

AILTON REIS

**CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE *Phytophthora infestans*
DAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

AILTON REIS

**CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE *Phytophthora infestans*
DAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 11 de abril de 2001

Prof. Luiz Antônio Maffia
(Conselheiro)

Prof. Sérgio H. Brommonschenkel
(Conselheiro)

Prof. Acelino Couto Alfenas

Dr. Carlos Alberto Lopes

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA, representada pelo Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPH), pela oportunidade concedida para eu terminar o curso de Doutorado, após ter me contratado faltando dois anos para o seu término.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo até um ano e meio e Bolsa de doutorado Sanduíche por seis meses.

À FAPEMIG pelo suporte financeiro, parcial, deste trabalho.

Ao professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti pela valiosa orientação e pela amizade.

Ao Dr. William Earl Fry (Cornell University), pela oportunidade de realizar uma parte do trabalho em seu laboratório e pelas valiosas sugestões.

À Dra. Christine D. Smart (Cornell University), pela valiosa ajuda nos trabalhos de caracterização molecular dos isolados de *Phytophthora infestans*.

Ao Professor Luiz Antonio Maffia pela orientação inicial no curso, suporte de laboratório e sugestões no manuscrito.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas por oferecer a estrutura de seu laboratório para que uma parte do trabalho fosse desenvolvida e pelas sugestões no manuscrito.

Ao Renildo (Lab. Patomol) pela ajuda nos trabalhos de isoenzimas com gel de amido.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia pela amizade e boa convivência.

Aos colegas de turma, professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia, pelo apoio e amizade.

Aos colegas Fabiana Helena Ribeiro, Nelson Dias Suassuna, Lylian Perla Diniz, Beatriz Alemonge e Geovana do Carmo pela ajuda nos trabalhos de resistência ao metalaxyl e de virulência.

Às demais pessoas que, de alguma forma, colaboraram com a minha estada em Viçosa e, ou, com este trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
Capítulo I	
CHARACTERIZATION OF <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i> ISOLATES FROM BRAZIL	8
Abstract	8
Introduction.....	9
Material and Methods	11
Results	14
Discussion	16
Acknowledgements	18
Literature Cited	19

Capítulo II

SENSIBILIDADE DE ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i> AO FUNGICIDA METALAXYL	28
Resumo	28
Abstract	29
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	33
2.1. Isolados de <i>Phytophthora infestans</i>	33
2.2. Avaliação da sensibilidade de <i>P. infestans</i> ao metalaxyl	33
2.2.1. Teste do ágar	33
2.2.2. Teste do disco de folha 1	34
2.2.3. Teste do disco de folha – método FRAC	35
3. Resultados	37
3.1. Teste do ágar	37
3.2. Teste do disco de folha 1	38
3.3. Teste do disco de folha – método FRAC	39
4. Discussão	40
5. Referências	44

Capítulo III

DIVERSIDADE E COMPLEXIDADE DE PATÓTIPOS DE <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i> COLETADOS EM CAMPOS DE BATATA E TOMATE DAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL	53
Resumo	53
Abstract	54
1. Introdução	55

2. Material e Métodos	57
3. Resultados	59
4. Discussão	63
5. Referências	67
CONCLUSÕES GERAIS	75

RESUMO

REIS, Ailton, D.S. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2001.
Caracterização das populações de *Phytophthora infestans* das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.
Co-orientador: William Earl Fry. Conselheiros: Luiz Antonio Maffia e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Os eventos de migração de *Phytophthora infestans*, agente etiológico da requeima ou mela do tomateiro e da batateira, trouxeram implicações importantes para o manejo da doença em vários países. Entretanto, pouco se sabe sobre a atual estrutura da população deste patógeno no Brasil. Assim, este trabalho teve como objetivo a caracterização das populações de *P. infestans* das regiões Sul e Sudeste do Brasil, principais regiões produtoras de batata e tomate. Isolados foram coletados e caracterizados para os seguintes marcadores: grupo de compatibilidade, aloenzimas *Gpi* e *Pep*, RFLP do DNA genômico (com a sonda RG₅₇) e haplotipos mitocondriais. Uma parte dos isolados (258) foi submetida a testes de sensibilidade ao fungicida metalaxyl (empregando-se três métodos) e outra parte a testes de virulência em discos de folha de diferenciadoras de raças de *P. infestans* em batata (genes R) e tomate (genes Ph). Todos os isolados de tomate foram do grupo A1 e a maioria (94%) apresentou genótipos 86/100 e

