1	-	-	A2
44	0,1,3,4,7,11	5	2	SC-15, PR-25	-	1	1	A2-A2

Raças	Patótipos	N° clones infectados*	Número Isolados	Isolados	Locais de coleta			GC**
					RS	SC	PR	
45	0,3,4,7,10,11	5	1	SJ-6b1	-	1	-	ND
46	0,2,3,7,9,11	5	1	CRI-4b	1	-	-	ND
47	0,3,6,7,9,10	5	1	Pel-08	1	-	-	A1
48	0,3,6,7,9,11	5	2	RG-01, 5SvM	2	-	-	A2-ND
49	0,3,4,7,8,11	5	1	4-2 NP	1	-	-	ND
50	0,1,4,7,8,10	5	1	SC-12-1	-	1	-	A2
51	0,1,2,3,6,7	5	1	SL-4b	1	-	-	A2
52	0,1,2,3,7,9	5	1	1NP	1	-	-	A1
53	0,1,3,4,7,9	5	1	Pel-2 a	1	-	-	A1A2
54	0,1,3,4,7,8	5	2	IBI-6e, SC-C3	1	1	-	ND-ND
55	0,2,4,6,9,11	5	1	SL-5b	1	-	-	A1A2
56	0,2,3,7,10	4	1	Pel-07	1	-	-	A1A2
57	0,1,3,7,10	4	1	PR-24	-	-	1	A2
58	0,2,3,7,11	4	1	SFP-7	1	-	-	ND
59	0,1,6,7,11	4	1	4 SvM	1	-	-	A2
60	0,2,7,9,11	4	1	8 SMH	1	-	-	A2
61	0,1,2,3,7	4	1	2 NP	1	-	-	A1
62	0,1,3,4,7	4	2	4-1, 69	2	-	-	ND-A1
63	0,1,6,7,9	4	1	Pel-09	1	-	-	ND
64	0,1,3,7,9	4	2	Pel-05, CRI-5 ^a	2	-	-	A2-A1
65	0,2,4,6,9	4	1	SL-5c	1	-	-	A1A2
66	0,2,3,4,9	4	1	SL-03	1	-	-	A2
67	0,3,4,7,8	4	1	SC-3	-	1	-	A1
68	0,1,7,10	3	1	MF-05	-	1	-	Autofértil
69	0,1,7,11	3	2	SC-16, PR-3b	-	1	1	ND-A2

Raças	Patótipos	N° clones infectados*	Número Isolados	Isolados	Locais de coleta			GC**
					RS	SC	PR	
70	0,1,4,11	3	2	CRIS, PGR-4	1	-	1	ND-Autofértil
71	0,3,7,11	3	1	3 SvM	1	-	-	A1A2
72	0,2,3,7	3	1	Pel-2f	1	-	-	A1A2
73	0,3,4,7	3	2	SJA-14, PR-26	1	-	1	A1-A2
74	0,3,7,11	3	1	CON-08	-	-	1	Autofértil
75	0,1,11	2	1	CRIS-02	1	-	-	A1
76	0,8,11	2	1	CON-02	-	-	1	Autofértil
77	0,7,11	2	2	3SJA, PRGU3	1	-	1	ND-ND
78	0,3,11	2	2	CON-1, MF-06	-	1	1	Autofértil
79	0,9,11	2	1	SL-02	1	-	-	ND
80	0,3,6	2	1	87	1	-	-	A1
81	0,3,7	2	1	SFP-2	1	-	-	ND
82	0,4,7	2	1	BJ-03	1	-	-	A2
83	0,1	1	1	PGR-2	-	-	1	Autofértil
84	0,4	1	2	SJ-6a1, SC-08	-	2	-	ND-A2
85	0,7	1	3	Pel-2e, BJ-04	2	-	-	A1A2-A2
86	0	0	2	SJA-12, PR-01 a	2	-	1	A1-Autofértil
Número total de Isolados/estado			145		105	21	19	145
Número total de patótipos								86

*Série diferenciadora de clones de batata contendo genes-R; **GC= Grupo de compatibilidade.

Esses resultados também evidenciam que a maioria dos isolados foi capaz de vencer a resistência, principalmente, do clone contendo o gene R7, seguido pelos genes R3, R1, R11 e R4. E, menor número de isolados virulentos, foi observado nos clones contendo os genes R5, R2 e R9 (Tabela 2). Apenas dois isolados (1,38%), coletados no RS e no PR, não suplantaram a resistência a nenhum desses genes.

Tabela 2 - Percentagem de isolados virulentos a cada um dos clones de batata da série diferenciadora (R1-R11), e número de genes R infectados com *Phytophthora infestans*. Pelotas/RS, 2014.

Genes R - cv. Diferenciadora	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
Nº isolados virulentos (n=145)	104	50	122	101	14	62	127	63	51	64	103
Percentagem (%)	71,72	34,48	84,14	69,66	9,66	42,76	87,59	43,45	35,17	44,14	71,03

Entre as raças de *P. infestans* identificadas, o maior número foi encontrado nas amostras coletadas no Rio Grande do Sul (n= 66), seguido pelo estado de Santa Catarina (n=17) e do Paraná (n=18) (Tabela 3). Pela análise da diversidade das populações de *P. infestans* estudadas, verificou-se que para o total de isolados do Sul do País, o índice de diversidade intra-específica de raças de Gleason (Hgr), foi de 0,59. Porém, analisando-se tal variável por estado, observa-se maior diversidade no estado de Paraná cujo IG foi 0,94, seguido por Santa Catarina (Hgr = 0,80) e Rio Grande do Sul (Hgr = 0,62) (Tabela 3).

Tabela 3 - Diversidade de isolados de *Phytophthora infestans* quanto ao número de raças e índice de Gleason (Hgr) por origem (região/estado) e grupo de compatibilidade. Pelotas/RS, 2014.

Origem	Número de isolados (Ni) ¹	Número de raças (Np) ²	Índice (Hgr) ³
Região Sul	146	86	0,59
Rio Grande do Sul	105	66	0,62
Santa Catarina	21	17	0,80
Paraná	19	18	0,94

Grupo de compatibilidade (GC)	Número de isolados (Ni) ¹	Número de raças (Np) ²	Índice (Hgr) ³
GC A1	19	17	0,89
GC A2	43	35	0,81
GC A1A2	11	11	1,00
Autoférteis	9	8	0,88

¹Ni= total de isolados; ²Np= número de patótipos, ³Índice de Gleason corrigido.

Apesar do maior número de raças de *P. infestans* ter sido encontrado no RS (Tabela 3), o índice Hgr mais elevado foi observado entre os isolados coletados no PR, o que indica aumento da diversidade de patótipos nesse estado quando comparada aquela obtida por Santana (2006), em lavouras de batata da região Sul, há menos de 10 anos atrás.

Ainda, levando-se em consideração o índice Hgr, os isolados do GC A1 apresentaram maior índice de diversidade; estes dados evidenciam que os isolados desse grupo de compatibilidade, em sua maioria, são do estado do Rio Grande do Sul, os quais resultaram em maior diversidade que aquela dos isolados do GC A2, cujos resultados foram similares aos reportados por Santana (2006). Entretanto, analisando-se a diversidade dos grupos A1A2 e autofértil, embora os valores de Hgr sejam altos, o número de amostras foi menor, o que poderia superestimar tais resultados.

A existência de um elevado e complexo número de raças encontradas no presente estudo, com uma relação de uma raça para 1,69 isolados é indicativo da alta diversidade deste patógeno. Embora Reis (2001) e Santana (2006) tenham observado grande diversidade de patótipos de *P. infestans* em isolados coletados em lavouras de batata e tomate das regiões sul e sudeste do Brasil, o número de raças observado aqui, foi, pelo menos, o dobro daqueles encontrados por ambos os autores. Quatro raças complexas encontradas neste estudo; dentre essas, '0,1,3,4,6,7,8,10,11' e '0,1,3,4,7,8,10,11', foram as mais frequentes nos três estados, as quais também foram reportados como sendo as mais frequentes em áreas de produção de batata da Suíça e da França (KNOPOVA; GISI, 2002).

A maior percentagem de isolados virulentos observada nos genótipos diferenciadores R7, R1, R3, R11 e, menor, nos clones R5, R9 e R2 (Tabela 2), coincidiu com aquela reação observada por Knopova e Gisi (2002), Guo et al. (2008) e Li et al. (2009). No entanto, Andrivon et al. (2011) relatam que a virulência de populações de *P. infestans*, provenientes do continente europeu, ocorre principalmente nos clones diferenciadores contendo os genes R2, R5 e R9, ao contrário dos resultados obtidos nesse estudo. Comparando-se esses dados com aqueles obtidos por Reis (2001), no Brasil, as respostas aos genes R5 e R2 foram semelhantes, porém não foi possível a comparação com R9 por não ter sido testado. Já em relação ao trabalho de Santana (2006), a frequência de patótipos contra R2, mesmo sendo uma das menores ocorrências observadas (Tabela 2), aumentou de

15% a 32,5%, e, no clone contendo o gene R9, passou de 0,00 a 33,8%; no entanto, em relação ao gene R5, diminuiu de 18% para 9,7%.

Considerando-se os genes de avirulência de *P. infestans*, a maioria dos isolados (57,24%) avaliados nesse estudo, possui entre seis e três genes de avirulência; dois deles (1,37%) nenhum gene *Avr*; 18 isolados (12,41%) com um ou dois genes *Avr*, 39 isolados (26,89%) com sete a 10 genes *Avr*; e, apenas dois (1,37%) com todos os genes complementares de avirulência (Tabela 4).

Analisando-se o número de isolados que produziram reação compatível entre genes R da planta e *Avr* do patógeno, houve expressão de todos os genes (Tabela 2), sendo a grande maioria dessas relações, de forma complexa (mais de um gene *Avr*/isolado). Em menor frequência, houve expressão dos genes *Avr1*, *Avr3*, *Avr4*, *Avr7* e *Avr11*. Assim, um maior número de plantas R1, R3, R4, R7 e R11 foi infectado pelos isolados estudados. Entre esses, os genes *Avr3* e *Avr4* foram também suplantados mais frequentemente pelos isolados de *P. infestans* avaliados em trabalhos conduzidos por Santana (2006) e Reis (2001), os quais também verificaram menor frequência de *Avr7*. E, inversamente aos resultados relacionados à virulência dos isolados sobre os genes R (Tabela 2), os clones de batata com os genes R2, R5 e R9, foram aqueles onde houve menor infecção do patógeno, e, portanto expressão dos genes de avirulência *Avr2*, *Avr5* e *Avr9* correspondendo a 65,51, 90,34 e 64,82% das relações (Tabela 4), conforme já observado por Santana (2006) e Forbes et al. (1997).

Tabela 4 – Número de isolados de *Phytophthora infestans* relacionados a número de gene *Avr* e relações entre número de isolados que produziram reação compatível entre genes R da planta e *Avr* do patógeno. Pelotas/RS, 2014.

Nº de genes <i>Avr</i>	Nº de isolados (n=145)	Nº de isolados/gene <i>Avr</i>
0	2	2/ <i>Avr0</i>
1	9	41/ <i>Avr1</i>
2	9	95/ <i>Avr2</i>
3	20	23/ <i>Avr3</i>
4	24	44/ <i>Avr4</i>
5	21	131/ <i>Avr5</i>
6	18	83/ <i>Avr6</i>
7	14	18/ <i>Avr7</i>
8	10	82/ <i>Avr8</i>
9	10	94/ <i>Avr9</i>
10	5	81/ <i>Avr10</i>
11	2	42/ <i>Avr11</i>

n= número de isolados.

As diferenças encontradas quanto à diversidade na composição genética das populações de *P. infestans* podem ser explicadas pelo fato dos genes efetores estarem localizados em regiões altamente dinâmicas e de rápida evolução do patógeno, o que pode permitir a sua rápida capacidade de adaptação no hospedeiro, principalmente naqueles que possuem resistência monogênica (HAAS et al., 2009; FRY, 2008). Consequentemente, o uso de genótipos de batata com resistência qualitativa (genes maiores) isoladamente, no Sul do Brasil, é de alto risco, considerando-se ainda que as condições meteorológicas sejam ótimas para a ocorrência de requeima nas áreas produtoras envolvendo os três estados dessa região. Dessa forma, a procura por fontes de resistência quantitativa e a piramidização de genes de resistência no manejo de *P. infestans*, tem sido um dos de principais objetivos nos diferentes programas de melhoramento de batata visando resistência a requeima.

3.3.2 Sensibilidade de isolados de *Phytophthora infestans* a fungicidas

3.3.2.1 Sensibilidade ao fungicida metalaxyl

Entre os 133 isolados avaliados quanto à sensibilidade a metalaxyl, verificou-se que a grande maioria (77,44%) comportou-se como moderadamente resistente (MR), 17,29% como resistentes (R), e, 5,26% como sensíveis (S) (Figura 1, Tabela 7). Em todos os três estados, foi observada a ocorrência de isolados resistentes e moderadamente resistentes; porém, os poucos isolados avaliados como sensíveis a metalaxyl, foram detectados somente em SC e no PR (Figura 1).

Analisando-se os resultados por estado (Figura 1), entre os isolados de *P. infestans* provenientes do Rio Grande do Sul, 10,52% desses comportaram-se como resistentes ao fungicida metalaxyl, e, a grande maioria (54,89%), como moderadamente resistentes. No entanto, no estado de Santa Catarina, 2,26% dos isolados foram R, 10,53% MR e 1,50% S, Já no Paraná, 4,51% dos isolados comportaram-se como R, 12,03% MR e 3,76% como suscetíveis ao referido fungicida.

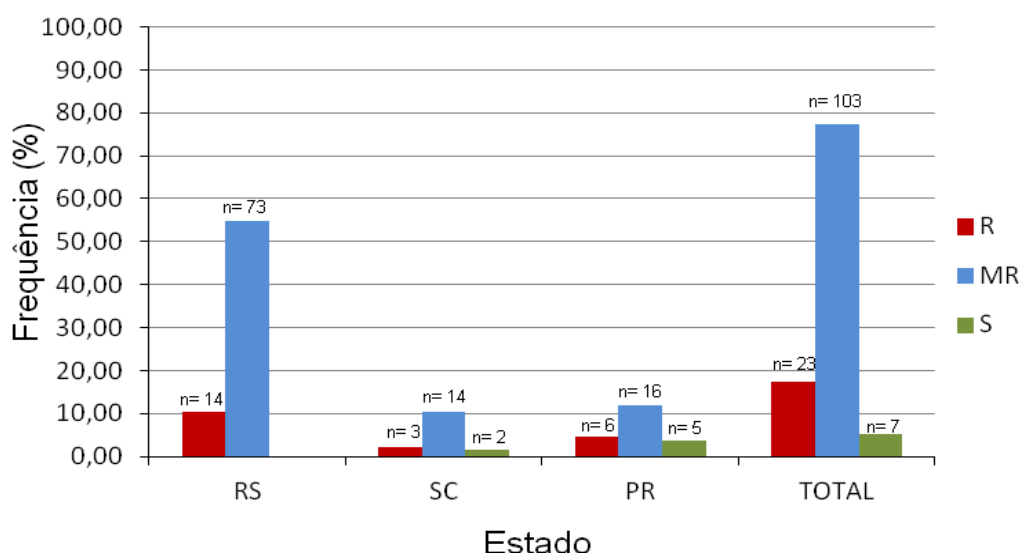


Figura 1- Frequência (%) e número (n) de isolados de *Phytophthora infestans*, provenientes do Sul do Brasil, (■) resistentes, (■) moderadamente resistentes e (■) sensíveis ao fungicida metalaxyl. Pelotas, RS, 2014.

Na análise da sensibilidade dos isolados de *P. infestans* a metalaxyl, por grupo de compatibilidade, observou-se que de um total de 77 isolados, 47 pertenciam ao GC A2, 14 isolados ao GC A1, 11 isolados autoférteis e cinco ao GC A1A2. Dentro do grupo A1, seis isolados foram moderadamente resistentes (MR), oito R, e nenhum sensível a metalaxyl; dentro do grupo A2, 41 isolados foram MR e seis R; no grupo A1A2 os cinco isolados comportaram-se como MR. Já nos isolados autoférteis, sete foram sensíveis e quatro MR a metalaxyl (Tabela 5).

Tabela 5 – Reação de Isolados de *Phytophthora infestans*, por grupo de compatibilidade, ao fungicida metalaxyl. Pelotas/RS, 2014.

Estado	Reação*	Grupo de compatibilidade				Total
		A1	A2	A1A2	Autofértil	
RS	S	0	0	0	0	0
	MR	6	24	5	0	35
	R	5	0	0	0	5
SC	S	0	0	0	2	2
	MR	0	8	0	1	9
	R	2	1	0	0	3
PR	S	0	0	0	5	5
	MR	0	9	0	3	12
	R	1	5	0	0	6
Total		14	47	5	11	77

*R- resistente; MR- moderadamente resistente; S- sensível.

De acordo com os resultados da tabela 5, pode-se observar que a grande maioria dos isolados avaliados comportou-se como MR ao fungicida metalaxyl, porém, analisando-se a sensibilidade dos isolados por região geográfica e por grupo de compatibilidade, embora exista diferença quanto ao número de amostras por estado, os resultados variaram, conforme já relatado. Os isolados de *P. infestans* insensíveis (R) e MR ocorrem no GC A2, independentemente do estado; e no GC A1, apenas no RS. No entanto, a ocorrência de isolados sensíveis foi observada apenas nas populações autoférteis provenientes do PR e SC. Embora Santana et al. (2013) tenha observado a presença de isolados MR em populações A1 de batata do RS, os autores verificaram que tanto os isolados A1 como A2 eram predominantemente sensíveis, e apenas um isolado (A2) foi caracterizado como insensível a metalaxyl; contudo, esse estudo foi realizado há oito anos e nesse transcurso isolados resistentes a este princípio ativo surgiram nas diversas localidades, tal fato é comprovado pelos resultados obtidos neste trabalho.

A insensibilidade não é específica de um determinado grupo de compatibilidade, conforme demonstrado pelos resultados do presente trabalho e aqueles obtidos por Schmitt e Kleinhenz (2012), os quais verificaram a ocorrência de isolados resistentes a metalaxyl nos grupos A1 e A2. Os isolados autoférteis detectados no presente estudo, mesmo que ainda sejam sensíveis ao referido princípio ativo, ao decorrer dos anos e com mau uso dos fungicidas, principalmente sítio-específicos, podem tornar-se insensíveis, conforme já observado por Runno-Paurson et al. (2010).

Mesmo não sendo encontrados isolados sensíveis de *P. infestans* a metalaxyl, no Rio Grande do Sul (Figura 1; Tabela 5), a detecção de sete isolados no PR e em SC, representou 5,26% (n= 133), valor significativamente inferior comparado ao último levantamento conduzido em lavouras de batata no Sul do Brasil, onde 61,6% dos isolados avaliados foram sensíveis ao fungicida (SANTANA et al., 2013). Em contraponto, observou-se maior número de isolados insensíveis (resistentes) em relação ao último estudo, passando de 2,1% (SANTANA et al., 2013) (n= 146) a 17,29% (n= 133) (Figura 1). No entanto, a comparação desses resultados com aqueles obtidos por Reis et al. (2005) em estudo realizado nas regiões sul e sudeste do País, a frequência de isolados insensíveis foi aproximadamente a metade.

Entre os isolados resistentes a metalaxyl (Figura 1) detectados no RS, cinco deles foram coletados em Cristal, sete em Ibiraiaras e dois em São José dos Ausentes; em Santa Catarina, um em São Joaquim e um em Mafra; e, no Paraná, três em Palmas, um em Araucária, Campo Largo, São Mateus do Sul e na Lapa. Geograficamente, a distribuição de isolados resistentes teve a maior concentração em dois municípios do Rio Grande do Sul (Cristal e Ibiraiaras) e foi mais dispersa, entre as diferentes localidades coletadas no Paraná (Figura 2, Capítulo 1). Nos municípios em menção, os fungicidas de ação sistêmica (cimoxanil e mefenoxam) e de contato (mancozeb e clorothalonil) são os mais frequentemente utilizados para pulverização das lavouras de batata, e, muitas vezes, utilizam-se subdosagens do produto, conforme relato dos produtores quando procedeu-se as coletas dos isolados. Além disso, a média de pulverizações com fungicidas, nos municípios citados no RS, é de sete a nove aplicações por safra, e no PR e SC, entre 10 a 13 aplicações (dados não apresentados). Assim, a condução de tais procedimentos no manejo fitossanitário da requeima pode estar contribuindo para o surgimento de isolados resistentes aos fungicidas.