92/100 para *Gpi* e *Pep*, respectivamente; e 81% dos isolados apresentaram *fingerprinting* e haplotipos mitocondriais típicos da linhagem clonal antiga US-1. Os isolados de batata, na sua maioria (87%), eram do grupo A2, apresentavam genótipos 100/100 para *Gpi* e *Pep*, e *fingerprinting* e haplotipos mitocondriais típicos de BR-1. Foram encontrados isolados resistentes, intermediários e sensíveis ao fungicida metalaxyl, tanto na linhagem clonal US-1, quanto em BR-1, em todos os estados das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Foi também encontrada grande diversidade de patótipos nas duas linhagens clonais e nas duas regiões amostradas. Muitos destes patótipos apresentaram alta complexidade. Os isolados da linhagem BR-1 parecem ser adaptados a batateira e os da linhagem US-1 ao tomateiro. Os resultados sugerem que não há ocorrência de reprodução sexuada na população de *P. infestans* amostrada, há grande variação quanto a resistência ao fungicida metalaxyl e quanto a virulência dos isolados.

ABSTRACT

REIS, Ailton, D.S. Universidade Federal de Viçosa, July 2001.
Characterization of the populations of *Phytophthora infestans* from the South and Southeast regions of Brazil. Advisor: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Co-advisor: William Earl Fry. Committee members: Luiz Antonio Maffia and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Several isolates of *Phytophthora infestans* from potato (*Solanum tuberosum*) or tomato (*Lycopersicon esculentum*) were collected in the South and Southeast regions of Brazil from 1998 to 2000. The isolates were analyzed for mating type, allozymes, DNA fingerprinting (RG₅₇ probe), mitochondrial DNA haplotypes, and metalaxyl sensitivity. Tomato isolates were all of A1 mating type, mitochondrial haplotype Ib, and US-1 genotype or some variant within this clonal lineage. Potato isolates were mostly of A2 mating type, mitochondrial haplotype IIa, BR-1 genotype, a new lineage of *P. infestans*. There were isolates resistant to metalaxyl in both clonal lineages. A sample of 258 isolates was tested for metalaxyl resistance using different methodologies. In the agar and in the leaf disc test the percentages of resistant (R), intermediately resistant (I), and sensitive (S) isolates ranged from 24.3 to 35.0%, 35 to 36%, and 29 to 40.7%, respectively. In a different leaf test, using the FRAC protocol most of the 96 isolates were either R (44.8%) or I (51.0%) and only three were S (4.2%). There was no correlation between host or mating type and metalaxyl resistance. Neither it was possible to associate metalaxyl resistance and clonal lineages of *P. infestans*. Analyses

of pathotype diversity and complexity were carried out on 87 isolates of *P. infestans*. Potato clones carrying major genes (R1, R2, R3, R4, R5, R7, R8, R10, and R11) and tomato varieties carrying the *Ph1* and *Ph2* genes were used. Forty three pathotypes were determined, the number of virulence factors varied from 3 to 11 and the most complex pathotypes were found for isolates of the A2 mating type. Higher pathotype diversity within populations was found in the Southeast and in the populations of the year 2000. The less diverse populations had the the most complex pathotypes. High diversity was observed among populations according to Roger's index of diversity. During a decade of the presence of both A1 and A2 mating types, the population of *P. infestans* in Brazil seems to be clonal and host specific. No recombinants were detected. There are isolates resistant to metalaxyl and the population has high virulence diversity.

INTRODUÇÃO GERAL

A batata (*Solanum tuberosum* L.) e o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) são as duas espécies olerícolas mais importantes no Brasil. No ano de 2000, a cultura da batata ocupou uma área de 173.877 ha com uma produção de 2,8 milhões de toneladas e a cultura do tomate uma área de 64.545 ha com produção de 3,3 milhões de toneladas (IBGE, 2000). Tanto a batata quanto o tomate estaqueado são cultivados principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Estas duas culturas estão sujeitas a diversos problemas de ordem fitossanitária, dentre as quais, destacam-se as doenças, principalmente as de origem fúngica.

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary é o agente etiológico da requeima ou mela do tomateiro e da batateira, principal doença destas culturas (Hooker, 1981; Jones *et al.*, 1991). A requeima é altamente destrutiva por colonizar os órgãos aéreos das plantas e disseminar rapidamente no campo (Kurozawa & Pavan, 1997). Esta doença foi relatada em tomate pela primeira vez em 1847, dois anos após a sua descrição inicial sobre batata, conforme sumarizado por Legard *et al.* (1995). Desde então, *P. infestans* tem sido responsável por epidemias severas nas duas culturas (Jones *et al.*, 1991), principalmente em condições de temperaturas amenas e de alta umidade relativa (Bugiani, 1996; Kurozawa & Pavan, 1997). No Brasil, a ocorrência da requeima sobre a cultura da batata, em 1898, foi atribuída a uma introdução de batata-semente, proveniente da Europa (Niederhauser, 1991).

A reprodução assexuada de *P. infestans* resulta na produção de esporângios e zoósporos, e a sexuada, na produção de oósporos (Drenth *et al.*, 1993). Como esta espécie é heterotática com dois grupos de compatibilidade (A1 e A2), a reprodução sexuada ocorre somente quando indivíduos de ambos os grupos de compatibilidade entram em contato. Os oósporos são capazes de sobreviver no solo na ausência de um hospedeiro vegetando (Drenth *et al.*, 1995; Pittis & Shattock, 1994). Até o final dos anos setenta ou início dos oitenta,

apenas no Planalto Central do México eram encontrados os dois grupos de compatibilidade de *P. infestans*. No restante do mundo, a população do patógeno era dominada por uma linhagem clonal, US-1, cujos isolados apresentavam o grupo de compatibilidade A1 (Goodwin *et al.*, 1994).

O conceito de linhagem clonal é importante para o entendimento da dinâmica populacional de *P. infestans*. Uma linhagem clonal é composta pelos indivíduos que tiveram origem, por reprodução assexuada, de um determinado genótipo (Anderson & Kohn, 1995). A descrição inicial de uma linhagem clonal requer um grande número de marcadores genéticos. Em *P. infestans* os marcadores genéticos usados para determinar linhagens clonais incluem grupo de compatibilidade, aloenzimas, resistência ao metalaxyl e marcadores à base de DNA (Fry & Goodwin, 1997).

Estudos de caracterização de populações de *P. infestans* revelaram que as migrações desempenharam um papel importante no histórico dos problemas causados por esse patógeno em tomate e batata. A primeira migração resultou na grande fome da Irlanda em 1845/46 e na distribuição de uma única linhagem do patógeno (US-1) pelos diversos continentes. A segunda migração ocorreu mais recentemente e foi evidenciada com a detecção, na Suíça, de isolados com o grupo de compatibilidade A2 (Hohl & Iselin, 1984). As investigações que se sucederam demonstraram a presença de isolados do grupo A2 em tubérculos de batata originários do Egito (Shaw *et al.*, 1985), na Escócia (Malcolmson, 1985), Alemanha Ocidental (Schöber & Rullich, 1985); Inglaterra e País de Gales (Tantius *et al.*, 1986). Esse grupo já foi detectado na Europa, África, Ásia, Oriente Médio, América do Sul e América do Norte (Fry, *et al.*, 1992; Goodwin, 1997). A presença do grupo de compatibilidade A2 em locais onde ainda não havia sido detectado foi o primeiro indício de que estariam havendo mudanças expressivas nas populações de *P. infestans* fora do México, com conseqüentes mudanças na epidemiologia da doença. Esse fato despertou o interesse de diversos pesquisadores para a dinâmica populacional do patógeno (Fry *et al.*, 1992; Goodwin, *et al.*, 1994). Tem-se observado que a população antiga, pertencente ao grupo A1 e presente antes de 1980, está sendo desalojada por uma

população nova e mais adaptada, que consiste de isolados A1 e A2 (Fry & Goodwin, 1997a). A rapidez da substituição das linhagens antigas pelas novas indica que os novos genótipos são mais adaptados do que os antigos (Chycosky & Punja, 1996; Day & Shattock, 1997; Kato *et al.*, 1997; Miller & Johnson, 2000).