O incremento do número de isolados resistentes e diminuição dos sensíveis permitem inferir que a sensibilidade das populações de *P. infestans* a metalaxyl vem sofrendo mudanças no Brasil, já que no último estudo, populações do patógeno coletadas entre 2004 e 2005, comportaram-se predominantemente como sensíveis; e, um menor número, como resistentes ao referido fungicida (SANTANA et al., 2013). O aumento crescente de populações do patógeno insensíveis também vem sendo observado em outras partes do globo (LI et al., 2009; CHMIELARZ et al., 2014), o que tem chamado a atenção de pesquisadores e técnicos em função da efetividade desse princípio ativo no manejo da requeima.

Uma explicação para o incremento da insensibilidade dos isolados ao princípio ativo metalaxyl está relacionada ao fato de que seu mecanismo de ação é sitio-específico. Dessa forma, quando o mesmo fungicida é utilizado continuamente, mesmo em misturas, existe pressão de seleção sobre o patógeno. Assim, o número de cepas resistentes na população, que inicialmente é baixo, aumenta consideravelmente e passa a ser dominante (LEEN et al., 1983; GISI; SIEROTZKI, 2008). Nesse contexto, o aparecimento de populações insensíveis torna-se um fator limitante na eficiência e vida útil dos fungicidas; e, como consequência, o manejo de doenças das culturas é alterada (MA; MICHAILIDES, 2005).

3.3.2.2 Sensibilidade ao fungicida clorothalonil

Entre os 131 isolados de *P. infestans* avaliados quanto à sensibilidade a clorothalonil, o intervalo da concentração efetiva de inibição (CE_{50}) encontrado foi de 0,01 a 4,67 μ g/mL (Tabela 7). O valor médio de CE_{50} dos isolados amostrados no período 2010/2012, foi 2,09 μ g/mL (Tabela 6), além disso 13,54% desses apresentaram CE_{50} abaixo de 1 μ g/mL e 86,46% entre 1 e 5 μ g/mL, (Figura 2). No entanto, os maiores valores foram obtidos com um isolado coletado em São José dos Ausentes-RS e outro em Guarapuava-PR, com 4,67 e 4,28 μ g/mL de CE_{50} , respectivamente (Tabela 7).

Tabela 6 - Período de coleta e sensibilidade de isolados de *Phytophthora infestans* (n= 131) de batata provenientes da região Sul do Brasil ao fungicida clorothalonil. Pelotas/RS, 2014.

Cultura	Estado	Ano ¹	Número Isolados	Média CE_{50} (μ g/mL) ²
Batata	Rio Grande do Sul	2010-2012	79	2,27
Batata	Santa Catarina	2010-2012	19	2,00
Batata	Paraná	2010-2012	27	2,01
TOTAL			125	2,09³
Batata	Rio Grande do Sul	2004-2005	6	1,98
TOTAL			6	1,98⁴

¹Ano de coleta de isolados; ²média de concentração efetiva CE_{50} de fungicida; ³média CE_{50} da coleta 2010-2012; ⁴média de CE_{50} da coleta de 2004-2005; n= número de isolados.

Os valores médios de CE_{50} para o fungicida clorothalonil, por estado, podem ser observados na tabela 6, onde 79 isolados de batata coletados no RS, apresentam uma média de 2,27 μ g/mL, 19 de SC, 2,00 μ g/mL, e, 27 do PR, 2,01 μ g/mL. Avaliando-se seis isolados coletados no RS e provenientes de batata, obtidos em 2004-2005, verificou-se um valor médio de CE_{50} de 1,98 μ g/mL. Embora o número de isolado de batata coletados em 2004-2005 seja proporcionalmente inferior aqueles coletados entre 2010 e 2012, nota-se um sensível aumento na CE_{50} do fungicida clorothalonil. Porém, esse fato não evidencia a perda de sensibilidade dos isolados ao clorothalonil quando comparado com estudos anteriores (REIS et al., 2005; OLIVEIRA, 2010).

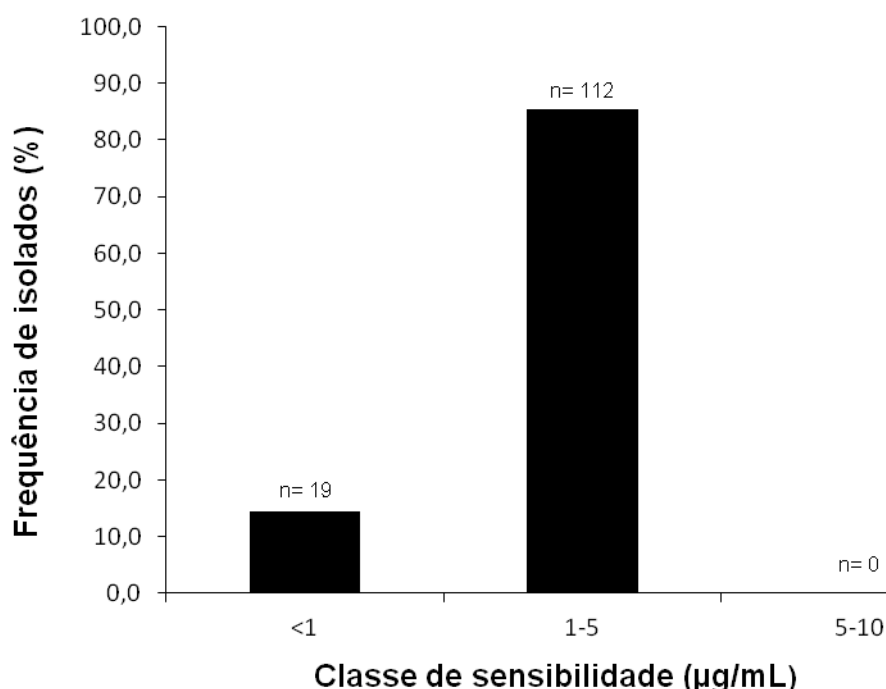


Figura 2 - Frequência (%) de isolados de *Phytophthora infestans* (n= número de isolados), em diferentes classes de valores de CE_{50} (concentração efetiva) estimado para o fungicida clorotalonil. Pelotas/RS, 2014.

Os maiores valores de CE_{50} , por grupo de compatibilidade, foram observados no isolado A2 (CE_{50} = 3,89µg/mL), coletado no município de Silveira Martins, seguido pelo isolado A1 (CE_{50} = 3,73µg/mL) coletado em Cristal, ambos provenientes do RS; no estado de Santa Catarina, o isolado coletado no município de Itaiópolis, com CE_{50} = 3,32µg/mL e pertencente ao GC A2; e, no estado de PR, um isolado com CE_{50} = 2,87µg/mL e do GC A2. Entretanto, os menores valores de CE_{50} foram observados em dois isolados do GC A2 no RS (CE_{50} = 0,01µg/mL); um do GC A2 (CE_{50} = 0,01µg/mL) e dois isolados autoférteis (CE_{50} = 0,42-0,45µg/mL) coletados em SC; e em quatro isolados autoférteis provenientes do PR (CE_{50} = 0,66-1,09µg/mL), sendo todos esses isolados autoférteis, também sensíveis a metalaxyl (Tabela 7).

A ocorrência simultânea de alguns isolados de *P. infestans* resistentes a metalaxyl e com valores mais elevados da CE_{50} a clorotalonil, em São José dos Ausentes e Ibirairas-RS (Tabela 7), pode estar relacionada ao manejo fitossanitário inadequado das lavouras de batata dessa microrregião, conforme relatado anteriormente. A inadequada planificação no uso de produtos fitossanitarios como o uso contínuo de fungicidas sitio-específicos e subdosagens está associado com o aparecimento de cepas resistentes (GISI; SIEROTZKI, 2008). Estas atividades

podem estar relacionadas com o aparecimento de isolados resistentes ao metalaxyl e incremento de CE_{50} para clorothalonil, embora os valores obtidos para o último não sejam significativos para determinar o aparecimento de isolados insensíveis.

Os resultados da concentração inibitória (CE_{50}) do princípio ativo avaliado, não revelam perda da sensibilidade considerando-se os resultados observados em estudos anteriores (SUJKOWSKI et al., 1995; REIS et al., 2005; OLIVEIRA, 2010). Fungicidas protetores como o clorothalonil, interferem em diferentes processos bioquímicos do fungo, simultaneamente. Consequentemente, existe baixo risco de surgimento de isolados resistentes (ZAMBOLIN; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). No entanto, o monitoramento de sensibilidade *in vitro* de isolados de *P. infestans* a fungicidas, no Sul do Brasil, constitui-se como ferramenta importante na adoção de medidas eficientes para o controle da requeima na cultura da batata.

Tabela 7 - Sensibilidade de isolados de *Phytophthora infestans*, coletados no Sul do Brasil aos fungicidas metalaxyl e clorothalonil, grupo de compatibilidade (GC), hospedeiros, procedência e período de coleta. Pelotas/RS, 2014.

Isolados	Metalaxyl	Clorothalonil	GC ²	Hospedeiro	Município/Estado	PC ³
	Sensibilidade ¹	CE ₅₀				
SJA-06	MR	4,67	ND*	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
4 SvM	MR	3,89	A2	Batata	Silveira Martins/RS	2010
IBI-06b	R	3,88	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
CRI-5-a	R	3,73	A1	Batata	Cristal/RS	2011
SJA-09	MR	3,56	ND	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
IBI - 06e	R	3,55	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
SFP-03	MR	3,50	ND	Batata	S. F. de Paula/RS	2012
3 CANG	MR	3,46	ND	Batata	Canguçu/RS	2010
SL -05-a	MR	3,46	ND	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
SJA-14	MR	3,44	A1	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
SJA-10	R	3,38	A1	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
SL-01-a	MR	3,34	ND	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
BRCLE	MR	3,26	A2	Batata	Pelotas/RS	2011
CRI-1-a	R	3,24	ND	Batata	Cristal/RS	2011
4-2NP	MR	3,23	ND	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010
BJ-07	-	3,09	A2	Batata	Bom Jesus/RS	2012
SL-5b	MR	3,05	A1A2	Batata	São Lourenço/RS	2011
IBI - 02b	MR	3,03	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
SL-04-a	MR	2,95	ND	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
SJA-13	MR	2,93	A1	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
SJA-17	MR	2,93	A2	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
IBI-03-a	MR	2,90	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
SFP-08	MR	2,90	A1A2	Batata	S. F. de Paula/RS	2012
SJA-07	MR	2,89	ND	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
SFP-02	MR	2,87	ND	Batata	S. F. de Paula/RS	2012
SJA-12	R	2,87	A1	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
IBI - 03b	MR	2,86	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
SFP-07	MR	2,82	ND	Batata	S. F. de Paula/RS	2012
Campo 2	MR	2,79	A2	Batata	Pelotas/RS	2011
SJA-15	MR	2,79	A1	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
IBI-01f	R	2,75	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
IBI - 06-a	MR	2,71	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
SFP-01	MR	2,69	ND	Batata	S. F. de Paula/RS	2012
BJ-02	MR	2,67	A2	Batata	Bom Jesus/RS	2012
1 SVM	MR	2,66	A2	Batata	Silveira Martins/RS	2010
IBI- 02-a	MR	2,45	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011

Isolados	Metalaxyl	Clorothalonil	GC ²	Hospedeiro	Município/Estado	PC ³
	Sensibilidade ¹	CE ₅₀				
IBI-06d	MR	2,40	ND*	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
SJA-04	MR	2,39	ND	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
SJA-18	MR	2,35	ND	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
IBI-04-a	R	2,35	A1	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
IBI-01c	MR	2,32	A2	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
SL-4b	MR	2,30	A2	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
BJ-03	MR	2,27	A2	Batata	Bom Jesus/RS	2012
SL-03	MR	2,26	A2	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
SL-4d	MR	2,26	ND	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
IBI-05	MR	2,25	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
IBI-01d	R	2,25	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
Pel-2b	MR	2,23	A1A2	Batata	Pelotas/RS	2011
SJA -16	MR	2,21	A2	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
3 SVM	MR	2,13	A1A2	Batata	Silveira Martins/RS	2010
Pel-03	MR	2,10	A1A2	Batata	Pelotas/RS	2011
4-1NP	MR	2,07	ND	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010
5 NP	MR	2,06	A2	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010
BJ-01	MR	2,06	ND	Batata	Bom Jesus/RS	2012
IBI-04B	MR	2,06	A1	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
EMB-C	MR	2,04	A2	Batata	Pelotas/RS	2011
1 NP	MR	1,96	A1	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010
IBI-01e	R	1,89	ND	Batata	Ibiraíaras/RS	2011
BJ-05	MR	1,85	A2	Batata	Bom Jesus/RS	2012
2 CANG	MR	1,83	ND	Batata	Canguçu/RS	2010
BJ-08	MR	1,79	ND	Batata	Bom Jesus/RS	2012
SL-05c	MR	1,75	A1A2	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
9 SVM	MR	1,62	A2	Batata	Silveira Martins/RS	2010
SJA-08	MR	1,61	A1	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012
CRIS	MR	1,42	ND	Batata	Cristal/RS	2010
3NP	MR	1,42	ND	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010
CRIS-03	MR	1,28	A2	Batata	Cristal/RS	2011
SL-01b	MR	1,24	A2	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
SFP-06	MR	0,82	ND	Batata	S. F. de Paula/RS	2012
5SVM	MR	0,71	ND	Batata	Silveira Martins/RS	2010
CRI-09	MR	0,66	ND	Batata	Cristal/RS	2011
Pel-9	MR	0,1	ND	Batata	Pelotas/RS	2011
2-CES	MR	0,06	ND	Batata	Pelotas/RS	2010
CRI-7-a	MR	0,04	ND	Batata	Cristal/RS	2011
CRI-06	MR	0,03	A2	Batata	Cristal/RS	2011
1-CANG	MR	0,01	A2	Batata	Cristal/RS	2010
RG-01	MR	0,01	A2	Batata	Rio Grande/RS	2013

Isolados	Metalaxyl	Clorothalonil	GC ²	Hospedeiro	Município/Estado	PC ³
	Sensibilidade ¹	CE ₅₀				
SL-04c	MR	0,14	ND*	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
SL-01c	MR	0,21	A2	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
IBI-01b	MR	-	A2	Batata	Ibiraiaras/RS	2011
CRI-02	R	-	A1	Batata	Cristal/RS	2011
CRI-4b	MR	-	ND	Batata	Cristal/RS	2011
CRI-8b	R	-	ND	Batata	Cristal/RS	2011
CRI-5b	MR	-	ND	Batata	Cristal/RS	2011
CRI-1b	R	-	ND	Batata	Cristal/RS	2011
SL-02	MR	-	ND	Batata	São Lourenço do Sul/RS	2011
BJ – 04	MR	-	A2	Batata	Bom Jesus/RS	2012
IBI-06b	R	-	ND	Batata	Ibiraiaras/RS	2011
SC–11	MR	3,32	A2	Batata	Itaiópolis/SC	2011
SC-12	MR	3,16	A2	Batata	Itaiópolis/SC	2011
SJ-6a1	MR	2,95	ND	Batata	São Joaquim/SC	2011
SC – 03	R	2,89	A1	Batata	Paulo Pereira/SC	2011
MF-01	R	2,87	A2	Batata	Mafrá/SC	2012
SC-C8	MR	2,53	AF**	Batata	Canoinhas/SC	2012
SC-C 3	MR	2,53	ND	Batata	Canoinhas/SC	2012
SC-16	MR	2,39	ND	Batata	São Joaquim/SC	2011
SC SJ-7	R	2,19	A1	Batata	São Joaquim/SC	2011
SC- 15	MR	2,17	A2	Batata	Três Barras/SC	2011
SC-08	MR	2,10	A2	Batata	Canoinhas/SC	2011
SJ-6b1	MR	2,08	ND	Batata	São Joaquim/SC	2011
SC-12(1)	MR	2,01	A2	Batata	Itaiópolis/SC	2011
SC-18	MR	1,67	A2	Batata	São Joaquim/SC	2011
MF-03	MR	1,5	A2	Batata	Mafrá/SC	2012
SC-C-07	MR	0,66	ND	Batata	Canoinhas/SC	2012
MF-07	S	0,65	AF	Batata	Mafrá/SC	2012
SC-C-04	S	0,42	AF	Batata	Canoinhas/SC	2012
MF-04	MR	0,01	A2	Batata	Mafrá/SC	2012
PRGU-3	MR	4,28	ND	Batata	Guarapuava/PR	2011
PR-15	MR	2,87	A2	Batata	Araucária/PR	2011
PR -03b	MR	2,8	A2	Batata	Pinhão/PR	2011
PR-PL-3b	R	2,78	A2	Batata	Palmas/PR	2011
PR -10	MR	2,55	AF	Batata	Castro/PR	2011
PR- 24	MR	2,41	A2	Batata	Contenda/PR	2011
PR -20	R	2,35	A2	Batata	Araucária/PR	2011
PR – 26	MR	2,30	A2	Batata	Lapa/PR	2011
PR-07c	MR	2,22		Batata	Lapa/PR	2011
PRPL -1	MR	2,16	A2	Batata	Palmas/PR	2011
AR-02	MR	2,14	A2	Batata	Araucária/PR	2012

Isolados	Metalaxyl	Clorothalonil	GC ²	Hospedeiro	Município/Estado	PC ³
	Sensibilidade ¹	CE ₅₀				
PRPL-3-a	R	2,12	A1	Batata	Palmas/PR	2011
PR -27	R	2,08	A2	Batata	Lapa/PR	2011
PRGU-01	MR	2,05	A2	Batata	Guarapuava/PR	2011
PR – 14	MR	2,02	ND*	Batata	Araucária/PR	2011
PRPL-04	MR	2,00	A2	Batata	Palmas/PR	2011
PR -18	MR	1,89	ND	Batata	Araucária/PR	2011
CLAR- 1	R	1,85	A2	Batata	Campo Largo/PR	2012
PGR-01	MR	1,72	AF	Batata	Ponta Grossa/PR	2012
PRGU-5	MR	1,67	A2	Batata	Guarapuava/PR	2011
PGR-3	S	1,56	AF	Batata	Ponta Grossa/PR	2012
PL- 03b	R	1,51	A2	Batata	Palmas/PR	2011
PR- 17	MR	1,49	AF**	Batata	Araucária/PR	2011
PR-01-a	S	1,09	AF	Batata	Palmas/PR	2011
PGR-4	S	0,79	AF	Batata	Ponta Grossa/PR	2012
BN – 02	S	0,78	AF	Batata	Balsa Nova/PR	2012
PGR-07	S	0,66	AF	Batata	Ponta Grossa/PR	2012
87	-	2,99	A1	Batata	Silveira Martins/RS	2004
151	-	2,17	A2	Batata	S.M. do Herval/RS	2005
85	-	0,02	A1A2	Batata	Cristal/RS	2004
115	-	2,19	A1	Batata	Ibirairas/RS	2004
69	-	1,90	A1	Batata	Morro Redondo/RS	2004
166C	-	2,61	A2	Batata	S.J. dos Ausentes/RS	2005

¹Sensibilidade: S= Sensível, MR= Moderadamente resistente, R= Resistente; ²GC= Grupo de compatibilidade (A1, A2, A1A2); *ND= não determinado; **AF= Autofértil; ³PC= Período de coleta dos isolados; CE₅₀- concentração efetiva de inibição.

3.4 Conclusões

- Existe alta diversidade e complexidade de raças de *P. infestans* em lavouras de batata dos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná;

- A maioria dos isolados de *P. infestans* provenientes do Sul do Brasil são moderadamente resistentes ao fungicida sistêmico metalaxyl, porém não há evidências de perda de sensibilidade desses isolados ao fungicida protetor clorothalonil.