No Brasil, apesar da ocorrência freqüente de *P. infestans* na maioria das áreas produtoras de tomate e batata, pouco se sabe sobre a dinâmica populacional do patógeno. Brommonschenkel (1988) caracterizou isolados obtidos da região Sudeste e do Rio Grande do Sul, mas trabalhou com um pequeno número de isolados e um limitado número de marcadores genéticos. Além disso, não houve continuidade no monitoramento da dinâmica populacional do patógeno, nas condições brasileiras. Pode-se supor que, em função de fatores como migração, mutação, recombinação mitótica e seleção, a população de *P. infestans* tenha sofrido mudanças significativas em sua estrutura.

É importante considerar que populações fúngicas com altos níveis de variação genética podem se adaptar mais rapidamente às condições impostas para o controle da doença, tais como a fungicidas e, ou, a variedades resistentes. O conhecimento da estrutura genética da população de *P. infestans* pode fornecer informações sobre alterações observadas na severidade da doença no campo, possíveis aumentos nas perdas determinadas pela doença, ocorrência antecipada da epidemia no campo, resistência do patógeno a fungicidas e na sua capacidade de causar severas epidemias tanto em tomate quanto em batata (Carter *et al.*, 1990; Oyarzun *et al.*, 1998). Tais informações seriam importantes no desenvolvimento de estratégias mais adequadas de manejo da doença; com subsídios para programas de melhoramento, visando obter variedades resistentes; e programas de controle químico, ajudando na escolha dos produtos e de programas de pulverização mais adequados para cada região e estação de plantio, incluindo sistemas de previsão (Carter *et al.*, 1990; Oyarzun *et al.*, 1998).

Considerando-se o acima exposto, o presente trabalho objetivou caracterizar as populações de *P. infestans* das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Para isso, estabeleceram-se os seguintes subobjetivos:

- 1) Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* das regiões Sul e Sudeste do Brasil;
- 2) Análise da sensibilidade de isolados brasileiros de *P. infestans* ao fungicida metalaxyl;
- 3) Análise da diversidade e complexidade de patótipos de *P. infestans* coletados em campos de batata e tomate das regiões Sul e Sudeste do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.B.; KOHN, L.M. Clonality in soilborne, plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**. 33:369-391, 1995.
- BROMMONSCHENKEL, S.H. Patogenicidade, compatibilidade, citogenética e padrões isoenzimáticos de isolados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary do Brasil. Viçosa-MG: UFV, 1988. 82pp. (Tese de Mestrado em Fitopatologia).
- BUGIANI, R. *Phytophthora infestans*: 150 anni. **Informatore Fitopatologico**. 4:33-40, 1996.
- CARTER, D.A.; ARCHER, S.A.; BUCK, K.W.; SHAW, D.S.; SHATTOCK, R.C. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. **Mycological Research**, 94:1123-1128, 1990.
- CHYCOSKY, C.I.; PUNJA, Z.K. Characteristics of populations of *Phytophthora infestans* from potato in British Columbia and other regions of Canada during 1993 to 1995. **Plant Disease**. 80:579-589, 1996.
- DAY, J.P.; SHATTOCK, R.C. Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. **European Journal of Plant Pathology**. 103:379-391, 1997.
- DRENTH, A.; TURKENSTEEN, L.J.; GOVERS, F. The occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in the Netherlands; significance and consequences. **Netherlands Journal of Plant Pathology**. 99 (Suplement 3):57-67, 1993.

- DRENTH, A.; JANSSEN, E.M.; GOVERS, F. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. **Plant Pathology**. 44:86-94, 1995.
- FRY, W.E.; GOODWIN, S.B.; MATUSZAK, J.M.; SPIELMAN, L.J.; MILGROOM, M.G. Population genetics and continental migrations of *Phytophthora infestans*. **Annual Review of Phytopathology**. 30:107-129, 1992.
- FRY, W.E.; GOODWIN, S.B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. **Plant Disease**. 87:1349-1357, 1997.
- FRY, W.E.; GOODWIN, S.B. Resurgence of the Irish potato famine fungus. **BioScience**. 47:363-371, 1997a.
- GOODWIN, S.B.; COHEN, B.A.; FRY, W.E. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. **Proceedings of National Academy of Science USA**. 91:11591-11595, 1994.
- GOODWIN, S.B. The population genetics of *Phytophthora*. **Phytopathology**. 87:462-473, 1997.
- HOHL, H.R.; ISELIN, K. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behavior. **Transactions of the British Mycological Society**. 83:529-530, 1984.
- HOOVER, W.J. **Compendium of Potato Diseases**. St. Paul: APS Press, 1981. 125pp.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro: IBGE. 2000.
- JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. **Compendium of Tomato Diseases**. St. Paul, APS, 1991. 100pp.
- 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**. 87(9): 973-978, 1997.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; RESENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia. Vol.II, Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, CERES, cap.64, 1997. p.690-719.

- LEGARD, D.E.; LEE, T.Y.; FRY, W.E. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: aggressiveness on tomato. **Phytopathology**. 85: 1356-1361, 1995.
- MALCOLMSON, J.F. *Phytophthora infestans* A2 compatibility type recorded in Great Britain. **Transactions of the British Mycological Society**. 85:531, 1985.
- MILLER, J.S. & JOHNSON, D.A. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions. **Phytopathology** 90: 220-227. 2000.
- NIEDERHAUSER, J.S. *Phytophthora infestans*: The Mexican connection. In: LUCAS, J.A.; SHATTOCK, R.C.; SHAW, D.S.; COOKE, L.R. (Eds.). **Phytophthora**: Cambridge, Mycological Society by Cambridge University. 1991. p.25-45.
- OYARZUN, P.J.; POZO, A.; ORDOÑEZ, M.E.; DOUCETT, K.; FORBES, G.A. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. **Phytopathology**. 88:265-271, 1998.
- PITTIS, J.E.; SHATTOCK, R.C. Viability, germination and infection potential of oospores of *Phytophthora infestans*. **Plant Pathology**. 43:387-396, 1994.
- SCHÖBER, B. & RULLICH, G. Oosporen bildung von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. **Potato Research**. 29:395-398, 1986.
- SHAW, D.S.; FYFE, A.M.; HIBBERD, P.G.; ABDEL-SATTAR, M.A. Occurrence of the rare A2 mating type of *Phytophthora infestans* on imported Egyptian potatoes and the production of sexual progeny with A1 mating types from the UK. **Plant Pathology**. 34:552-556, 1985.
- 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**. 35:578-581, 1986.

Capítulo I

CHARACTERIZATION OF *PHYTOPHTHORA INFESTANS* ISOLATES FROM SOUTH AND SOUTHEAST BRAZIL

ABSTRACT

Twelve years after the first survey of the population of *Phytophthora infestans* in Brazil, several potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) isolates of the pathogen were collected in the South and Southeast regions of Brazil in 1998. The isolates were analyzed for mating type, allozymes, DNA fingerprinting (RG₅₇ probe), mitochondrial DNA haplotypes and metalaxyl sensitivity. Tomato isolates were all of A1 mating type, mitochondrial haplotype Ib, and US-1 genotype or some variant within this clonal lineage. Potato isolates were mostly of A2 mating type, mitochondrial haplotype IIa, BR-1 genotype, a new lineage of *P. infestans*. One variant within BR-1 lineage was frequently sampled. Metalaxyl resistance was detected with higher frequency in tomato isolates than in potato isolates. During a decade of the presence of both A1 and A2 mating types, the population of *P. infestans* in Brazil seems to be clonal and host specific. No recombinants were detected.

INTRODUCTION

The oomycete *Phytophthora infestans* is the causal agent of late blight, one of the most important diseases of potato and tomato crops worldwide (28, 29). In Brazil the disease is especially important in the South and Southeast regions where most potato and fresh market tomato crops are grown. In some areas of these regions the weather conditions favor disease development almost all year round. The pathogen is a heterothallic species with two mating types, A1 and A2 (18). Oospores, that result from sexual reproduction, can play an important role in the epidemiology of late blight. Oospores can serve as survival structures (10, 47) and progeny derived from them could generate genetically new genotypes which are epidemiologically important (19).