4. CAPÍTULO III - Resistência genética de cultivares, clones e acessos silvestres de batata a *Phytophthora infestans*

4.1 Introdução

A batata (*Solanum tuberosum* L.), com uma produção mundial que ultrapassa os 368 milhões de toneladas, é o terceiro alimento de maior importância para a humanidade. No Brasil, a produção durante a safra 2013 foi de 3.569.750 toneladas de tubérculos de batata (FAO, 2013; IBGE, 2014); no entanto, a cultura é seriamente afetada por vários fatores de ordem fitossanitária. Entre esses, a requeima, doença causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans* (Montague) de Bary, causa os maiores danos à cultura nas diferentes regiões de cultivo do globo (CHIMIELARZ et al., 2014).

O primeiro registro da requeima em batata, ocorreu entre os anos de 1845 e 1849, quando então epidemias decorrentes dessa doença devastaram plantações inteiras da cultura, resultando em 'grande fome' na europa, o que ocasionou a morte de mais de 600.000 irlandeses e a emigração de 1,3 milhões de europeus para outros continentes (ZADOKS, 2008). No Brasil, a requeima é uma doença altamente destrutiva tanto na cultura da batata como do tomateiro, podendo comprometer totalmente a produtividade em regiões do país onde as condições meteorológicas são favoráveis ao desenvolvimento da doença (REIS et al., 2003; DUARTE et al., 2012).

Entre os métodos de controle, os mais utilizados no manejo da requeima baseiam-se no uso de fungicidas com intervalos contínuos de aplicação, principalmente aqueles de ação sistêmica e de contato (NAZARENO et al., 1999; REIS et al., 2003; COOKE et al., 2011). No entanto, o uso intensivo e indiscriminado de fungicidas, eleva os custos de produção e pode contribuir para a seleção de

populações de patógeno resistentes a alguns desses produtos, principalmente os mais específicos (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007; HAVERKORT et al., 2008; FRY, 2008).

Mudanças na estrutura das populações de *P. infestans* vêm ocorrendo em diversas partes do mundo nos últimos 20 anos. Essas evidências têm sido relacionadas à maior diversidade do patógeno com o aparecimento de populações mais agressivas, e, conseqüentemente, a ocorrência de epidemias nas lavouras (COOKE et al., 2011; DANIES et al., 2013; CHMIELARZ, et al., 2014), sendo que no Brasil isto tem ocorrido sobretudo na cultura da batata (SANTANA, 2006; OLIVEIRA, 2010). Nesse contexto, o uso de cultivares resistentes à *P. infestans* torna-se uma constante necessidade por ser uma medida de controle eficaz no manejo integrado da doença (DUARTE et al., 2012; SHARMA et al., 2013; AKINO; TAKEMOTO; HOSAKA, 2014).

A resistência qualitativa (monogênica) da batata a *P. infestans* é facilmente superada pela ocorrência de novas raças do patógeno o que a torna ineficiente em uso contínuo em função de mudanças na população do patógeno (WASTIE, 1991). No entanto, o tipo de resistência viável e desejada na cultura da batata é a resistência horizontal (resistência raça não específica) que, sendo controlada por genes menores e com pequenos efeitos cumulativos e contínuos, confere uma resistência mais durável e estável na proteção das plantas (LANDEO, 2002; AKINO; TAKEMOTO; HOSAKA, 2014).

Desta forma, a obtenção de materiais com genes menores de resistência ao patógeno, é a característica mais desejada dentro de um programa de melhoramento genético. Contudo, a maioria de cultivares de batata disponíveis no mercado, é suscetível ou têm resistência limitada a requeima, e aqueles genótipos resistentes, geralmente apresentam características de importância econômica indesejáveis relacionadas principalmente à qualidade de tubérculos comercializáveis (FRY, 2008; PEREIRA et al., 2012).

Em diferentes partes do mundo, os programas de melhoramento genético de batata têm focado na busca de resistência durável à requeima conjuntamente com o melhoramento de características agrônômicas desejáveis (LANDEO, 2002; COOKE et al., 2011; FORBES, 2012). Dessa forma, teve-se por objetivo nesse trabalho: 1) avaliar a resistência a campo de 24 genótipos de batata, entre cultivares comerciais e clones do programa de melhoramento genético da Embrapa a dois isolados de

Phytophthora infestans; 2) comparar metodologias de avaliação *in vitro* e a campo da severidade de *P. infestans* em diferentes genótipos de batata; 3) prospectar fontes de resistência à *P. infestans* em acessos de batata silvestre em bioensaio estabelecido *in vitro*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Isolados de *Phytophthora infestans* e produção de inóculo

Para realização do presente estudo, utilizaram-se dois isolados de *P. infestans* de batata provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado. Um dos isolados foi identificado como pertencente ao grupo de compatibilidade A1 e com 2 genes de virulência (Raça 3,6); e, o outro, pertencente ao grupo de compatibilidade A2 e com dez genes de virulência (Raça 1,2,3,4,5,6,7,8,9,11), ambos determinados previamente em uma série de clones diferenciadoras (R1-R11) com base na escala de severidade de doença (SD) de Sozzi, Schwinn e Gisi (1992).

Para preparação do inóculo, placas de Petri contendo micélio e esporângios de *P. infestans*, foram lavadas com água destilada a fim de se obter uma suspensão aquosa ajustada para 10^4 esporângios do oomiceto/mL para cada isolado, separadamente.

4.2.2 Genótipos de batata

Foram utilizados 24 genótipos de batata dentre os quais, sete cultivares (Agata, Bintje, Macaca, Asterix, Clara, Ana, Eliza e Catucha); cinco clones provenientes do programa de melhoramento genético da batata da Embrapa desenvolvidos com foco em qualidade de tubérculos (RM98-23-05, CL-02-05, F23-24-06, F63-01-06 e CL-20-01-06); e, sete clones também da Embrapa melhorados para resistência a *P. infestans* (C2572-3-06, C2557-2-06, C2569-1-06, C2553-1-06, C2573-4-06, C2550-4-06, C2551-2-06 e CIP-392.617.54), tendo como progenitores, genótipos da população B3 de *S. tuberosum* provenientes do Centro Internacional da Batata (Centro Internacional de la Papa-CIP) com resistência quantitativa a *P.*

infestans. Como padrões de suscetibilidade, utilizaram-se as cultivares Bintje e Agata, e, como resistente, o clone CIP-392.617.54 (GOMES et al., 2009) (Tabela 1).

Tabela 1 – Genótipos de batata utilizados para avaliação de resistência à *Phytophthora infestans* em condições de campo e “*in vitro*”. Pelotas/RS, 2014.

Genótipos	Progenitores	Origem
F189-09-06	BP-1 x C1883-22-97	Brasil
AGATA	Böhn 52/72 x Sirco	Holanda
RM982305	-	Brasil
Bel	Rioja x C- 1740-11-95	Brasil
MACACA	Origem desconhecida	Brasil
CL-02-05	-	França
F23-24-06	Rioja x Eliza	Brasil
ASTERIX	Cardinal x SVPVe 709	Holanda
CLARA	White Lady x Catucha	Brasil
ANA	C-1750-15-95 x Asterix	Brasil
BINTJE	Munstersen x Fransen	Holanda
F63-01-06	C1883-22-97 x C1750-15-95	Brasil
CL-20-01-06	Caesar autopolinizadas	Brasil
C2545-1-06	CIP 385.524.9 x C 1750-15-95	Brasil
ELIZA	Edzina x Recent	Brasil
C2572-3-06	CIP 393.077.159 x C-1226.35-80	Brasil
C2557-2-06	CIP 393.242.50 x C 1750-15-95	Brasil
C2569-1-06	CIP 392.617.54 x C-1226-35-80	Brasil
C2553-1-06	CIP 391.611.17 x C-1740-11-95	Brasil
C2573-4-06	CIP 393 556.4 x C 1786-6-96	Brasil
C2550-4-06	CIP 391.011.17 x Cristal	Brasil
CATUCHA	2CRI-1149-1-78 x C-999-263-70	Brasil
C2551-2-06	CIP 381.463.8 x Cristal	Brasil
CIP-392.617.54	387002.11 x 387170.9	Peru

4.2.3 Reação de genótipos de batata a *Phytophthora infestans* em condições de campo

Avaliou-se a reação dos 24 genótipos de batata (item 4.2.2) a dois isolados de *P. infestans* em duas áreas experimentais da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS (isolado A1 – latitude -31°67'95" e longitude -52°43'20"; isolado A2 - latitude -31°68'56", longitude -52°43'64") durante a safra de outono (março-junho) de 2013.

O Delineamento do experimento foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial (24 x 2), com três repetições. A parcela experimental foi constituída de uma linha contendo oito plantas, espaçadas de 0,30 m entre plantas e 0,80 m entre linhas, sendo as parcelas adubadas com fertilizante comercial NPK 5-30-10 (2,0 t há⁻¹). Decorridos 47 dias do plantio, as plantas de cada local foram inoculadas separadamente com uma suspensão de 10⁴ esporângios de *P. infestans* /mL do isolado A1 ou A2, em água mais espalhante adesivo tween a 0,1%, utilizando-se, para tanto, um pulverizador manual costal de 5L.

Durante o período compreendido entre a inoculação do patógeno até o 28º dia após inoculação (DAI), a temperatura média do ar foi de 13,8°C e a máxima de 18,9 °C (Figura 1), a umidade relativa do ar oscilou entre 45 a 84% com média de 72%, e, a precipitação pluvial foi de 57,1mm (Figura 2).

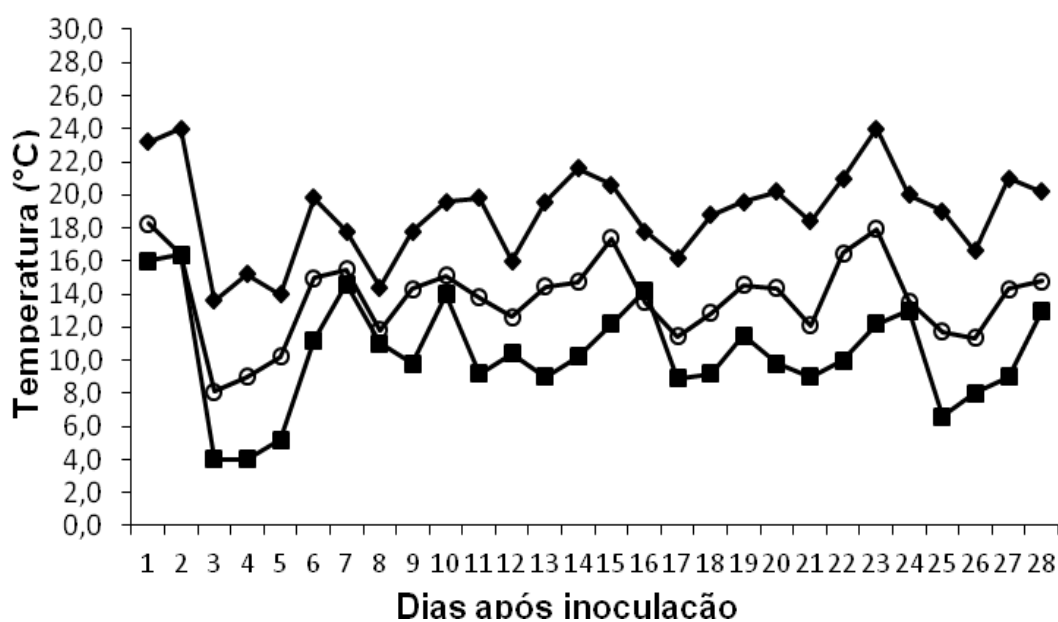


Figura 1 – Dados de temperatura máxima (♦), média (○) e mínima (■), durante o período de avaliação da severidade de requeima em batata, em condições de campo. Pelotas/RS, 2014.

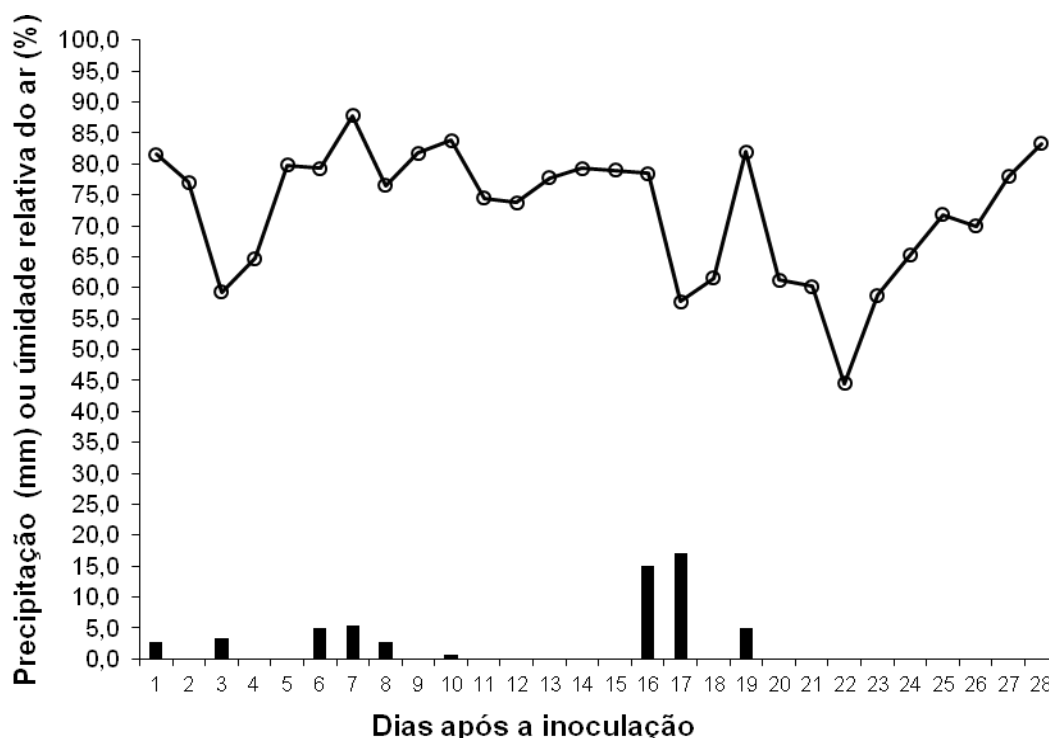


Figura 2 – Dados de umidade relativa do ar em porcentagem (○) e de precipitação pluvial em mm (■), durante o período de avaliação da severidade de requeima em diferentes genótipos de batata inoculados com *Phytophthora infestans*, em condições de campo. Pelotas/RS, 2014.

A severidade de doença (SEV), em porcentagem, foi avaliada a partir do 7º dia da inoculação (DAI) com intervalos não constantes até o 28º DAI (sétima avaliação), baseando-se na escala gráfica de severidade de doença proposta por (CLIVE, 1970) e modificada atribuindo-se valores intermediárias. A partir dos dados de SEV, foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) para cada genótipo de batata utilizando-se o programa GW Basic (MAFFIA, 1986). A seguir, os valores de AACPD foram submetidos ao teste de agrupamento de Scott & knott a 5% de probabilidade do erro, utilizando-se o software estatístico GENES (CRUZ, 2001). Com base nessas análises e nos valores de SEV, finalmente, os genótipos de batata foram agrupados em níveis de resistência: altamente resistente (AR), resistente (R), moderadamente resistente (MR), moderadamente suscetível (MS), suscetível (S) e altamente suscetível (AS).

4.2.4 Produtividade

Decorridos 108 dias do plantio, procedeu-se à colheita, e, a seguir, a pesagem dos tubérculos de batata, em balança eletrônica, para determinação da massa (g/parcela). A seguir, os valores de produção foram submetidos ao teste de agrupamento de Scott & Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o software estatístico GENES (CRUZ, 2001). Adicionalmente, 40 dias após a colheita avaliou-se, a infecção de requeima nos tubérculos de batata, através de cortes realizados no tubérculo e observando a necrose ocasionada pelo patógeno.

4.2.5 Avaliação *in vitro* da severidade de *Phytophthora infestans* em genótipos de batata

4.2.5.1 Avaliação da severidade de *Phytophthora infestans* em discos foliares de batata

Para realização desse trabalho, primeiramente foi efetuado o plantio de tubérculos dos 24 genótipos de batata em vaso contendo 2Kg de substrato comercial adubado com NPK (formulação 5-30-10), sob condições de casa de vegetação. Decorridos 40 dias do plantio, foram retiradas folhas de cada genótipo de batata para obtenção de discos foliares de 15mm de diâmetro.

A seguir, cinco discos foliares de cada genótipo, foram dispostos sobre papel filtro umedecido com água esterilizada em placas de Petri de 90mm. Subsequentemente, cada disco foi inoculado com 20µL de uma suspensão contendo 10^5 esporângios do isolado A1 ou A2 de *P. infestans*/mL, utilizando-se as cvs. Bintje e Agata como padrões suscetíveis, e, o clone CIP- 392.617.54, como testemunha resistente (GOMES et al., 2009) (Figura 3).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial (24 x 2) com três repetições, onde cada parcela experimental foi constituída de uma placa contendo cinco discos de folha. Posteriormente, o material foi incubado em BOD a $17 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h durante seis dias. A avaliação foi realizada com base na escala de severidade de doença (SD) em cada tratamento utilizando-se metodologia de Sozzi, Schwinn e Gisi (1992), conforme o grau de SD: onde: 0=

sem sintomas; 1= necrose, 2 = 5%, 3 = 5 a 20%, 4 = 20 a 50%, e, 5= > 50% da superfície do disco de folha coberto pela esporulação do oomiceto.

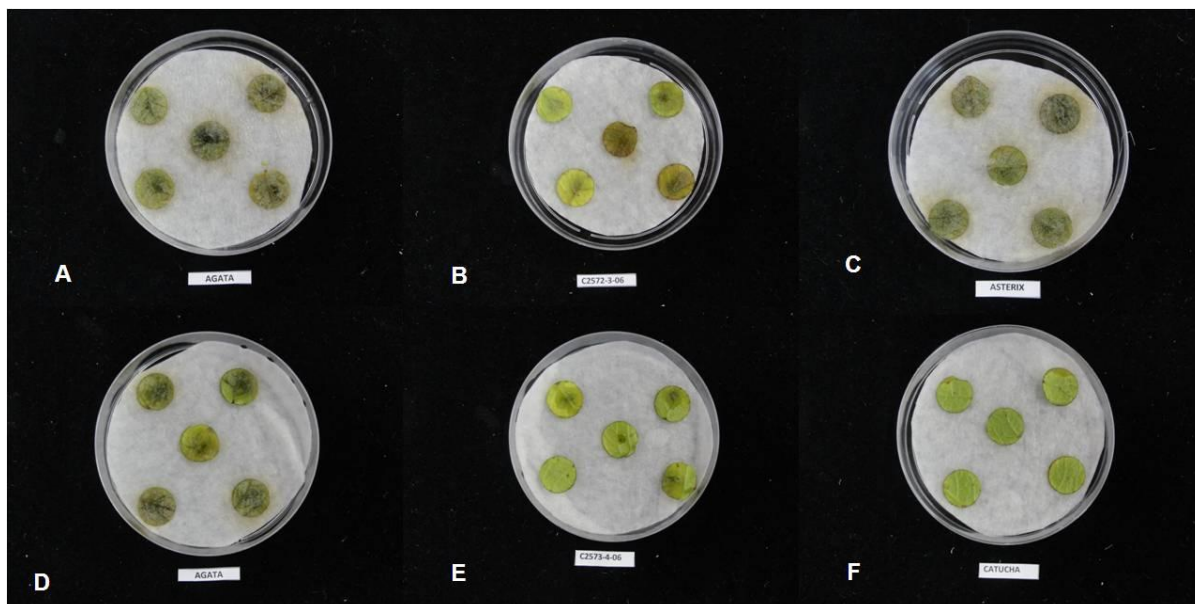


Figura 3 – Discos foliares de batata inoculados com o isolado A2 (A,B,C) e A1 (D,E,F) de *Phytophthora infestans*. Pelotas/RS, 2014.