Until the end of 1970's the population of *P. infestans* was probably clonal because of the widespread occurrence of isolates of the A1 mating type only – “old” population (21). Isolates of the A2 mating type were found only in the Toluca Valley in central Mexico, the center of origin and diversity of this oomycete (24, 42). The old population of *P. infestans* was composed of only one genotype, denominated US-1. Isolates of the A2 mating type were first reported in Switzerland in 1984 (27) and afterwards in many other countries (15, 17), including Brazil (2).

The presence of A2 mating type out of the Toluca Valley increased the concern of plant pathologists regarding the population genetics of *P. infestans* (4, 6, 9, 12, 15, 21, 32, 48, 50). Some characteristics of the new A1 and A2 isolates in North America and Europe are greater virulence and/or aggressiveness on both potatoes and tomatoes and resistance to the systemic fungicide metalaxyl (7, 23, 30, 33, 40). These characteristics among others yet to be revealed could have contributed to the displacement of the old population of *P. infestans* by the new one (7, 16, 31).

Knowledge of pathogen population structure can provide a better understanding of late blight epidemiology (12, 39), enhancing disease management strategies (14, 35), and can be useful to plant breeders interested in

disease resistance (13, 39). Many genetic markers have been used for population genetic studies of plant pathogens (14, 38, 39). The most utilized for *P. infestans* are the mating-type, two allozymes genotypes, Glucose-6-phosphate-isomerase (Gpi) and Peptidase (Pep), fingerprinting of genomic DNA (RG₅₇ probe), mitochondrial DNA, specific virulence to Ph and R genes, and metalaxyl resistance (12,15,16).

Studies carried out more than a decade ago (3) have shown low diversity in Brazilian isolates of *P. infestans* (3, 21). At that time two major clonal lineages were identified, US-1 and BR-1 (21). The US-1 genotype in Brazil had two variants, US-1.1 with 86/100 and 100/100 genotypes for Gpi and Pep, respectively, and US-1.7 with 100/100 and 92/100 genotypes for Gpi and Pep, respectively, (21). However, these studies were conducted with a relatively small number of isolates collected from 1984 to 1987. Furthermore, DNA fingerprinting analysis were done on only one isolate each of A1 and A2 mating types (21).

A more detailed analysis of the population of *P. infestans* would be of interest from both the basic and applied scientific perspectives. The basic scientific question is related to pathogen population dynamics in a continuous cropping system. In some regions of Brazil up to three crops of potatoes and tomatoes are grown throughout the year, which would be roughly equivalent to three years of host-pathogen interaction in temperate climates where usually only one growing season is possible. From the applied perspective, it would be important to determine the geographical distribution of A1 and A2 isolates, if there is still host specificity, and the frequency and distribution of metalaxyl resistant isolates. Thus, the purpose of this study was to characterize the current populations of *P. infestans* in South and Southeast Brazil, and to have a better insight on the population structure of this plant pathogen.

MATERIAL AND METHODS

***Phytophthora infestans* isolates.** Potato and tomato leaves, fruits, or tubers with typical late blight symptoms were collected from fields in the major potato and fresh tomato producing regions of Brazil, from January to October of 1998. Samples from universities and experimental research stations from different states of Brazil were also obtained. Depending on the quality of the sample, isolation was performed either directly on selective culture medium or using tomatoes or potatoes as baits with later transferring to culture media (11, 12). Isolates in pure culture were grown on Rye-B culture media (5), at 18°C in the dark.

Characterization of isolates. Mating type, genotypes at the *Gpi* and *Pep* loci, genomic DNA RFLP fingerprinting using the RG₅₇ probe, mitochondrial DNA haplotype, and metalaxyl resistance were determined. All isolates were analyzed for mating type, but a subset of the total sample was analyzed for other markers.

Mating type. Isolates were paired with known A1 (US-1) and A2 (US-8) tester isolates on 10% clarified V8 juice agar (45). Mycelial plugs (8mm diameter) of the known A1 or A2 isolate were placed 7cm apart from each other on a 90mm Petri plate. A strip (5-6mm width x 4-5cm length) of culture medium containing mycelial growth of a 7 to 10 day-old isolate was placed in the center of the plate, between the two discs. The plates were transferred into an incubator at 18°C in the dark. After incubation for 3 to 4 weeks, plates were checked microscopically for the presence of oospores where mycelia of the known and unknown isolates intermingled. Isolates that produced oospores when paired with the A1 tester isolate but did not produce oospores with the A2 isolate were designated A2. Isolates that formed oospores when paired with the A2 tester and did not form when paired with the A1 isolate were designated A1. The mating type of 233 unknown isolates was determined.

Allozymes. Mycelia from 7 to 10 day-old colonies grown on rye-B agar (A1 isolates) or pea agar (A2 isolates) were used for allozyme profile analysis. The Glucose-6-phosphate-isomerase (*Gpi*) and Peptidase (*Pep*) loci were determined

using cellulose-acetate electrophoresis (22). Allozyme alleles were designated by the numbers representing their percent mobility relative to previously established standards (21). One hundred and thirteen isolates were analyzed for Gpi (67 from tomato and 46 from potato) and 112 for Pep (67 from tomato and 45 from potato).

RFLP (RG₅₇). The RFLP analysis using RG₅₇ probe was carried out on 94 isolates using the methodology described by Goodwin et al. (20). The pathogen was grown in pea broth supplemented with CaCO₃ for 15 days at 18°C, the mycelium was filtered through filter paper on a Buchner funnel, frozen at -80 °C, and lyophilized overnight. For DNA extraction, 35mg of ground, lyophilized tissue was mixed with 1.0ml of extraction buffer (10ml of 0.5M EDTA; 10ml of 1M Tris pH 8.0; 16.6 ml of 3M NaCl; 0.7 ml of beta mercaptoethanol; and 1.25 ml of 20% SDS and distilled water for a volume of 100ml) . The suspension was vortexed and incubated at 65°C for 1 hour when 333µl of 5M potassium acetate was added, vortexed and placed on ice for 20 min. Samples were microfuged on high (4,000 rpm) for 10 min. The supernatant was transferred to a clean 2.2 ml microfuge tube where 800 µl of cold isopropanol was added. The tubes were inverted several times for mixing and incubated on ice for 30min. Samples were microfuged on high speed for 10min, the supernatant discarded and the pellets were dried in the speed vac for 10 min. The DNA pellet obtained was resuspended in 500µl of TE buffer. The DNA was purified with 1x 800µl 25:24:1 phenol: chloroform: isoamil alcohol and 1x 800µl 24:1 chloroform: isoamil alcohol. The DNA was precipitated with one-tenth volume of sodium acetate and 2 volumes of 95% ethanol. To collect the DNA the tubes were centrifuged for 2 min; then the pellets were dried briefly, washed in cold 70% ethanol, and resuspended in 50ml of TE buffer. For each isolate, approximately 2µg of DNA was digested with the restriction enzyme *EcoRI* according to the manufacturer's directions. Gel electrophoresis was performed in 0.8% agarose gels plus ethidium bromide. Alkaline blotting to Hybond-N⁺ nylon membrane, hybridization with non-radioactive RG₅₇ probe, and autoradiography were all according with the manufacturer's instructions (Renascence Kit, NEN Life

Science, Boston, MA) and standard protocols (44). The DNA fingerprintings of the isolates were determined by comparing their patterns with those of the three reference isolates (US-1, US-8, and US-17).