4.2.5.2 Avaliação da severidade de *Phytophthora infestans* em folhas destacadas de batata

Primeiramente, plantas de batata dos diferentes genótipos, além dos padrões suscetível 'Bintje', e, resistente, o clone CIP-392.617.54 (GOMES et al., 2009), foram obtidas conforme item 4.2.5.1, no período de maio-julho de 2013. Decorridos, 40 dias do plantio, folhas do terço médio das plantas de cada genótipo foram retiradas, selecionadas e padronizadas pelo tamanho. A seguir, o trabalho foi realizado conforme metodologia descrita por Colon, Nielsen e Darsow (2004). Para tanto, as folhas foram lavadas cuidadosamente e depositadas pela face abaxial sobre papel *germitest* umedecido com água esterilizada e imediatamente colocada em bandeja plástica (46x30x10cm).

Como inóculo do patógeno, foram utilizados dois isolados *P. infestans* de diferente grupo de compatibilidade conforme descrito no item 4.2.1.

A seguir, realizou-se a inoculação de cada isolado de *P. infestans*, separadamente, no centro das folhas dos diferentes materiais com uma suspensão contendo 20µL de 10^5 esporângios de *P. infestans*/mL. Subsequentemente, as

bandejas foram vedadas com filme plástico transparente, e, incubada em BOD a 17°C com fotoperíodo de 16h por seis dias (Figura 4). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (24 x 2) com três repetições, sendo cada repetição representado por uma folha destacada. A avaliação da doença, nas folhas, foi realizada em porcentagem de severidade de área infectada (0,1-100%) de acordo com o protocolo da *Potato Late Blight Network For Europe* (COLON; NIELSEN; DARSOW, 2004), atribuindo-se valores intermediários de severidade entre (01-100%).



Figura 4 – Folhas destacadas de batata inoculadas com *Phytophthora infestans* exibindo diferentes níveis de infecção e esporulação do patógeno. Pelotas/RS, 2014.

4.2.6 Resistência foliar *in vitro* de acessos silvestres de batata a *Phytophthora infestans*

Vinte e cinco genótipos de batata (*Solanum* spp.), obtidos do Banco de Germoplasma da Embrapa, entre os quais, 11 acessos de *S. chacoense* ssp. *chacoense*, dois acessos de *S. chacoense* ssp. *muelleri*, e 11 acessos de *S. tuberosum* com ancestralidade de *S. berthaultii* (Tabela 2) foram testados *in vitro*

quanto à infecção por *P. infestans*. Para tanto, utilizou-se como padrão de suscetibilidade a cv. Agata, moderadamente suscetível a cv. Ana, e Eliza como padrão moderadamente resistente (GOMES et al., 2009).

Para a realização do teste, as plantas de cada um dos genótipos foram obtidas conforme item 4.2.5.1. Decorridos 30 dias do plantio dos tubérculos, as folhas de cada material foram coletadas durante as primeiras horas do dia, selecionando-se aquelas de tamanho semelhante. O bioteste foi realizado em placas de Petri de 90mm, onde foi acondicionado papel filtro umedecido, e, sobre estas, foram depositados cinco discos de folhas de batata com 15mm de diâmetro para cada genótipo. A seguir, cada disco foi inoculado com 20µL de uma suspensão contendo 10^5 esporângios de *P. infestans*/mL de um isolado do grupo de compatibilidade A2 contendo sete genes de virulência (Raça 1,3,4,7,8,10,11).

Logo após, as placas foram incubadas a $17 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h por seis dias, sendo as mesmas dispostas em BOD em delineamento completamente casualizado com três repetições/genótipo. Decorrido o período de incubação, cada disco foi avaliado com base na escala de severidade de doença (SD) conforme metodologia de Sozzi, Schwinn e Gisi (1992), já detalhada anteriormente.

Tabela 2 - Origem de acessos silvestres de *Solanum* spp. avaliados quanto à severidade *in vitro* de *Phytophthora infestans*. Pelotas/RS, 2014.

Acessos	Espécie/Progenitores	Origem
<i>S. ch.</i> -68	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>muelleri</i>	Brasil
126	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>muelleri</i>	Brasil
61-8	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	Argentina
46-10	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	Argentina
68-8	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	Argentina
56-8	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	Argentina
45-4	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	Argentina
63-2	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	Argentina
55-5	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	Argentina
55-7	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	Argentina
44-7	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	Argentina
68-16	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	Brasil
51-9	<i>Solanum chacoense</i> spp. <i>chacoense</i>	-
499	N-263-32 x 2 CRI-1149-1-78	Brasil
511	Cristal x NYL-23-4	Brasil
513	C-1226 -35 - 80 x NYL - 235 -4	Brasil
525	N-263-32 x 2 CRI-1149-1-82	Brasil
543	Eliza x NYL-235-4	Brasil
545	Cristal x NYL - 235-4	Brasil
546	White lady x N-140 (<i>Solanum berthaultii</i>)	Brasil
664	<i>Solanum berthaultii</i> (N-263-32) x Eliza	Brasil
676	Eliza x N-140 (<i>Solanum berthaultii</i>)	Brasil
675	<i>Solanum berthaultii</i> P16 103 (K88-64 x 514-1) x Mirka	Brasil
NYL-235-4	Prince Hairy (<i>Solanum berthaultii</i> x Hudson)	EUA
<i>S. calvescens</i>	-	Peru
Agata	BM 52-72 x Sirco	Holanda
Ana	C-1750-15-95 x Asterix	Brasil
Eliza	Edzina x Recent	Brasil

4.2.7 Análise dos dados

Os valores de AACPD e produtividade do experimento de campo, e os índices e valores de severidade dos três ensaios *in vitro* foram submetidos a ANOVA e ao teste de agrupamento de médias de Scott & Knott a 5% de probabilidade do erro, através do programa GENES (CRUZ, 2001). Adicionalmente, análises de correlação foram realizadas entre as principais variáveis utilizando-se o software SAS (Statistical Analysis System 9.0, SAS Institute, Cary, NC-USA).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Reação de genótipos de batata a *Phytophthora infestans* em condições de campo

De acordo com os resultados obtidos (Tabelas 3 e 4), verificou-se interação significativa entre genótipos de batata e isolados de *P. infestans* tanto para a variável AACPD como para massa de tubérculos ($P < 0,05$).

Analisando-se os dados de AACPD nos diferentes materiais genéticos pode-se verificar maior agressividade do isolado A2, cujos valores de severidade da requeima observados aos 28 dias após inoculação (DAI), foram de 100% em 14 dos 24 genótipos de batata avaliados. Já a severidade dos mesmos materiais submetidos à inoculação com o isolado A1, aos 28 DAI, foi no máximo de 80,3%, na cv. Agata (Tabela 3 e Figura 5).

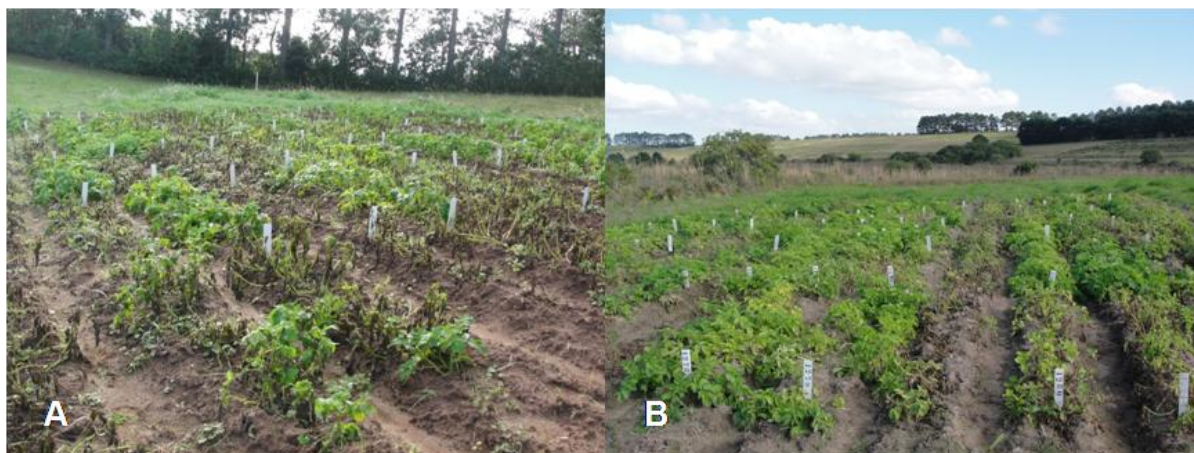


Figura 5 - Severidade de requeima em genótipos de batata infectados com o isolado A2 (A) e A1(B) de *Phytophthora infestans*, 28 dias após a inoculação (DAI), em condições de campo. Pelotas/RS, 2014.

Segundo Nowicki et al. (2012), epidemias de *P. infestans* são intensificadas quando as condições meteorológicas são favoráveis, considerando-se a suscetibilidade do hospedeiro e a agressividade do patógeno (ROJAS et al., 2014). Assim, temperaturas baixas, valores de umidade relativa acima de 70% e ocorrência de precipitação pluvial são favoráveis ao patógeno (DUARTE et al., 2012; DANIES et al., 2013). Tal consideração explica a rápida evolução da doença no experimento onde foi inoculada o isolado A2, pois durante o período compreendido entre a

inoculação até a última avaliação, as condições meteorológicas foram favoráveis ao patógeno (Figuras 1 e 2), assim como também a agressividade deste isolado foi maior na grande maioria dos genótipos testados.

Com base nas análises estatísticas da variável AACPD e dos valores de severidade da requeima, observados a campo, os genótipos avaliados foram agrupados em seis grupos quanto à reação ao isolado de *P. infestans* A2 e, cinco, para o isolado A1. De uma forma geral, observou-se que a cv. Catucha e os clones C2550-4-06 e C2551-2-06, comportaram-se como resistentes ou altamente resistentes aos dois isolados de *P. infestans* comparativamente ao padrão resistente; e, a cv. Macaca, como suscetível a ambos isolados, considerando-se a cv. Agata como padrão para tal reação (Tabela 3).

Quando analisada a reação dos genótipos submetidos à inoculação com o isolado A2, verificou-se que as cvs. Agata, Bel, Macaca, Asterix, Clara, Ana e Bintje e os clones RM982305, CL-02-05, F23-24-06, F63,-01-06 e CL-20-01-06 foram altamente suscetíveis ($1320,25 > \text{AACPD} < 1634,00$; $\text{SEV} = 100$); o clone C2572-3-06 e a cultivar Eliza, suscetíveis ($643,60 > \text{AACPD} < 822,93$; $74,0 > \text{SEV} < 81,7$); os clones C2569-1-06, C2557-2-06, moderadamente suscetíveis ($396,33 > \text{AACPD} < 465,66$; $33,0 > \text{SEV} < 56,7$); os clones C2573-4-06, C2553-1-06, moderadamente resistentes ($283,00 > \text{AACPD} < 333,33$; $33,0 > \text{SEV} < 44,33$); o clone C2550-4-06 como resistente ($89,43 > \text{AACPD} < 175,56$; $10,0 > \text{SEV} < 21,3$); e, altamente resistentes, a cv. Catucha e os clones C2551-2-06 e CIP-392.617.54 ($0,00 > \text{AACPD} < 89,43$; $0,00 > \text{SEV} < 10,0$).

Já para o mesmo conjunto de plantas inoculado com o isolado A1 de *P. infestans*, de um modo geral, menores valores de AACPD e SEV foram observados (Tabela 3). Assim, as cultivares Agata e Macaca comportaram-se como suscetíveis ($492,26 > \text{AACPD} < 520$; $72,7 > \text{SEV} < 80,3$); o clone RM98-23-05 e as cvs. Bel, Asterix, Clara, Ana e Bintje, moderadamente suscetíveis ($358,6 > \text{AACPD} < 424,43$; $54,7 > \text{SEV} < 70,0$); os clones CL-02-05 e F23-24-06, moderadamente resistentes ($224,50 > \text{AACPD} < 279,33$; $45,3 > \text{SEV} < 46,7$); os clones F189-09-06 e F63-01-06 como resistentes ($155,26 > \text{AACPD} < 164,26$; $17,0 > \text{SEV} < 31,7$); e, um grupo maior de genótipos altamente resistentes comparativamente ao ensaio conduzido com o isolado A2, incluindo 'Catucha', 'Eliza', CL20-01-06 'CIP392.617.54', além de oito clones melhorados para resistência a *P. infestans* ($0,00 > \text{AACPD} < 71,00$; $0,00 > \text{SEV} < 9,3$).

Tabela 3 - Médias de valores da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), severidade e reação de resistência a requeima de 24 genótipos de batata inoculados com dois isolados de *Phytophthora infestans*, em condições de campos. Pelotas/RS, 2014.

Genótipos ¹	Isolado A2 ²			Isolado A1 ³			CV ⁷ (%)
	AACPD	Severidade (%) ⁵	Reação ⁶	AACPD	Severidade (%)	Reação	
F189-09-06	1634,0 Aa ⁴	100,0	AS	155,26 Bd	31,7	R	6,93
AGATA*	1610,33 Aa	100,0	AS	520,00 Ba	80,3	S	9,80
RM98-23-05	1609,33 Aa	100,0	AS	422,16 Bb	64,0	MS	6,91
BRSIPR Bel	1583,50 Aa	100,0	AS	424,43 Bb	54,7	MS	2,93
MACACA	1579,50 Aa	100,0	AS	492,26 Ba	72,7	S	7,38
CL-02-05	1578,16 Aa	100,0	AS	224,50 Bc	45,3	MR	5,87
F23-24-06	1569,83 Aa	100,0	AS	279,33 Bc	46,7	MR	4,84
ASTERIX	1569,50 Aa	100,0	AS	419,00 Bb	70,0	MS	9,51
BRS CLARA	1547,50 Aa	100,0	AS	366,26 Bb	47,3	MS	10,01
BRS ANA	1526,00 Aa	100,0	AS	358,60 Bb	47,0	MS	7,73
BINTJE*	1501,16 Aa	100,0	AS	385,56 Bb	64,0	MS	9,54
F63-01-06	1486,16 Aa	100,0	AS	164,26 Bd	17,0	R	12,41
CL-20-01-06	1427,16 Ab	100,0	AS	71,00 Be	9,3	AR	9,91
C2545-1-06	1320,26 Ac	100,0	AS	40,66 Be	9,0	AR	6,24
BRS ELIZA	822,93 Ad	81,7	S	30,23 Be	3,7	AR	29,16
C2572-3-06	643,60 Ae	74,0	S	4,66 Be	1,0	AR	22,54
C2557-2-06	465,66 Af	33,0	MS	4,66 Be	1,0	AR	26,22
C2569-1-06	396,33 Af	56,7	MS	0,67 Be	0,3	AR	25,64
C2553-1-06	333,33 Ag	44,3	MR	0,67 Be	0,3	AR	28,37
C2573-4-06	283,00 Ag	33,0	MR	2,00 Be	1,0	AR	6,99
C2550-4-06	175,56 Ah	21,3	R	2,00 Be	0,3	AR	29,61
CATUCHA	89,43 Ai	10,0	AR	0,00 Be	0,0	AR	6,14
C2551-2-06	7,33 Ai	1,0	AR	0,00 Ae	0,0	AR	123,98
CIP-392.617.54***	0,00 Ai	0,0	AR	0,00 Ae	0,0	AR	0,00
CV (%)	6,31			30,21			

¹Cultivares e clones de batata; ²*Phytophthora infestans* (Grupo de compatibilidade A2); ³*P. infestans* (Grupo compatibilidade A1); ⁴Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pertence ao mesmo grupo pelo teste de Scott knott a 5 % de probabilidade de erro; ⁵Severidade de doença; ⁶Reação: S= suscetível; MS= Moderadamente suscetível; MR= Moderadamente resistente; R= Resistente; *Padrão suscetível; **Padrão resistente; ⁷CV= Coeficiente de variação.

Comparando-se a agressividade entre os dois isolados de *P. infestans*, o isolado A2 foi mais agressivo em 22 dos 24 materiais testados, conforme maiores valores de severidade e progresso de doença (Tabela 3). Não houve diferenças significativas quanto à AACPD entre os isolados inoculados nos clones resistentes CIP 392.617.54 e C2551-2-6. No entanto, para os demais genótipos cujo comportamento dos isolados foi diferenciado, a agressividade do isolado A2

interferiu sensivelmente nos níveis de resistência a *P. infestans* quando esses mesmos materiais foram inoculados com o isolado A1. Essas constatações são mais evidentes nos clones F189-09-6, F63-01-06, CL02-05 e F23-24-06, que, apesar de resistentes a moderadamente resistentes ao isolado A1, comportaram-se como altamente suscetíveis ao isolado A2.

A análise de variância da produtividade evidencia diferenças significativas na interação genótipos x isolados de *P. infestans*, conforme valores de massa de tubérculos apresentados na Tabela 4. Em 19 dos 24 genótipos inoculados com o isolado A2, foi observado menor peso de tubérculos em relação ao isolado A1, correspondendo, de uma forma geral, aos maiores valores de AACPD verificando-se, assim, uma alta correlação negativa ($R = -0.8276$; $p < 0.0001\%$) entre ambas as variáveis; Da mesma forma, para o isolado menos agressivo (A1) verificou-se correlação negativa ($R = -0.4385$; $p < 0.0001\%$) entre AACPD e massa de tubérculos. Também é interessante notar que dos cinco materiais genéticos onde não houve diferença para produção entre os isolados de *P. infestans*, três deles foram altamente resistentes/resistente (CIP-392.617.5, Catucha, C2551-2-06) e um moderadamente suscetível/altamente resistente (C-2569-1-01) aos isolados A2 e A1, respectivamente.

Entre os quatro genótipos de batata inoculados com o isolado A2 cuja produção de tubérculos foi maior, destacam-se os genótipos resistentes CIP-392.617.54 e 'Catucha' (AR), e os clones C2573-4-06 (MR) e C2569-1-06 (MS). Já para o isolado menos agressivo (A1), os clones C-2550-4-06 (AR) e C2557-2-06 (AR) resultaram em maiores valores de produção, o que pode ter sido atribuído a manifestação das características genéticas desses materiais uma vez que foram menos afetados pela doença (Tabela 4), conforme já observado em condições de campo por Van Oijen (1991a; 1991b).

Avaliando-se a presença de sintomas de requeima nos tubérculos, aos 40 dias da colheita (Tabela 4), observou-se infecção nas cultivares Eliza, Clara e no clone resistente CIP-392.617.54, quando inoculados com o isolado A2; e, nas cvs. Clara e Bintje (MS), e no clone F63-01-06 (R) quando inoculados com o isolado A1. De acordo com a figura 2, as condições meteorológicas favoráveis à requeima, durante a condução do ensaio (precipitação pluviométrica = 226,7mm; UR entre 45-84%), muito provavelmente favoreceram a percolação dos zoósporos no solo através do filme de água formado pela alta umidade ou precipitação pluvial e

consecutivamente a penetração do oomiceto nos tubérculos. No entanto, a severidade da requeima na parte aérea das plantas de batata e a infecção nos tubérculos parecem ser eventos separados. Assim, a resistência foliar pode ter efeito limitado sobre a infecção de *P. infestans* no tubérculo (NYANKANZA et al., 2008), corroborando com as respostas aqui obtidas.

Tabela 4 - Médias de produtividade de massa de tubérculos (MT) em 24 genótipos de batata inoculados com dois isolados de *Phytophthora infestans*, em condições de campo. Pelotas/RS, 2014.

Genótipos ¹	Isolado A2 ²	Isolado A1 ³	Redução produção ⁷	CV
	MT (kg/parcela)	MT (kg/parcela)	(%)	(%)
CIP-392.617.5 ⁵	2,668 Aa ⁴⁺	2,804 Ac	4,85 ^{ns}	31,64
C2573-4-06	2,304 Ba	3,250 Ab	29,10*	20,21
C2569-1-06	2,148 Aa	2,553 Ac	15,86 ^{ns}	18,20
Catucha	2,066 Aa	2,637 Ac	21,65*	8,77
C2553-1-06	1,581 Bb	3,254 Ab	51,41*	25,47
C2551-2-06	1,532 Ab	1,778 Ad	13,85 ^{ns}	27,27
C2572-3-06	1,502 Bb	2,772 Ac	45,81*	10,49
C2550-4-06	1,460 Bb	3,792 Aa	65,50*	10,48
C2557-2-06	1,309 Bb	4,012 Aa	32,62*	9,43
Bel	1,032 Bc	2,549 Ac	59,51*	31,02
Eliza	1,050 Bc ⁺	2,386 Ac	54,00*	21,33
Clara	1,048 Bc ⁺	1,935 Ad ⁺	45,83*	25,20
Ana	0,877 Bc	2,379 Ac	63,13*	24,16
F63-01-06	0,811 Bc	2,815 Ac ⁺	71,13*	12,41
C2545-1-06	0,681 Bc	1,882 Ad	63,81*	52,60
Agata ⁶	0,653 Bc	1,501 Ad	56,49*	10,18
CL-20-01-06	0,648 Ac	0,922 Ae	29,71 ^{ns}	12,63
F23-24-06	0,598 Bc	1,709 Ad ⁺	65,00*	7,18
Bintje ⁵	0,536 Bc	1,590 Ad ⁺	66,28*	23,81
Asterix	0,508 Bc	1,496 Ad	66,04*	44,26
Macaca	0,426 Bc	1,059 Ae	59,77*	53,26
CL-02-05	0,303 Bc	2,338 Ac	87,41*	17,70
F189-09-06	0,253 Bc	1,040 Ae	75,67*	71,45
RM98-23-05	0,149 Bc	1,687 Ad	91,16*	19,73
CV (%)	23,03	21,31		

¹Cultivares e clones de batata; ²*P. infestans* (Grupo de compatibilidade A2); ³*P. infestans* (Grupo de compatibilidade A2); ⁴Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pertence ao mesmo grupo pelo teste de Scott knott a 5 % de probabilidade de erro; ⁺Presença de requeima em tubérculo; ⁵Padrão resistente; ⁶Padrão suscetível; ⁷redução da produção em relação ao isolado A2; MT- massa de tubérculos; CV- coeficiente de variação; *($p < 0,05$); ns- não significativo.

Os materiais com menor AACPD encontrados neste estudo foram a cultivar Catucha e alguns clones de batata. Esses clones foram desenvolvidos em programa de melhoramento genético da Embrapa visando resistência à requeima, tendo como progenitores masculinos, alguns clones pertencentes à população B3 do Centro Internacional da Batata (Centro Internacional de la Papa-CIP), os quais apresentam resistência quantitativa, e, assim, mais estáveis em condições de campo, ao longo do tempo (LANDEO, 2002; WULFF et al., 2007). Portanto, materiais genéticos com genes menores, são uma boa alternativa na incorporação da resistência durável à requeima, a mais procurada dentro dos programas de melhoramento visando à resistência a doença (AKINO; TAKEMOTO; HOSAKA, 2014).

Da mesma forma, a cv. Catucha resultou em maiores valores de produção, nas duas áreas experimentais. Conforme Rauber et al. (2007), esta cultivar de batata apresenta boa produção devido à menor incidência de *P. infestans*, corroborando com os altos índices de resistência desse genótipo observados a campo nesse estudo e em outros já realizados (GOMES et al., 2009). Ainda, segundo Rauber et al. (2007), a rusticidade e resistência de 'Catucha' a diversos problemas fitossanitários, favorecem o seu uso em sistemas de produção orgânico uma vez que essa cultivar é menos dependente de aplicação de insumos para o manejo fitossanitário. Entre outros benefícios, esta cultivar apresenta bom desempenho agrônomo em diferentes condições edafoclimáticas, resistência ao nematoide *Pratylenchus brachyurus* e menor incidência de *Diabrotica speciosa* (SALLES, 2000; CARMO et al., 2009; LIMA-MEDINA, 2013).

A reação das cultivares Agata, Asterix, Bintje e Ana confirmaram a suscetibilidade desses genótipos conforme já reportado em diversos estudos (YUEN; FORBES, 2009; DUARTE, et al., 2012). No entanto, o cultivo de 'Agata' na maioria das áreas de plantio de batata, no Brasil, deve-se ao seu alto rendimento e maturação precoce e dormência curta. Além disso, essa cultivar é imune a *Meloidogyne graminicola* e resistente a *P. brachyurus*. Já a cv. Asterix, além das características de alto potencial de rendimento, possui resistência moderada à pinta-preta e ao nematoide das galhas *M. graminicola* (PEREIRA; DANIELS, 2003; ABBA, 2010b; PÁDUA et al., 2011; LIMA-MEDINA, 2013). Já a cultivar Ana, têm alto potencial produtivo, não apresenta distúrbios fisiológicos nos tubérculos, mesmo quando cultivado durante a estação seca, boa resistência à pinta-preta, resistência moderada a alta ao vírus PVY, baixa incidência do vírus PLVR, resistência a *P.*

brachyurus e tolerância à herbicida (PEREIRA et al., 2010; LIMA-MEDINA, 2013). Essas características tem permitido o seu domínio no mercado, embora necessitem de um maior número de aplicação de fungicidas para o controle de requeima, incrementado assim, os custos de produção (NAZARENO et al., 1999). Nesse contexto, percebe-se que além de resistência a doenças, outras características agrônômicas relacionadas ao manejo e qualidade de tubérculos são essenciais para que uma cultivar se mantenha no mercado.

As diferenças na agressividade dos isolados de *P. infestans* (Tabelas 3 e 4) estão fortemente relacionadas à composição da estrutura da população da espécie. Nas últimas décadas, em diversas partes do mundo, a população de *P. infestans* tem maior variabilidade e se tem evidências da existência de maior agressividade de algumas populações do patógeno, seja dentro do mesmo grupo de compatibilidade ou de grupos distintos (COOKE et al., 2012; DANIES et al., 2013; ROJAS et al., 2014). No Sul do Brasil, a diversidade do patógeno em batata se justifica na existência de populações do grupo de compatibilidade A1, A2 e A1/A2, o que dá indícios de diversidade nos seus caracteres genéticos e fenotípicos, implicando na ocorrência de isolados complexos com vários genes de virulência conforme já observado por Santana et al. (2013). Tais premissas confirmam os resultados obtidos nesse trabalho, onde o isolado A2, com dez diferentes genes de virulência, foi mais agressivo que o isolado A1, que apresentava em sua estrutura, apenas dois genes de virulência. Considerando-se que existem isolados capazes de quebrar um ou mais genes R, este fato pode estar relacionado à maior suscetibilidade apresentada nas cultivares testadas com o isolado A2 (FRY, 2008).

As diferenças de produtividade entre as cultivares e clones de batata estão fortemente relacionadas ao nível de resistência dos genótipos, ao progresso e severidade da requeima. Nesse contexto, perdas na produção de tubérculos em função dessa doença, podem ser observadas com o incremento da suscetibilidade da cultivar quando não são adotadas medidas de controle como a aplicação de fungicidas (ANDERSON et al., 2004; MANTECON, 2009; DUARTE et al., 2012). Dessa forma, o uso de cultivares resistentes, associado à aplicação adequada de fungicidas, quando necessário, podem resultar em menores perdas na produção.

4.3.2 Avaliação *in vitro* da severidade de *Phytophthora infestans* em genótipos de batata

De acordo com as análises de variância dos valores de severidade obtidos *in vitro* (Tabelas 5 e 6), verificou-se interação significativa ($P < 0,05$) entre reação dos genótipos e severidade dos isolados de *P. infestans* tanto no bioteste em discos de folha como em folha destacada.

4.3.2.1 Avaliação *in vitro* da severidade de *Phytophthora infestans* em discos foliares de batata

Avaliando-se a reação dos diferentes genótipos inoculados com o isolado A2, foram obtidos quatro grupos de severidade de *P. infestans* (Tabela 5). A cultivar Catucha, com valor de severidade (SEV) *in vitro* de 1,33, agrupou-se ao padrão resistente. Um segundo grupo, com valores de severidade entre 2,60 e 3,26, foi formado pelos clones C2551-2-06, F23-24-06, RM98-23-05 e a cv. Eliza. A cultivar Ana e os clones CL-02-05, C2553-1-06, CL-20-01, cv. Clara, C2572-3-06 e C2550-4-06, com valores de SEV entre 3,86 e 4,33, agruparam-se com a cv. Bintje e formaram um grupo intermediário. E, juntamente com o padrão suscetível Agata, agruparam-se as cvs. Asterix, Bel e Macaca, e os clone C2545-1-06, F189-09-06, F63-01-06, C2573-4-06, C2569-1-06, e C2557-2-06, os quais apresentaram os maiores valores SEV (4,46-5,0).

Quando os mesmos genótipos de batata foram inoculados com o isolado A1 de *P. infestans*, o maior índice de severidade *in vitro* foi verificado na cultivar Asterix (SEV= 4,13) que se agrupou com Agata (padrão suscetível). Valores SEV intermediários (2,40-3,46) foram verificados no agrupamento de 'Bel', 'Ana', 'CL-02-05', F189-09-06, Clara e F63-01-06 com o padrão Bintje. Um grupo maior, composto pelos genótipos 'C2545-1-06', 'Macaca', 'C2573-4-06', 'C2569-1-06', 'C2557-2-06', 'C2553-1-06', 'CL-20-01', 'C2572-3-06', 'C2550-4-06', 'C2551-2-06', 'F23-24-06', 'RM98-23-05', 'Eliza' e 'Catucha', agruparam com o padrão resistente 'CIP-392.617.54', cujos respectivos valores SEV, foram os menores (2,26 -0,60).

Comparando-se a severidade entre os dois isolados, nos diferentes materiais genéticos, observa-se que o isolado A2 foi mais agressiva em 19 dos 24 genótipos

testados; apenas na cv. Agata, Asterix, Bintje, Catucha e no clone CIP-392.617.54 não houve diferença quanto à severidade *in vitro* entre ambos os isolados.

Tabela 5 - Severidade *in vitro* de dois isolados de *Phytophthora infestans* em discos foliares de 24 genótipos de batata. Pelotas/RS, 2014.

Genótipos ¹	Isolado A2 ²	Isolado A1 ³	CV ⁵
	Severidade	Severidade	
Agata**	5,00 Aa ⁴	4,26 Aa	3,52
Asterix	5,00 Aa	4,13 Aa	12,89
Bel	4,86 Aa	3,46 Bb	12,24
C2545-1-06	4,86 Aa	2,26 Bc	10,49
F189-09-06	4,80 Aa	2,93 Bb	22,13
Macaca	4,80 Aa	1,26 Bc	40,38
F63-01-06	4,80 Aa	2,40 Bb	11,17
C2573-4-06	4,80 Aa	1,93 Bc	7,12
C2569-1-06	4,53 Aa	1,46 Bc	3,93
C2557-2-06	4,46 Aa	1,46 Bc	13,50
Ana	4,33 Ab	3,13 Bb	2,72
CL-02-05	4,33 Ab	3,06 Bb	17,19
C2553-1-06	4,13 Ab	1,73 Bc	26,52
CL-20-01-06	4,00 Ab	1,60 Bc	17,24
Clara	4,00 Ab	2,60 Bb	12,76
C2572-3-06	3,93 Ab	1,53 Bc	10,10
Bintje**	3,86 Ab	3,40 Ab	19,64
C2550-4-06	3,86 Ab	1,20 Bc	17,92
RM98-23-05	3,26 Ac	1,46 Bc	15,81
Eliza	3,20 Ac	1,00 Bc	13,47
F23-24-06	2,66 Ac	1,33 Bc	29,44
C2551-2-06	2,60 Ac	0,93 Bc	16,66
Catucha	1,33 Ad	0,66 Ac	29,44
CIP-392.617.54*	1,40 Ad	0,60 Ac	24,49
CV ⁶ (%)	14,29	27,62	

¹Cultivares e clones de batata; ²*P. infestans* do grupo de compatibilidade A2; ³*P. infestans* Grupo compatibilidade A1. ⁴Médias que não diferem pela letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pertence ao mesmo grupo, pelo teste de agrupamento de Scott knott a 5% de probabilidade de erro; ⁵Coeficiente de variação entre as duas populações do patógeno; ⁶Coeficiente de variação dos experimentos; **Padrão suscetível; *Padrão resistente.

4.3.2.2 Avaliação *in vitro* da severidade de *Phytophthora infestans* em folhas destacadas de batata

Verificou-se maior agressividade do oomiceto nos genótipos de batata com a inoculação do isolado A2 do patógeno (Tabela 6).

De acordo com a tabela 6, o submetimento dos diferentes genótipos de batata à inoculação pelo método de folhas destacadas, com o isolado A2 (Tabela 6), resultou em quatro grupos distintos quanto à severidade *in vitro* de *P. infestans*. Os maiores valores de severidade (91-99%) foram observados nas cvs. Macaca, Clara, Ana e Bel, e, nos clones CL-02-05, F63-01-06, C2557-2-06, F23-24-06, RM98-23-05 e F189-09-06, os quais se agruparam com o padrão suscetível 'Bintje'. Um segundo grupo, foi formado pelas cvs. Catucha, Eliza e Asterix, o clone CL-02-01 e o padrão suscetível 'Agata' as quais apresentaram de 67,33 a 79,00% da área foliar lesionada. Um terceiro grupo, com menores valores de severidade (47,33-31,67%) foi formando pelos clones C2569-1-06, C2553-1-06, C2550-4-06, C2545-1-06, C2551-2-06 e C2573-4-06. O clone C2572-3-06, com o menor percentual de área lesionada (20,00%), agrupou-se com o padrão resistente CIP, cujo percentual da área foliar lesionada foi 2,33%.

Conforme anteriormente relatado, os valores de severidade *in vitro*, obtidos com a inoculação do isolado A1, foram inferiores aqueles do isolado A2, cuja variação da área foliar lesionada foi de 0,00 (CIP-392.617.54) a 37,66% (clone F23-24-06). Utilizando-se a metodologia da folha destacada para tal isolado, os genótipos foram separados em apenas dois grupos. O grupo com menores valores de SEV (0,00-13,00%) foi composto pelos genótipos Bel, C2545-1-06, F63-01-06, C2557-2-06, C2572-3-06, C2553-1-06, C2550-4-06, C2551-2-06, Eliza, Catucha e o padrão resistente 'CIP-392.617.54'. Os demais genótipos, com valores SEV de 22,00 a 32,00%, agruparam-se com os padrões suscetíveis Agata e Bintje.

Em relação à agressividade dos isolados nos diferentes genótipos, apenas para os clones C2572-3-06 e CIP-392.617.54, não houve diferença significativa quanto a severidade; já nos demais genótipos de batata testados, maiores valores SEV foram observados com a inoculação do isolado A2 de *P. infestans* (Tabela 6).

Tabela 6 - Severidade *in vitro* de dois isolados de *Phytophthora infestans* em folhas destacadas de 24 genótipos de batata. Pelotas/RS, 2014.

Genótipos ¹	Isolado A2 ²	Isolado A1 ³	CV ⁵
	Severidade	Severidade	
Macaca	99,33 Aa ⁴	21,66 Ba	2,94
Bintje**	98,66 Aa	26,00 Ba	14,41
CL-02-05	97,00 Aa	27,00 Ba	3,02
F63-01-06	97,33 Aa	13,33 Bb	14,74
C2557-2-06	97,00 Aa	12,00 Bb	5,95
Clara	93,66 Aa	21,00 Ba	5,70
Ana	93,66 Aa	21,00 Ba	11,05
F23-24-06	92,66 Aa	37,66 Ba	4,73
RM98-23-05	92,66 Aa	22,00 Ba	24,21
Bel	92,66 Aa	14,33 Bb	18,80
F189-09-06	91,00 Aa	32,00 Ba	23,76
Catucha	79,00 Ab	0,03 Bb	6,55
Eliza	79,00 Ab	0,10 Bb	24,84
CL-20-01-06	76,66 Ab	23,33 Ba	10,80
Asterix	75,00 Ab	31,00 Ba	45,11
Agata**	67,33 Ab	21,00 Ba	27,23
C2569-1-06	47,33 Ac	17,00 Ba	74,89
C2553-1-06	46,00 Ac	6,03 Bb	53,01
C2550-4-06	39,33 Ac	5,00 Bb	78,72
C2545-1-06	37,33 Ac	14,33 Bb	36,34
C2551-2-06	35,00 Ac	0,73 Bb	34,55
C2573-4-06	31,67 Ac	0,00 Bb	41,50
C2572-3-06	20,00 Ad	8,33 Ab	107,56
CIP-392.617.54*	2,33 Ad	0,00 Ab	194,83
CV(%) ⁶	22,75	42,76	

¹Cultivares e clones de batata; ²*Phytophthora infestans* do grupo de compatibilidade A2; ³Grupo compatibilidade A1; ⁴Médias que não diferem pela letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pertence ao mesmo grupo pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade de erro; ⁵Coefficiente de variação entre as duas populações do patógeno; ⁶Coefficiente de variação dos experimentos; **Padrão suscetível; *Padrão resistente.

4.3.2.3 Análise conjunta

Os resultados dos testes *in vitro* em discos de folha e folha destacada permitiram o agrupamento de diferentes grupos de severidade entre os materiais genéticos testados. Porém, uma análise comparativa dos biotestes *in vitro* com os resultados de campo evidenciaram algumas particularidades. Analisando-se os dados dos experimentos a campo e *in vitro* com os isolados dos GC A2 e A1 de *P. infestans*, verificou-se similaridade entre AACPD e severidade da doença para 17

genótipos de batata (70,83%), observando-se correlação positiva entre essas variáveis nas diferentes interações (Tabelas 3, 5 e 6).

Comparando-se os valores de severidade obtidos no bioteste em folha destacada com os resultados de campo, na presença da população A2 do patógeno (Tabela 3 e 5), observou-se correlação positiva ($R=0,71$; $p<0.001$); onde 17 dos 24 genótipos apresentaram respostas semelhantes. E, na comparação entre resultados de campo e discos foliares, para a mesma variável, também observou-se correlação positiva ($R= 0,51$; $p<0.001$), observando-se reações semelhantes em metade dos materiais testados (Tabelas 3 e 6).

Na presença do isolado menos agressivo (A1), também verificou-se correlação positiva na comparação entre severidade da requeima a campo com a metodologia de avaliação *in vitro* de folhas de batata destacadas ($R= 0,66$ $p<0.01$) e discos foliares ($R= 0,66$ $p<0.001$), similarmente à relação observada entre reação a campo e biotestes com o isolado de *P. infestans* A2 nos mesmos genótipos (Tabelas 3,5 e 6).

Analisando-se, ainda, os dados por reação a campo (Tabela 3) e *in vitro* (Tabelas 5 e 6), percebe-se que para o agrupamento de genótipos com reação AR a *P. infestans*, independentemente das metodologias *in vitro* testadas e da população do patógeno, as reações foram semelhantes, havendo uma ótima relação para os genótipos AR na presença do isolado A2 (3:3:2 - campo: disco foliar: folha destacada), e, do isolado A1 (12:12:10 - campo: disco foliar: folha destacada).

No entanto, para as demais comparações, em função das reações a campo (Tabela 3), os índices de severidade variaram com o isolado e o tipo de bioteste. Assim, para os três genótipos com reação MR e R, inoculados com o isolado de *P. infestans* A2, verifica-se uma ótima relação entre teste a campo e folha destacada (3:3), e, uma baixa relação na comparação com o teste em disco foliar (1:3). Da mesma forma, para a cultivar Eliza S e os três clones S ou MS (Tabelas 5 e 6), houve uma boa relação (3:4) entre os resultados a campo e folha destacada para três dos quatro genótipos inoculados com esse mesmo isolado de *P. infestans*; e, uma baixa relação (2:4), ocorreu entre severidade a campo e disco foliar. Já para o agrupamento de genótipos com reação AS houve uma ótima relação (14:12:13) entre reação a campo, disco foliar e folha destacada.

Analisando-se a relação da agressividade do isolado A1 entre o ensaio de campo e os biotestes com disco foliar, verificou-se uma boa relação (2:3) entre os

resultados em dois dos três genótipos R e MR; e, na comparação dos resultados a campo com aqueles do bioteste em folha destacada, em apenas um material genético (1:3), as reações foram semelhantes. Porém, em todos genótipos S e MS, inoculados com o isolado A1, a reação a campo e os índices de severidade pelos métodos do disco foliar e da folha destacada foram semelhantes (8:6:7).

Em trabalhos similares, correlação moderada positiva foi encontrada entre severidade a campo e folha destacada (MICHALSKA, et al., 2011). No entanto, resultados variáveis entre essas duas metodologias de avaliação foram observados por Sharma et al. (2013), onde genótipos de extrema resistência a campo foram identificados como tendo resistência parcial em folha destacada.

A maior severidade do isolado A2 de *P. infestans* em relação ao A1, observada tanto a campo como *in vitro*, está fortemente associada à existência de diferenças na agressividade entre linhagens de *P. infestans* como aquelas reportadas por Danies et al. (2013) e Rojas et al. (2014). Dessa forma, as relações entre metodologias de avaliação e reação a *P. infestans* parecem estar associadas à agressividade do patógeno, e, também, ao agrupamento da resistência caracterizada em campo, conforme observado no presente estudo.

Embora, os biotestes *in vitro* tenham demonstrado uma certa repetibilidade com aqueles de campo, de uma forma geral, a avaliação da severidade, pelo método do disco de folha, resultou em menor coeficiente de variação uma vez que a resposta (severidade) dos genótipos foi mais uniforme em comparação aquela encontrada pelo método de folha destacada. Além disso, a condução de ensaios *in vitro*, pelo método do disco de folha, é mais simples e ocupa menos espaço em laboratório, razões essas que favorecem o seu uso pensando-se na pré-seleção e busca por material genético com resistência a *P. infestans*.

Nesse contexto, a pré-seleção de material genético que possua resistência moderada e alta pode permitir redução do tempo na seleção a campo; e, assim, incrementar essa estratégia no manejo da requeima, quer seja pelo uso direto desses materiais no plantio, quer seja pela utilização dos materiais selecionados resistentes como progenitores em programas de melhoramento de batata. Todavia, o uso de metodologias *in vitro* constitui-se em medida auxiliar na pré-seleção de materiais de batata resistentes a *P. infestans*, sendo necessários testes a campo para confirmar a reação dos genótipos influenciadas pelas condições abióticas do ambiente e isolados do patógeno com níveis de agressividade distintos.

4.3.3 Resistência foliar *in vitro* de acessos silvestres de batata a *Phytophthora infestans*

De acordo com a tabela 7, verificaram-se diferenças significativas quanto ao índice de severidade *in vitro* de *P. infestans* entre os acessos de *Solanum* spp. ($p<0,05$). Quatorze acessos manifestaram apenas necrose foliar ou pequena esporulação de *P. infestans*, apresentando valores de SD<2,5. Entre esses genótipos, sete acessos de *Solanum* spp. comportaram-se de forma semelhante a cv. moderadamente resistente Eliza, com índices de SD variando entre 0,40 e 1,13, resultando somente em necrose foliar. Entre os demais genótipos avaliados, os acessos 61-8, 545, NYL-235-4 e 46-10 apresentaram SD entre 2,73 a 3,13 com 5% a 20% de esporulação do patógeno, e outros nove foram estatisticamente semelhantes ou tiveram índices de severidade superiores ao padrão suscetível 'Agata' com necrose do tecido e esporulação do patógeno entre 5% e 50% da área foliar.

Tabela 7 - Índice de severidade *in vitro* de *Phytophthora infestans* em diferentes acessos de *Solanum* spp. avaliados pelo bioteste de disco foliar. Pelotas/RS, 2014.

Genótipos ¹	SD ²	Genótipos	SD
546 ³	4,47 a	664 ³	2,47 d
676 ³	4,07 a	68-8 ⁴	2,40 d
44-7 ⁴	4,00 a	525 ³	2,27 d
<i>S. calvescens</i>	3,73 b	51-9 ⁴	2,13 d
63-2 ⁴	3,67 b	511 ³	2,13 d
Agata (S)	3,67 b	56-8 ⁴	1,87 e
543 ³	3,40 b	<i>S. chacoense</i> – 68 ⁵	1,13 f
675 ³	3,27 b	126 ⁵	1,07 f
45-4 ⁴	3,27 b	68-16 ⁴	1,00 f
61-8 ⁴	3,13 c	Eliza (MR)	1,00 f
545 ³	3,07 c	55-5 ⁴	0,67 f
NYL-235-4 ³	2,93 c	513 ³	0,60 f
46-10 ⁴	2,87 c	499 ³	0,53 f
Ana	2,73 c	55-7 ⁴	0,40 f

C.V. 16,99%

¹Espécies e acessos de *Solanum* spp; ²SD-Severidade da doença; ³*S. tuberosum* (*S. berthaultii*); ⁴*S. chacoense* ssp. *chacoense*; ⁵*S. chacoense* ssp. *muelleri*; (S) Padrão suscetível; (MR) Padrão moderadamente resistente.

A busca por fontes de resistência a *P. infestans* para introgressão em genótipos comerciais de batata é um processo permanente, devido ao contínuo fluxo genético de populações de *P. infestans*. Espécies de batata silvestre são uma fonte contínua de resistência. Em alguns casos, esses germoplasmas possuem resistência a amplo espectro de isolados além de ser duradoura (VILLAMON et al., 2005; PARK et al., 2009; PANKIN et al., 2011).

Aporte de bons níveis de resistência de espécies silvestres de *Solanum* que tuberizam, tem sido encontrado em progênies obtidas de cruzamentos com batata cultivada (*S. tuberosum*) (GABRIEL et al., 2011). Com base nesses estudos, os acessos silvestres de *S. chacoense* que apresentaram índices de SD somente com necrose foliar ou pouca esporulação do patógeno ($0,40 > SD < 1,13$ e $1,87 > SD < 3,13$), e os acessos de *S. tuberosum* 499, 513, 511, 525, 664 e 545, com ancestralidade de *S. berthaultii* com índice SD ($0,53 > SD < 3,07$), representam uma possibilidade de uso como fontes de resistência a *P. infestans* em programas de melhoramento de batata. No entanto, testes em casa de vegetação e a campo precisam ser realizados para avaliar como a resistência se expressa *in vivo*; assim como também é preciso saber se essa resistência é conferido por genes maiores ou genes menores.

Além do mais, alguns acessos silvestres de *S. chacoense* como '68-16', também apresentam características desejáveis relacionadas à resistência ao nematoide das galhas *M. javanica* (LIMA-MEDINA, 2013), e como fonte de resistência a PVY (*Potato virus Y*) (ASAMA et al., 1982).

A partir desses resultados, pode-se inferir que existem genótipos de batata com resistência alta e moderada a *P. infestans*, identificando-se também fontes de resistência em genótipos de batatas silvestres, o que pode contribuir em programas de melhoramento visando resistência a requeima, e, de uma forma global, no manejo integrado da doença.

4.4 Conclusões

- Existe variabilidade quanto à resistência genética de genótipos de batata a *P. infestans* em condições de campo, havendo interação entre isolados do patógeno e materiais genéticos testados;
- Há correlação positiva entre ensaios a campo e biotestes *in vitro* para avaliação de severidade de *P. infestans* em genótipos batata;
- Existem acessos de batata silvestre no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa com resistência foliar *in vitro* a um isolado complexo de *P. infestans*.

5 Conclusões Gerais

Existe grande diversidade genética e complexidade em populações de *P. infestans* provenientes de batata do Sul do Brasil, incluindo isolados de grupos de compatibilidade distintos (A1, A2, A1A2) e autoférteis e agrupamentos distintos por análise de marcadores microssatélites;

Há evidências que a diversidade de populações de *P. infestans* é mantida pelo fluxo gênico;

Há aumento de insensibilidade de isolados de *P. infestans* ao fungicida sistêmico metalaxyl e não há evidência de insensibilidade ao fungicida protetor clorothalonil;

Existe interação entre resistência de genótipos de batata e agressividade de isolados de *P. infestans* e correlação negativa entre severidade da requeima e produção de tubérculos em condições de campo;

Existem metodologias de avaliação da severidade *in vitro* de *P. infestans* em genótipos de *Solanum* spp. que podem ser utilizadas complementarmente em programas de melhoramento visando resistência ao patógeno, em condições de campo.

Referências

- ABBA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BATATA. Brasil. **Batata show**, n.26, p.5, 2010a.
- ABBA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BATATA. Brasil. **Batata show**, n.28, p.4, 2010b.
- ABBA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BATATA. Brasil. **Batata show**, n.36, p.80, 2013.
- ACUÑA, I.; SAGREDO, B.; GUTIÉRREZ, M.; SANDOVAL, C.; FAHRENKROG, A.; SECOR, G.; RIVERA, V.; MANCILLA, S. Characterization of *Phytophthora infestans* population in Chile. **PPO-Special Report**, n.15, p.145-150, 2011.
- AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em: fevereiro de 2014.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. John Wiley Sons. Inc. New York. 1996.
- AKINO, S.; TAKEMOTO, D.; HOSAKA, K. *Phytophthora infestans*: a review of past and current studies on potato late blight. **Journal of General Plant Pathology**, v.80, n.1, p.24-37, 2014.
- ANDERSON, P. K.; CUNNINGHAM, A. A.; PATEL, N. G.; MORALES, F. J.; EPSTEIN, P. R.; DASZAK, P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. **TRENDS in Ecology and Evolution**, v.19, n.10, p.535-544, 2004.
- ANDRIVON, D.; AVENDAÑO-CÓRCOLES, J.; CAMERON, A. M.; CARNEGIE, S. F.; COOKE, L. R.; CORBIÉRE, R.; DETOURNÉ, D.; DOWLEY, L. J.; EVANS, D.; FORISEKOVA, K.; GRIFFIN, D. G.; HANNUKKALA, A.; LEES, A. K.; LEBECKA, R.; NIEPOLD, F.; POLGAR, Z.; SHAW, D. S.; THOMPSON, J.; TROGNITZ, B.; VAN RAAIJ, H. M. G.; ZIMNOCH-UZOWSKA, E. Stability and variability of virulence of *Phytophthora infestans* assessed in a ring test across European laboratories. **Plant Pathology**, v.60, n.3, p.556-565, 2011.
- ASAMA, K.; ITO, H.; MURAKAMI, N.; ITOH, T. New potato variety “Konafubuki”. **Bull Hokkaido Pref Agr Exp Stn**, v.48, p.75-84, 1982.

BIRCH, P. R. J.; COOKE, D. E. L. The early days of late blight. **eLIFE**, v.2, p.954, 2013.

BROMMONSCHENKEL, S. H.; MATSUOKA, K. Ocorrência do grupo de compatibilidade A2 de *Phytophthora infestans* em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.327, 1986. (Resumo).

BRURBERG, M. B.; ELAMEEN, A.; LE, V. H.; NAERSTAD, R.; HERMANSEN, A.; LEHTINEN, A.; HANNUKKALA, A.; NIELSEN, B.; HANSEN, J.; ANDERSSON, B.; YUEN, J. Genetic analysis of *Phytophthora infestans* populations in the Nordic European countries reveals high genetic variability. **Fungal biology**, v.115, p.335-342, 2011.

CARMO, E. L.; PADUA, J. G.; DIAS, J. P. T.; DUARTE, H. S. S.; DUARTE FILHO, J.; LEONEL, M. Desempenho de cultivares nacionais e estrangeiras de batata em duas condições ambientais do Sul de Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.3352-3358, 2009.

CASA-COILA, V. H.; GOMES, C. B.; PEREIRA, A. S.; ROCHA, D. J. A. Resistência de genótipos de batata (*Solanum tuberosum* L.) a duas populações de *Phytophthora infestans*. In: XXV Congresso de la Asociacón LATinoamericana de la Papa, 2012, Uberlândia. **Anais do XXV Congresso de la Asociacón LATinoamericana de la Papa**. Uberlandia: ALAP, 2012

CHMIELARZ, M.; SOBKOWIAK, S.; DEZBSKI, K.; COOKE, D. E. L.; BRURBERG M. B.; SLIWKA, J. Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland. **Plant Pathology**, v.63, n.1, p.203-211, 2014.

CHOWDAPPA, P.; KUMAR, N. B. J.; MADHURA, S.; KUMAR, M. S. P.; MYERS, K. L.; FRY, W. E.; SQUIRES, J. N.; COOKE, D. E. L. Emergence of 13_A2 blue lineage of *Phytophthora infestans* was responsible for severe outbreaks of late blight on tomato in South-West India. **Journal of Phytopathology**, v.161, p.49-58, 2013.

CLIVE, J. A. **Manual of disease assessment keys for plant diseases**. Canadian Department of Agriculture. 1970, 50p.

COLON, L.; NIELSEN, B. J.; DARSOW, U. **Eucablight protocol – Detached leaf test for foliage blight resistance**. Version 1.2. 2004.

COOKE, D. E. L.; LEES, A. K. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. **Plant Pathology**, v.53, p.692-704, 2004.

COOKE, D. E.L. 2009. **Eucablight protocols for SSR analysis of P. infestans (Draft)**. Disponível em: <<http://www.eucablight.org/EucaBlight.asp>>. Acessado em: abril de 2014.

COOKE, L. R.; SCHEPERS, H. T. A. M.; HERMANSEN, A.; BAIN, R. A., BRADSHAW, N. J.; RITCHIE, F.; SHAW, D. S.; EVENHUIS, A.; KESSEL, G. J. T.; WANDER, J. G. N.; ANDERSSON, B.; HANSEN, J. G.; HANNUKKALA, A.;

NÆRSTAD, R.; NIELSEN, B. J. Epidemiology and integrated control of potato late blight in Europe. **Potato Research**, v.54, p.183-222, 2011.

COOKE, D. E. L.; CANO, L. M.; RAFFAELE, S.; BAIN, R. A.; COOKE, L. R.; ETHERINGTON, G. J.; DEAHL, K. L.; FARRER, R. A.; GILROY, E. M.; GOSS, E. M.; GRU'NWALD, N. J.; HEIN, I.; MACLEAN, D.; MCNICOL, J. W.; RANDALL, E.; OLIVA, R. F.; PEL, M. A.; SHAW, D. S.; SQUIRES, J. N.; TAYLOR, M. C.; VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; BIRCH, P. R. J.; LEES, A. K.; KAMOUN, S. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. **PLOS Pathogens**, v.8, n.10, p.02940, 2012.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 648p.

DANIES, G.; SMALL, I. M.; MYERS, K.; CHILDERS, R.; FRY, W. E. Phenotypic characterization of recent clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. **Plant Disease**, v.97, p.873-881, 2013.

DELGADO, R. A.; MONTEROS-ALTAMIRANO, A. R.; LI, Y.; VISSER, R. G. F.; van der LEE T. A. J.; VOSMAN B. Large subclonal variation in *Phytophthora infestans* populations associated with Ecuadorian potato landraces. **Plant Pathology**, v.62, n.5, p.1081-1088, 2013.

DU, J.; TIAN, Z.; LIU, J.; VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; SHI, X.; XIE, C. Functional analysis of potato genes involved in quantitative resistance to *Phytophthora infestans*. **Molecular Biology Reporter**, v.40, p.957-967, 2013.

DUARTE, H. S. S.; ZAMBOLIM, L.; MIZUBUTI, E. S. G.; PÁDUA, J. G.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; CARMO, E. L.; NOGUEIRA JÚNIOR, A. F. The field resistance of potato cultivars to foliar late blight and its relationship with foliage maturity type and skin type in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v.41, p.139-155, 2012.

EL-GANAINY, S. M.; TOHAMY, A. M. M.; AWAD, M. A.; SQUIRES, J. N.; COOKE, D. E. The population dynamics of *Phytophthora infestans* in Egypt. In: APS-MSA: Joint Meeting, 2013, Austin, Texas. **Abstract...** Texas, 2013. 118p.

EVENHUIS, B.; SPRUIJT, J.; KALKDIJK, J.R.; SPITS, H.G.; SCHEPERS, H.T.A.M. Evaluation of spray strategies to control potato late blight with respect to efficacy, economics and the environment. **PPO Special Report**, n.13, p.83-90, 2009.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Statistical Yearbook: World Food and Agriculture**. Rome, FAO, 2013, 307p.

FLIER, W. G.; TURKENSTEEN, L. J. "Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands." **European Journal of Plant Pathology**, v.105, n.4, p.381-388, 1999.

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**, v.105, n.8, p.998-1006, 2001.

FORBES, G. A.; ESCOBAR, X. C.; AYALA, C. C.; REVELO, J.; ORDOÑEZ, M. E.; FRY, B. A.; DOUCETT, K.; FRY, W. E. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. **Phytopathology**, v.87, p.375-380, 1997.

FORBES, G. A.; ESCOBAR, X. C.; AYALA, C. C.; REVELO, J.; ORDOÑEZ, M. E.; FRY, B. A.; DOUCETT, K.; FRY, W. E. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. **Phytopathology**, v.87, p.375-380, 1997.

FORBES, G. A.; GOODWIN, S. B.; DRENTH, A.; OYARZÚN, P.; ORDOÑEZ, M. E.; FRY, W. E. A global marker database for *Phytophthora infestans*. **Plant Disease**, v.82, p.811-818, 1998.

FORBES, G. A. Using host resistance to manage potato late blight with particular reference to developing countries. **Potato Research**, v.55, p.205-216, 2012.

FRY, W. E.; GOODWIN, S. B.; MATUSZAK, J. M.; SPIELMAN, L.J.; MILGROOM, M.G. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.107-129, 1992.

FRY, W. E.; GOODWIN, S. B.; DYER, A. T.; MATUSZAK, J. M.; DRENTH, A.; TOOLEY, P. W.; SUJKOWSKI, L. S.; KOH, Y. J.; COHEN, B. A.; SPIELMAN, L. J.; DEAHL, K. L.; INGLIS, D. A.; SANDLAN, K. P. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. **Plant Disease**, v.77, n.7, p.653-661, 1993.

FRY, W. E.; GOODWIN, S. B. Resurge of the Irish potato famine fungus. **BioScience**, v.47, n.6, p.363-371, 1997.

FRY, W. Review: Plant diseases that changed the world. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. **Molecular Plant Pathology**, v.9, n. 3, p.385-402, 2008.

FRY, W. E.; MCGRATH, M. T.; SEAMAN, A.; ZITTER, A.; MCLEOD, A.; DANIES, G.; SMALL, I. M.; MYERS, K.; EVERTS, K.; GEVENS, A. J.; GUGINO, B. K.; JOHNSON, S. B.; JUDELSON, H.; RISTAINO, J.; ROBERTS, P.; SECOR, G.; SEEBOLD JR., K.; SNOVER-CLIFT, K.; WYENANDT, A.; GRÜNWARD, N. J.; SMART, C. D. The 2009 late blight pandemic in the eastern United States - causes and results. **Plant disease**, v.97, n.3, p.296-306, 2013.

FRY LAB: biology and management of *Phytophthora infestans*, 2005.

Disponível em: <<http://www.plantpath.cornell.edu/Fry>> Acesso em: janeiro de 2014.

GABRIEL, J.; GALARRETA, J. I. R. DE.; LOPEZ-PARDO, R.; BARANDALLA, L.; ALVARADO, C.; RITTER, E. Short communication. Introgression of late blight (*Phytophthora infestans* L.) resistance from tuber-bearing *Solanum* wild species into

cultivated potato. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.9, n.1, p.193-197, 2011.

GISI, U.; SIEROTZKI, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology**, v.122, p.157-167, 2008.

GISI, U.; WALDER, F.; RESHEAT-EINI, Z.; EDEL, D.; SIEROTZKI, H. Changes of genotype, sensitivity and aggressiveness in *Phytophthora infestans* isolates collected in European countries in 1997, 2006 and 2007. **Journal of Phytopathology**, v.159, p.223-232, 2011.

GOMES, C. B.; PEREIRA, A. da S.; STOCKER, C. M.; BOSENBECKER, V. K. Reação de genótipos de batata a requeima (*Phytophthora infestans*). Embrapa Clima Temperado. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, v.83, 16p. 2009.

GOODWIN, S. B.; COHEN, B.; FRY, W. E. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.11591-11595, 1994.

GOODWIN, S. B.; SUJKOWSKI, L. S.; FRY, W. E. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. **Phytopathology**, v.85, p.669-76, 1995.

GRIFFITH, G. W.; SHAW, d. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4007-4014, 1998.

GROTH, J. V.; ROELFS, A. P. The concept and measurement of phenotypic diversity in *Puccinia graminis* on wheat. **Phytopathology**, v.77, p.1395-1399. 1987.

GUO, J.; van DER LEE, T.; QU, D. Y.; YAO, Y. Q.; GONG, X. F.; LIANG, D. L.; XIE, K. Y.; WANG, X. W.; GOVERS, F. *Phytophthora infestans* isolates from Northern China show high virulence diversity but low genotypic diversity. **Plant Biology**, v.11, p.57-67, 2008.

GUO, L.; ZHU, X.-Q.; HU, C.-H.; RISTAINO, J. B. Genetic structure of *Phytophthora infestans* populations in China indicates multiple migration events. **Phytopathology**, v.100, n.10, p.997-1006, 2010.

HAAS, B. J.; KAMOUN, S.; ZODY, M. C.; JIANG, R. H. Y.; HANDSAKER, R. E.; CANO, L. M.; GRABHERR, M. et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature**, v.461, n.17, p.393-398, 2009.

HAN, M.; LIU, G.; LI, J. P.; GOVERS, F.; ZHU, X.-Q.; SHEN, C. Y.; GUO, L. Y. *Phytophthora infestans* field isolates from Gansu province, China are genetically highly diverse and show a high frequency of self fertility. **The journal of Eukaryotic Microbiology**, v.60, n.1, p.79-88, 2013.

HANS, R. H.; ISELIN, K. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behavior. **Transactions of the British Mycological Society**, v.83, n.3, p.529-530, 1984.

HARRISON, J. G. Effects of the aerial environment on late blight of potato Foliage- a review. **Plant Pathology**, v.41, p.384-416, 1992.

HAVERKORT, A. J.; BOONEKAMP, P. M.; HUTTEN, R.; JACOBSEN, E.; LOTZ, L. A. P.; KESSEL, G. J. T.; VISSER, R. G. F.; van der VOSSEN, E. A. G. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. **Potato Research**, v.51, p.47-57, 2008.

HOHL, H. R.; ISELIN, K. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. **Transactions of the British Mycological Society**, v.83, n.3, p.529-530, 1984.

IBGE- instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acessado em: fevereiro de 2014.

JUDELSON, H.S. Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of the oomycete *Phytophthora infestans*. **Molecular and General Genetics**, v.252, p.155-161, 1996.

KNAPOVA, G.; GISI, U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. **Plant Pathology**, v.51, p.641-653, 2002.

KATO, M.; MIZUBUTI, E. S.; GOODWIN, S. B.; FRY, W. E. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. **Phytopathology**, v.87, n.9, p.973-978, 1997.

KESSEL, G.; SPRUIJT, J.; EVENHUIS, B.; BEKK, P. V.; SCHEPERS, H. Experimental control strategies reducing the fungicide input at a practical scale. **PPO-Special Report**, n.14, p.199-204, 2010..

KIM, H-J.; LEE, H-R.; JO, K-R.; MORTAZAVIAN, S. M. M.; HUIGEN, D. J.; EVENHUIS, B.; KESSEL, G.; VISSER, R. G. F.; JACOBSEN, E.; VOSSEN, J. H.; Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.124, p.923-935, 2012.

LANDEO, J. A. Breeding for Host Resistance. Durable resistance: quantitative/qualitative resistance. **International Potato Center**. Lima. p.29-36. 2002.

LEEN, C. D.; DANIAL, D. L.; VAN WESTEN, C. J. Resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* in the Netherlands. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.89, p.1-20, 1983.

LEES, A. K.; WATTIER, R.; SHAW, D. S.; SULLIVAN, L.; WILLIAMS, N. A.; COOKE, D. E. L. Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. **Plant Pathology**, v.55, p.311-319, 2006.

LI, B.; CHEN, Q.; LV, X.; LAN, C.; ZHAO, J.; QIU, R.; WENG, Q. Phenotypic and genotypic characterization of *Phytophthora infestans* isolates from China. **Journal of Phytopathology**, v.157, p.558-567, 2009.

LIMA-MEDINA, I. **Diversidade de populações de *Meloidogyne* spp. E *Pratylenchus* spp. de diferentes regiões do sul do Brasil produtoras de batata e estudo da patogenicidade em *Solanum* spp.** 2013. 117f. Tese (Doutorado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pelotas, RS. 2013.

LOPES, C. A.; DUARTE, V.; CARVALHO, J. B. *Erwinia* em batata novos nomes, novos e velhos problemas. **Revista Batata Show**, n.27, p.21-23, 2010.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v.24, p.853-863, 2005.

MAFFIA, A. L. **Programa para cálculo de área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) GW-BASIC 3.20.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Fitopatologia. 1986.

MALCOLMSON, J. F.; BLACK, W. Observations on the nature and inheritance of field resistance to *Phytophthora infestans* in potatoes. **American Journal of Potato Research**, v.42, p.305-306, 1965.

MALCOLMSON, J. F.; BLACK, W. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. **Euphytica**, v.15, p.199-203, 1966.

MANTECÓN, J. D. Importance of potato late blight in Argentina, and the effect of fungicide treatments on yield increments over twenty years. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.36, n.1, p.115-122, 2009.

MATUSZAK, J. M.; FERNANDEZ-ELQUEZABAL, J.; VILLARREAL-GONZALES, M. Sensitivity of *phytophthora infestans* populations to metalaxyl in México: Distribution and dynamics. **Plant Disease**, v. 78, p. 911-916, 1994.

MAYTON, H.; SMART, C. D.; MORAVEC, B. C.; MIZUBUTI, E. S. G.; MULDOON, A. E.; FRY, W. E. Oospore survival and pathogenicity of single oospore recombinant progeny from a cross involving US-17 and US-8 genotypes of *Phytophthora infestans*. **Plant Disease**, v.84, p.1190-1196, 2000.

MEIRMANS, P. **Version 2.0b23, Manual. Software for analysis of population genetic data.** 2013. 94p.

Mc DONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p.349-79, 2002.

MICHALSKA, A. M.; ZIMNOCH-GUZOWSKA, E.; SOBKOWIAK, S.; PLICH, J. Resistance of potato to stem infection by *Phytophthora infestans* and a comparison to detached leaflet and field resistance assessments. **American Journal of Potato Research**, v.88, p.367-373, 2011.

MIZUBUTI, E. S. G.; FRY, W. E. Potato late blight. In: COOKE, B. M.; JONES, D. G.; KAYE, B. (Ed.). **The epidemiology of plant diseases**. 2ed. Springer Netherlands, 2006, p.445-471.

NAZARENO, N. R. X.; SCOTTI, C. A.; MAFIOLETTI, R. L.; BOSCHETTO, N. Controle da requeima da batata através do monitoramento das variáveis climáticas. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.2, p.170-174, 1999.

NAZARENO, N. R. X.; JACCOUD FILHO, D. S. Doenças fúngicas. In: PEREIRA, A. S. da; DANIELS, J. (Ed.). **O Cultivo da batata na região sul**. Brasília, 2003, p.239-275

NI, M.; FERETZAKI, F.; SUN, S.; WANG, X.; HEITMAN, J. Sex in Fungi. **Annual Review of Genetics**, v.45, p.405-430, 2011.

NOWICKI, M.; FOOLAD, M. R.; NOWAKOWSKA, M.; KOZIK, E. Potato and tomato late blight caused *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. **Plant Disease**, v.96, n.1, p.4-17, 2012.

NYANKANZA, R. O.; OCEN, M. O.; HANS, C. W.; EL-BEDEWY, R.; KARINGA, J.; OJIAMBO, P. S. Development of tuber blight (*Phytophthora infestans*) on potato cultivars based on in vitro assays and field evaluations. **HORTSCIENCE**, v.43, n.5, p.1501-1508, 2008.

NYONGESA, M.; SHAW, D. S.; WRIGHT, D.; COOKE, L. R. Recombination between recently occurring A1 and A2 isolates of *Phytophthora infestans* in Ireland. **PPO-Special Report**, n.15, p.257-258, 2012.

OLIVEIRA, S. A. S. de. **Molecular epidemiology of potato and tomato late blight in Brazil**. 2010. 92 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, MG. 2010.

ORONA, C. A. L.; MARTÍNEZ, A. R.; ARTEAGA, T. T.; GARCÍA, H. G.; PALMERO, D.; RUIZ, C. A.; PEÑUELAS, C. G. First report of homothallic isolates of *Phytophthora infestans* in commercial potato crops (*Solanum tuberosum*) in the Toluca Valley, Mexico. **Plant Disease**, v.97, n.8, p.1112, 2013.

PÁDUA, J. G. de.; DUARTE, H. S. S.; ZAMBOLIM, L.; CARMO, E. L.; MESQUITA, H. A.; DIAS, J. P. T. Cultivares de batata. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Produção integrada da batata**. Viçosa: Editora UFV, 2011, v.1, p.251-300.

PANKIN, A.; SOKOLOVA, E.; ROGOZINA, E.; KUZNETSOVA, M.; DEAHL, K.; JONES, R.; KHAVKIN, E. Allele mining in the gene pool of wild *Solanum* species for homologues of late blight resistance gene RB/Rpi-blb1. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v.9, n.2, p.305-308, 2011.

PARK, T-H.; FOSTER, S.; BRIGNETI, G.; JONES, J. D. G. Two distinct potato late blight resistance genes from *Solanum berthaultii* are located on chromosome 10. **Euphytica**, v.165, p.269-278, 2009.

PEREIRA, A. S. da; DANIELS, J. **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. 1ed. Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, 547p.

PEREIRA, A. S.; BERTONCINI, O.; CASTRO, C. M.; MELO, P. E. de; MEDEIROS, C. A. B.; HIRANO, E.; GOMES, C. B.; TREPTOW, R. O.; LOPES, C. A.; NAZARENO, N. X. R.; MACHADO, C. M. M.; BUSO, J. A.; OLIVEIRA, R. P.; UENO, B. BRS Ana: cultivar de batata de duplo propósito. **Horticultura Brasileira**, v.28, p.500-505, 2010.

PEREIRA, A. S. da; GOMES, C. B.; CASTRO, C. M.; SILVA, G. O. da . Melhoramento para resistência a oomicetos. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Org.). **Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos**. 1ed. Viçosa: Editora UFV, 2012, v.1, p.25-59.

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**, v.89, p.146-152, 2005.

R : **A language and environmental for statistical computing**. version 3.0.2 (2013-09-25) -- "Frisbee Sailing" Copyright (C) 2013 The R Foundation for Statistical Computing Platform: i386-w64-mingw32/i386 (32-bit).

RAUBER, L. P.; BOFF, M. I. C.; SILVA, Z. da.; FERREIRA, A.; BOFF, P. Manejo de doenças e pragas da batateira pelo uso de preparados homeopáticos e variabilidade genética. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p.1008-1011, 2007.

REIS, A. **Caracterização das populações de *Phytophthora infestans* das regiões Sul e Sudeste do Brasil**. 2001. 76 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, MG. 2001.

REIS, A.; SMART, C. D.; FRY, W. E.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from southern and southeastern Brazil from 1998 to 2000. **Plant Disease**, v.87, p.896-900, 2003.

REIS, A.; RIBEIRO, F. H. S.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Sensitivity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans* to commonly used fungicides in tomato and potato crops. **Plant Disease**, v.89, p.1279-1284, 2005.

RODRIGUES, T. T. M. S.; BERBEE, M. L.; SIMMONS, E. G.; CARDOSO, C. R.; REIS, A.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. **New Disease Reports**, v.22, p.28, 2010.

ROJAS, J. A.; KIRK, W. W.; GACHANGO, E.; DOUCHES, D. S.; HANSON, L. E. Tuber blight development in potato cultivars in response to different genotypes of *Phytophthora infestans*. **Journal of Phytopathology**, v.162, n.1, p.33-42, 2014.

- RUNNO-PAURSON, E.; FRY, W.E.; REMMEL, T.; MÄND, M.; MYERS, K.L. Phenotypic and genotypic characterisation of Estonian isolates of *Phytophthora infestans* in 2004-2007. **Journal of Plant Pathology**, v.92, n.2, p.375-384, 2010.
- SALLES, L. A. Incidência de danos de *Diabrotica speciosa* em cultivares e linhagens de batata. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.2055-209, 2000.
- SANTANA, F. M. **Distribuição e caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary associados à batata (*Solanum tuberosum* L.) na região Sul do Brasil**. 2006. 76 f. (Doutorado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pelotas, RS. 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.
- SCHMITT, J.; KLEINHENZ, B. Distribution of mating types and resistance to metalaxyl of *Phytophthora infestans* in Germany. **PPO-Special Report**, v.15, p.215-222, 2012.
- SHARMA, B. P.; FORBES, G. A.; MANANDHAR, H. K.; SHRESTHA, S. M.; THAPA, R. B. Determination of resistance to *Phytophthora infestans* on potato plants in field, laboratory and greenhouse conditions. **Journal of Agricultural Science**, v.5, n.5, 2013.
- SJÖHOLM, L.; ANDERSSON, B.; HÖGBERG, N.; WIDMARK, A-K.; YUEN, J. Genotypic diversity and migration patterns of *Phytophthora infestans* in the Nordic countries. **Fungal Biology**, v.117, p.722-730, 2013.
- SOUZA-DIAS, J. A. C. de. Broto/batata-semente: um sistema alternativo-racional de produção de (mini) tubérculo-semente em larga escala, livres de vírus e outros patógenos. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Produção integrada da batata**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. v.1. p.165-222.
- SOZZI, D.; SCHWINN, F. J.; GISL, U. Determination of the sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenylamides: a leaf disc method. **EPPO Bulletin**, v.22, n.2, p.306-309, 1992.
- SPIELMAN, L. J.; DRENTH, A.; DAVIDSE, L. C.; SUJKOWSKI, L. J.; GU, W.; TOOLEY, P. W.; FRY, W. E. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*. **Plant Pathology**, v.40, p.422-430, 1991.
- SUJKOWSKI, L. S.; FRY, B. A.; POWEER, R. J.; GOODWIN, S. B.; PEEVER, T. L.; FRY, W.E. Sensitivities of Mexican isolates of *Phytophthora infestans* to chlorothalonil, cymoxanil and metalaxyl, **Plant disease**, v.79, p.1117-1120, 1995.
- TANTIUS, P. H.; FYFE, A. M.; SHAW, D. S.; SHATTOCK, R. C. Occurrence of the A2 mating type and self-fertile isolates of *Phytophthora infestans* in England and Wales. **Plant Pathology**, v.35, n.4, p.578-581, 1986.

TOOLEY, P.W.; SWEIGARD, J.A.; FRY, W.E. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations. *Ecology and Epidemiology*, v. 76, n.11, p.1209-1212, 1986.

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**. 2ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010, p.215-225.

VAN OIJEN, M. Light use efficiencies potato cultivars with late blight (*Phytophthora infestans*). **Potato Research**, v.34, p.123-132, 1991a.

VAN OIJEN, M. Leaf area dynamics of potato cultivars infected by *Phytophthora infestans*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.97, p.345-354, 1991b.

VILLAMON, F. G.; SPOONER, D. M.; ORRILLO, M.; MIHOVILOVICH, E.; PÉREZ, W.; BONIERBALE, M. Late blight resistance linkages in a novel cross of the wild potato species *Solanum paucisectum* (series *Piurana*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.1201-1214, 2005.

WASTIE, R. L. Breeding for resistance. In: INGRAM, D.S.; WILLIAMS, P. H. (Ed.). **Phytophthora infestans: The cause of late blight of potato**. Advances in Plant Pathology, 7. San Diego: Academic Press., 1991, p.193-224.

WIDMARK, A.K.; ANDERSSON, B.; SANDSTRÖM, M.; YUEN, J. E. Tracking *Phytophthora infestans* with SSR markers within and between seasons - a field study in Sweden. **Plant Pathology**, v.60, p.938-945, 2011.

WULFF, E. G.; PÉREZ, W.; NELSON, R. J.; BONIERBALE, M.; LANDEO, J. A.; FORBES, G. A. Identification of stable resistance to *Phytophthora infestans* in potato genotypes evaluated in field experiments in Peru. **Experimental Agriculture**, v.43, p.353-363, 2007.

YUEN, J. E.; FORBES, G. A. Estimating the level of susceptibility to *Phytophthora infestans* in potato genotypes. **Phytopathology**, v.99, p.782-786, 2009.

YOSHIDA, K.; SCHUENEMANN, V. L.; CANO, L. M.; PAIS, M.; MISHRA, B.; SHARMA, R.; LANZ, C.; MARTIN, F. N.; KAMOUN, S.; KRAUSE, J.; THINES, M.; WEIGEL, D.; BURBANO, H. A. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. **eLife**, v.2, p.731, 2013.

ZADOKS, J. C. The potato murrain on the European Continent and the revolutions of 1848. **Potato Research**, v.51, p.5-45, 2008.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S.; OLIVEIRA, S. H. F. de. **Manejo da resistência de fungos a fungicidas**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 168p

ZAMBOLIM, L.; CÁSSIA, R. M.; PICANÇO, M. C.; PÁDUA, J. G. de.; ZAMBOLIM, E. M.; MESQUITA, H. A. de.; LOPES, C. A.; MANTOVANI, E. C.; QUEIROZ, M. E.; MELO, P. C. T. de.; NETO, O. P.; RIBEIRO, J. D. R.; NETO, R. A. E. Produção

integrada: base da sustentabilidade da bataticultura. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Produção integrada da batata**. Viçosa: Editora UFV, 2011, v.1, p.27-129.

ZHU, G-N.; HUANG, F-X.; FENG, L-X.; QIN, B-X.; YANG, Y-H.; CHEN, Y-H.; LU, X-H. Sensitivities of *Phytophthora infestans* to Metalaxyl, Cymoxanil, and Dimethomorph. **Agricultural Sciences in China**, v.7, n.7, p.831-840, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Isolados de *Phytophthora infestans* coletados nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Pelotas/RS, 2014.

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado	Ano ¹	Latitude	Longitude	Altitude	GC ²	Lavoura
1 CANG	Batata	Canguçu/RS	2010	31°17'07"	-52°36'58"	152	A2	1
2 CANG	Batata	Canguçu/RS	2010	31°07'33"	52°28'08"	280	ND*	2
3 CANG	Batata	Canguçu/RS	2010	31°07'23"	52°28'04"	287	ND	3
4 CANG	Batata	Canguçu/RS	2010	31°07'44'	52°26'17"	264	A1	4
1 NP	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010	29°23'05"	51°01'58"	652	A1	5
2 NP	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010	29°23'05"	51°01'58"	652	A1	5
3 NP	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010	29°24'21"	51°03'20"	654	ND	6
4_1	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010	29°23'37"	51°03'38"	615	ND	7
4_2	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010	29°23'37"	51°03'38"	615	ND	7
5 NP	Batata	Nova Petrópolis/RS	2010	29°12'47"	51°03'38"	741	A2	8
8 SMH	Batata	S. M. do Herval/RS	2010	29°29'00"	51°00'44"	670	A2	9
10 MR	Batata	Morro Reuter/RS	2010	29°32'20"	51°03'14"	515	ND	10
11 MR	Batata	Morro Reuter/RS	2010	29°33'08"	51°03'01"	368	ND	11
1 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	29°38'25"	53°35'55"	462	A2	12
2 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	29°37'51"	53°35'38"	458	A2	13
3 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	29°37'42"	53°34'04"	484	A1A2	14
4 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	29°39'11"	53°33'58"	470	A2	15
5 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	29°38'51"	53°32'54"	490	ND	15
6 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	29°38'33"	53°33'00"	478	A2	16
9 SvM	Batata	Silveira Martins/RS	2010	29°44'54"	53°34'39"	87	A2	17
CRI-01(a)	Batata	Cristal/RS	2011	31°02'11"	52°06'16"	64	ND	18
CRI-01(b)	Batata	Cristal/RS	2011	31°02'11"	52°06'16"	64	ND	18
CRI-02	Batata	Cristal/RS	2011	31°02'15"	52°06'17"	66	A1	19

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado	Ano ¹	Latitude	Longitude	Altitude	GC ²	Lavoura
CRI-02(b)	Batata	Cristal/RS	2011	31°02'16"	52°06'18"	66	A1	19
CRI-03	Batata	Cristal/RS	2011	31°02'24"	52°06'54"	46	A2	20
CRI-04(a)	Batata	Cristal/RS	2011	31°02'35"	52°06'51"	62	ND	21
CRI-04(b)	Batata	Cristal/RS	2011	31°02'44"	52°06'50"	77	ND	21
CRI-05(a)	Batata	Cristal/RS	2011	31°02'54"	52°06'49"	80	A1	21
CRI-05(b)	Batata	Cristal/RS	2011	31°02'54"	52°06'49"	80	ND	21
CRI-06	Batata	Cristal/RS	2011	31°03'37"	52°07'57"	115	A2	22
CRI-07(a)	Batata	Cristal/RS	2011	31°03'37"	52°07'57"	115	ND	22
CRI-07(b)	Batata	Cristal/RS	2011	31°03'37"	52°07'57"	115	A2	22
CRI-08(a)	Batata	Cristal/RS	2011	31°05'18"	52°07'39"	111	ND	23
CRI-08(b)	Batata	Cristal/RS	2011	31°05'19"	52°07'39"	111	ND	23
CRI-10	Batata	Cristal/RS	2011	31°04'24"	52°04'45"	80	ND	24
CRIS	Batata	S. L. do Sul/RS	2010	-	-		ND	25
SL-01(a)	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°12'44"	51°56'48"	63	ND	26
SL-01(b)	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°12'44"	51°56'48"	63	A2	26
SL-01(c)	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°12'44"	51°56'48"	63	A2	26
SL-02	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°12'44"	51°56'48"	63	ND	26
SL-03	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°12'44"	51°56'48"	63	A2	26
SL-04(a)	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°10'56"	52°02'40"	55	ND	27
SL-04(b)	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°10'56"	52°02'40"	55	A2	27
SL-04(c)	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°10'57"	52°02'42"	51	ND	27
SL-04(d)	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°10'57"	52°02'42"	51	ND	27
SL-05(a)	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°13'05"	53°05'28"	97	ND	28
SL-05(b)	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°13'05"	53°05'28"	97	A1A2	28
SL-05(c)	Batata	S. L. do Sul/RS	2011	31°13'05"	53°05'28"	97	A1A2	28
EMB-C	Batata	Pelotas/RS	2011	-	-		A2	29
BRCLE	Batata	Pelotas/RS	2011	-	-		A2	30

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado	Ano ¹	Latitude	Longitude	Altitude	GC ²	Lavoura
CAMPO-2	Batata	Pelotas/RS	2011	-	-		A2	31
Pel-02 (a)	Batata	Pelotas/RS	2011	31°36'24"	52°31'48"	213	A1A2	32
Pel-02 (b)	Batata	Pelotas/RS	2011	31°36'51"	52°31'49"	200	A1A2	33
Pel-02 (d)	Batata	Pelotas/RS	2011	31°36'51"	52°31'51"	205	A1A2	34
Pel-02 (e)	Batata	Pelotas/RS	2011	31°36'27"	52°31'50"	231	A1A2	35
Pel-02 (f)	Batata	Pelotas/RS	2011	31°36'25"	52°31'49"	230	A1A2	36
Pel-03	Batata	Pelotas/RS	2011	31°36'20"	52°31'43"	209	A1A2	37
Pel-04	Batata	Pelotas/RS	RS	-	-		ND	38
Pel 05	Batata	Pelotas/RS	RS	-	-		A2	39
Pel 06	Batata	Pelotas/RS	RS	-	-		A1A2	40
Pel 07	Batata	Pelotas/RS	RS	-	-		A1A2	41
Pel -08	Batata	Pelotas/RS	RS	-	-		A1	42
Pel 11	Batata	Pelotas/RS	2013	-	-		A2	44
RG-01	Batata	Rio Grande/RS	2013	-	-		A2	45
IBI-01 (b)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°23'04"	51°35'16"	814	A2	46
IBI-01 (c)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°23'03"	51°35'15"	814	A2	46
IBI-01 (d)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°23'03"	51°35'14"	814	ND	46
IBI-01 (e)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°23'03"	51°35'12"	801	ND	46
IBI-01 (f)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°23'02"	51°35'12"	801	ND	46
IBI-02 (a)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°23'06"	51°35'08"	798	ND	47
IBI-02 (b)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°23'06"	51°35'08"	798	ND	47
IBI-03 (a)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°22'54"	51°36'47"	825	ND	48
IBI-03 (b)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°22'54"	51°36'47"	825	ND	48
IBI-04 (a)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°22'56"	51°36'43"	835	A1	49
IBI-04 (b)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°22'56"	51°36'43"	835	A1	49
IBI-05	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°22'56"	51°36'43"	835	ND	50
IBI-06 (a)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°22'02"	51°44'34"	838	ND	51

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado	Ano ¹	Latitude	Longitude	Altitude	GC ²	Lavoura
IBI-06 (b)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°21'58"	51°44'33"	835	ND	51
IBI-06 (d)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°21'58"	51°44'34"	835	ND	52
IBI-06 (e)	Batata	Ibiraíaras/RS	2011	28°21'59"	51°44'35"	837	ND	52
SJA-03	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°44'20"	50°01'40"	1199	ND	53
SJA-04	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°43'37"	50°02'14"	1204	ND	54
SJA-06	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°43'19"	50°07'56"	1176	ND	55
SJA-07	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°43'20"	50°07'55"	1184	ND	55
SJA-08	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°43'19"	50°07'54"	1193	A1	56
SJA-09	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°44'20"	50°05'48"	1189	ND	57
SJA-10	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°36'59"	49°55'11"	1165	A1	58
SJA-12	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°36'57"	49°55'13"	1185	A1	58
SJA-13	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°36'50"	49°55'06"	1170	A1	58
SJA-14	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°38'25"	49°56'32"	1267	A1	59
SJA-15	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°38'28"	49°56'28"	1221	A1	59
SJA-16	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°38'26"	49°56'32"	1219	A2	60
SJA-17	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°38'23"	49°56'31"	1221	A2	60
SJA-18	Batata	S. J. dos Ausentes/RS	2012	28°38'26"	49°56'18"	1225	ND	61
BJ-01	Batata	Bom Jesus/RS	2012	28°37'15"	50°25'04"	1072	ND	62
BJ-02	Batata	Bom Jesus/RS	2012	28°37'18"	50°25'06"	1079	A2	62
BJ-03	Batata	Bom Jesus/RS	2012	28°37'19"	50°25'09"	1075	A2	62
BJ-04	Batata	Bom Jesus/RS	2012	28°37'16"	50°25'08"	1073	A2	62
BJ-05	Batata	Bom Jesus/RS	2012	28°37'17"	50°25'00"	1075	A2	63
BJ-07	Batata	Bom Jesus/RS	2012	28°36'55"	50°29'41"	1055	A2	64
BJ-08	Batata	Bom Jesus/RS	2012	28°37'04"	50°29'28"	1051	ND	64
SFP-01	Batata	S. F. de Paula/RS	2012	29°22'43"	50°25'14"	921	ND	65
SFP-02	Batata	S. F. de Paula/RS	2012	29°22'42"	50°25'20"	917	ND	65
SFP-03	Batata	S. F. de Paula/RS	2012	29°22'31"	50°25'30"	935	ND	66

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado	Ano¹	Latitude	Longitude	Altitude	GC²	Lavoura
SFP-06	Batata	S. F. de Paula/RS	2012	29°27'40"	50°20'31"	912	ND	67
SFP-07	Batata	S. F. de Paula/RS	2012	29°27'37"	50°20'25"	917	ND	67
SFP-08	Batata	S. F. de Paula/RS	2012	29°27'39"	50°20'26"	920	A2A1	67
SC-08	Batata	Canoinhas/SC	2011	26°11'24"	50°21'58"	784	A2	68
SC-C01	Batata	Canoinhas/SC	2012	26°05'11"	50°23'05"	792	AF**	69
SC-C02	Batata	Canoinhas/SC	2012	26°05'10"	50°23'02"	786	AF	69
SC-C03	Batata	Canoinhas/SC	2012	260508.1	502303.1	780	ND	70
SC-C04	Batata	Canoinhas/SC	2012	260446.0	502350.4	766	AF	71
SC-C07	Batata	Canoinhas/SC	2012	260517.5	503224.8	790	ND	72
SC-C08	Batata	Canoinhas/SC	2012	260518.2	503224.1	785	AF	72
SC-C09	Batata	Canoinhas/SC	2012	261123.3	502148.8	783	ND	73
SC-11	Batata	Itaiópolis/SC	2011	26°24'18"	49°49'27"	892	A2	74
SC-12	Batata	Itaiópolis/SC	2011	26°24'12"	49°49'19"	888	A2	74
SC-12 (1)	Batata	Itaiópolis/SC	2011	26°24'12"	49°49'19"	888	A2	74
SC-15	Batata	Três Barras/SC	2011	26°17'37"	50°07'02"	793	A2	75
SC-16	Batata	São Joaquim/SC	2011	28°16'33"	49°56'40"	1385	ND	76
SC-18	Batata	São Joaquim/SC	2011	28°16'33"	49°56'40"	1385	ND	76
SCSJ6 a1	Batata	São Joaquim/SC	2011	28°16'59"	49°55'23"	1288	ND	77
SCSJ6(b)1	Batata	São Joaquim/SC	2011	28°16'59"	49°55'23"	1288	ND	77
SC-SJ-07	Batata	São Joaquim/SC	2011	28°16'55"	49°18'35"	1350	A1	78
SC-C11	Batata	Major Viera/SC	2012	26°21'31"	50°20'48"	776	A2	79
SC-C12	Batata	Major Viera/SC	2012	26°21'21"	50°20'41"	790	A2	79
MF-01	Batata	Mafra/SC	2012	26°10'01"	49°51'06"	903	A2	80
MF-03	Batata	Mafra/SC	2012	26°10'02"	49°51'07"	900	A2	80
MF-04	Batata	Mafra/SC	2012	26°10'04"	49°51'08"	906	A2	80
MF-05	Batata	Mafra/SC	2012	26°10'06"	49°51'09"	898	AF	80
MF-06	Batata	Mafra/SC	2012	26°10'09"	49°51'05"	889	AF	80

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado	Ano ¹	Latitude	Longitude	Altitude	GC ²	Lavoura
MF-07	Batata	Mafra/SC	2012	26°10'06"	49°51'04"	886	AF	80
SC-03	Batata	São Mateus do Sul/PR	2011	26°01'10"	50°34'51"	762	A1	81
PR-03a	Batata	Pinhão/PR	2011	25°48'16"	51°43'57"	1076	AF	82
PR-03 (b)	Batata	Pinhão/PR	2011	25°48'16"	51°43'57"	1076	A2	82
PR-07 c	Batata	Ponta Grossa/PR	2011	25°12'56"	50°07'55"	847	A2	83
PGR-01	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	25°12'28"	50°07'12"	792	AF	84
PGR-02	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	25°12'27"	50°07'12"	792	AF	84
PGR-03	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	25°12'26"	50°07'11"	792	AF	84
PGR-04	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	25°12'24"	50°07'10"	794	AF	84
PGR-05	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	25°12'34"	50°06'54"	811	AF	84
PGR-06	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	25°12'40"	50°07'01"	816	AF	84
PGR-07	Batata	Ponta Grossa/PR	2012	25°12'56"	50°07'08"	813	AF	84
PR-10	Batata	Castro/PR	2011	24°51'50"	49°53'50"	1016	AF	85
PR-14	Batata	Araucária/PR	2011	25°42'22'	49°23'56"	896	ND	86
PR-15	Batata	Araucária/PR	2011	25°42'22"	49°23'56"	896	A2	86
PR-17	Batata	Araucária/PR	2011	25°44'09"	49°23'41"	899	AF	87
PR-18	Batata	Araucária/PR	2011	25°44'09"	49°23'41"	899	ND	88
PR-20	Batata	Araucária/PR	2011	25°42'25"	49°23'43"	908	A2	89
AR-02	Batata	Araucária/PR	2012	25°44'16"	49°23'37"	918	A2	90
PR-24	Batata	Contenda/PR	2011	25°40'131"	49°29'49"	928	A2	91
CON -1	Batata	Contenda/PR	2012	25°38'49"	49°34'24"	901	AF	92
CON-2	Batata	Contenda/PR	2012	25°38'52"	49°34'26"	899	AF	92
CON-3	Batata	Contenda/PR	2012	25°38'55"	49°34'25"	891	AF	93
CON-4	Batata	Contenda/PR	2012	25°38'52"	49°34'21"	893	AF	93
CON-5	Batata	Contenda/PR	2012	25°38'57"	49°33'28"	907	AF	94
CON-6	Batata	Contenda/PR	2012	25°38'56"	49°33'37"	898	AF	94
CON-8	Batata	Contenda/PR	2012	25°38'59"	49°33'31"	905	AF	94

Isolado	Hospedeiro	Município/Estado	Ano ¹	Latitude	Longitude	Altitude	GC ²	Lavoura
PR-25	Batata	Lapa/PR	2011	25°46'51"	49°45'42"	902	A2	95
PR-26	Batata	Lapa/PR	2011	25°46'51"	49°45'42"	902	A2	95
PR-27	Batata	Lapa/PR	2011	25°46'51"	49°45'42"	902	A2	95
PR-01a	Batata	Palmas/PR	2011	26°29'22"	52°03'19"	1111	AF	96
PR-PL 01	Batata	Palmas/PR	2011	26°19'47"	51°55'10"	1126	A2	97
PR-PL04	Batata	Palmas/PR	2011	26°36'36"	51°39'02"	1257	A2	98
PRPL3(a)	Batata	Palmas/PR	2011	26°33'56"	51°46'29"	1247	A1	99
PRPL03(b)	Batata	Palmas/PR	2011	25°42'25"	49°23'43"	908	A2	99
PR-GU-01	Batata	Guarapuava/PR	2011	25°20'39"	51°40'22"	1043	A2	97
PR-GU-03	Batata	Guarapuava/PR	2011	25°13'43"	51°44'52"	1115	ND*	98
PR-GU-05	Batata	Guarapuava/PR	2011	25°12'36"	51°41'59"	1067	A2	99
CLAR-01	Batata	Campo Largo/PR	2012	25°23'40"	49°29'18"	994	A2	100
CLAR-02	Batata	Campo Largo/PR	2012	25°23'40"	49°29'17"	994	A2	100
CLAR-06	Batata	Campo Largo/PR	2012	25°23'03"	49°28'39"	996	AF**	101
CLAR-07	Batata	Campo Largo/PR	2012	25°23'01"	49°28'38"	999	AF	101
BN-02	Batata	Balsa Nova/PR	2012	25°33'31"	49°36'27"	895	AF	102
TOM-D	Tomate	Pelotas/PR	2010	-	-		A1	103
PR-TOM	Tomate	Araucaria/PR	2011	25°42'25"	49°23'43"	908	A1	104

¹Ano de coleta; ²Grupo de compatibilidade (A1, A2, A1A2), *ND= não determinado, **AF= Autofértil.

APÊNDICE B – Ordem numérica dos isolados de *Phytophthora infestans* utilizados para a análise de Coordenadas principais através de marcadores (SSR). Pelotas/RS, 2014.

Ordem numérica ¹	Isolado	GC ²	Município	Estado\PC ³	Ordem numérica	Isolado	GC	Município	Estado\PC
1	CAMPO2	A2	Pelotas	RS-11	33	PGR-7	Autofértil	Ponta Grossa	PR-12
2	Pel2f	A1A2	Pelotas	RS-11	34	PGR-3	Autofértil	Ponta Grossa	PR-12
3	Emb-c	A2	Pelotas	RS-11	35	PR-01 ^a	Autofértil	Palmas	PR-11
4	10 MR	ND*	Morro Reuter	RS-10	36	CON-2	Autofértil	Contenda	PR-12
5	5 NP	A2	Nova Petrópolis	RS-10	37	PR-17	Autofértil	Araucária	PR-12
6	3 NP	ND	Nova Petrópolis	RS-10	38	PGR-1	Autofértil	Ponta Grossa	PR-12
7	3 SvM	A1A2	Silveira Martins	RS-10	39	PR-27	A2	Lapa	PR-11
8	6 SvM	A2	Silveira Martins	RS-10	40	CON-1	Autofértil	Contenda	PR-12
9	IBI6-d	ND	Ibiraíaras	RS-11	41	PR-10	Autofértil	Castro	PR-11
10	CRI-2	A1	Cristal	RS-11	42	PRGU-5	Autofértil	Ponta Grossa	PR-11
11	BJ-05	A2	Bom Jesus	RS-12	43	MF-07	Autofértil	Mafra	SC-12
12	BJ-03	A2	Bom Jesus	RS-12	44	SC-16	ND	São Joaquim	SC-11
13	SJA-10	A1	São Jose dos Ausentes	RS-12	45	SC-C8	Autofértil	Canoinhas	SC-12
14	1 CANG	A2	Canguçu	RS-10	46	SC-C4	Autofértil	Canoinhas	SC-12
15	SL-5b	A1A2	São Lourenço do Sul	RS-11	47	SC-C2	Autofértil	Canoinhas	SC-12
16	SL-01b	A2	São Lourenço do Sul	RS-11	48	SC-08	A2	Canoinhas	SC-11
17	Pel-05	A2	Pelotas	RS-12	49	SC-11	A2	Itaiópolis	SC-11
18	Pel-6	A1A2	Pelotas	RS-12	50	SC-03	A1	São Mateus do Sul	PR-11
19	4 CANG	A1	Canguçu	RS-10	51	15-SC	A2	Três Barras	SC-11
20	8 SMH	A2	Santa Maria do Herval	RS-10	52	SC-C11	A2	Major Viera	SC-12
21	CLAR-1	A2	Campo Largo	PR-12	53	SC-12-1	A2	Itaiópolis	SC-11
22	PL-3b	A2	Palmas	PR-11	54	151	A2	Santa Maria do Herval	RS-05
23	PR-03-a	Autofértil	Pinhão	PR-11	55	166c	A2	São Jose dos Ausentes	RS-05

Ordem numérica ¹	Isolado	GC ²	Município	Estado\PC ³	Ordem numérica	Isolado	GC	Município	Estado\PC
24	PRGU1	A2	Guarapuava	PR-11	56	96	A2	Santa Maria	RS-04
25	PR-18	ND	Araucária	PR-11	57	89	A2	Silveira Martins	RS-04
26	PR-20	A2	Araucária	PR-11	58	157	A2	S. Francisco de Paula	RS-05
27	PR-3b	A2	Pinhão	PR-11	59	87	A1	Silveira Martins	RS-04
28	BN-02	Autofértil	Balsa Nova	PR-12	60	149	A1	Santa Maria do Herval	RS-05
29	PR-24	A2	Contenda	PR-11	61	68	A1	Morro Redondo	RS-04
30	PL-01	A2	Palmas	PR-11	62	82	A2	Cristal	RS-04
31	CON-8	Autofértil	Contenda	PR-12	63	99	A1	Canguçu	RS-04
32	PGR-2	Autofértil	Ponta Grossa	PR-12					

¹Numeração válida para o estudo de Coordenadas principais; ²GC = Grupo de compatibilidade A1, A2, A1A2, *ND = Não determinado; ³PC= Período de coleta;