Mitochondrial haplotypes. Based on nuclear DNA data, a subset of 41 isolates was chosen for analysis of mitochondrial DNA. The four known mitochondrial haplotypes of *P. infestans* (4) were determined using three different primer sets: (F1 = 5'-GCAATGGGTAAATCGGCTCAA-3' and R1 = 5'-AAACCATAAGGACCACACAT-3', F2 = 5'-TTCCCTTTGTCTCTACCGAT-3' and R2 = 5'-TTACGGCGGTTTAGCACATACA-3'; F4 = 5'-TGGTCATCCAGAGGTTTATGTT-3' and R4 = 5'-CCGATACCGATACCAGCACCAA-3') according to Griffith and Shaw (26). One aliquot of 0.3µl of the previously extracted DNA was mixed with 10µl of PCR buffer, 10µl of MgCl₂, 2µl of dNTP's, 2µl of primer R (10µM), 2µl of primer F (10µM), and 2µl of Taq polymerase. The mixture was brought to a total volume of 100µl with distilled sterilized H₂O and amplified in a thermal cycler machine with a hot start of 90s (90°C) followed by 40 cycles of 30 sec (90°C), 30 sec (55°C) and 1:30m (72°C). The amplified PCR product (35µl) was digested with 2.5µl of the corresponding restriction enzyme. Enzyme complementary buffer (Table 2) was added at 2.5µl/35µl PCR product. The mixture was incubated for 3h or overnight at 37°C. The digested product was run on a 2% agarose gel (in TAE) at 90V, stained with ethidium bromide, visualized under UV radiation, and photographed. The mitochondrial haplotypes of tested strains were determined by comparing their patterns to reference isolates US-1 (Ib) and US-8 or US-17 (IIa).

Metalaxyl resistance. Metalaxyl resistance of 122 isolates was estimated based on radial growth on metalaxyl-amended rye-B agar, as described elsewhere (8, 12, 23, 36, 49, 50). A mycelial plug, 8mm diameter from a 7-day old colony was placed on the center of a Petri plate containing rye-B amended with 5 or 100ppm metalaxyl, prepared from Ridomil 2E. Control plates were rye-B medium with no metalaxyl (0ppm). Two replicates of each metalaxyl concentration for each isolate were used. Plates were maintained at 18°C in the dark. Colony diameter was measured after 14 days, when the diameter of the colony grown at 0 ppm concentration was at least 30mm. The diameter of the

colony was corrected by subtracting 8mm of the mycelial plug. The mean colony diameters at 5 and 100ppm of metalaxyl were divided by the mean colony diameter on the control plates to determine the relative growth. Isolates that grew less than 40% of the control on 5 and 100ppm metalaxyl plates were scored as sensitive. Isolates that grew more than 40% of the control on 5ppm and less than 40% on 100ppm metalaxyl medium were scored as intermediately resistant. Isolates that grew more than 40% of the control on both 5 and 100ppm of metalaxyl were scored as resistant (50). The entire experiment (122 isolates) was repeated once and the mean of all trials is presented in the results.

RESULTS

A total of 249 isolates of *P. infestans* from single lesions on diseased tomato foliage and fruits or potato foliage or stems, from 67 different fields were obtained. Tomato isolates comprised 60% of the total number of isolates and potato isolates 40% of the total. Of the 67 fields, 25 were cultivated with potato and 42 with tomato (Table 1). Both A1 and A2 mating types were detected among Brazilian isolates of *P. infestans* collected during 1998. All tomato isolates were of the A1 mating type and most potato isolates (87%) were of the A2. Of the 67 tomato isolates analyzed for Gpi and Pep, 63 (94 %) had the allozyme genotype of the US-1 clonal lineage (86/100 and 92/100). Three isolates (4.5%), were 86/100 for Gpi and 100/100 for Pep, similar to US-1.1 lineage. One additional genotype, Gpi and Pep 100/100, was detected in one tomato field from Minas Gerais State. The isozyme profile of the potato isolates was 100/100 for both Gpi and Pep, similar to the previously reported lineage BR-1. Some potato isolates (9%), from the Horticulture Experimental Area of Universidade Federal de Viçosa, were of A1 mating type, 86/100 for Gpi and 92/100 for Pep, respectively, similar to the US-1 genotype. Two potato isolates from the same area were A1, and had 86/100 and 100/100 for Gpi and Pep, respectively (Table 3). The results of the DNA fingerprinting analysis of 93

isolates (39 from potato and 54 from tomato) agreed with allozyme analyses and revealed a very uniform structure of the population of *P. infestans* in Brazil. All tomato isolates seemed to belong to the old clonal lineage US-1, with some variants differing in only one locus (band 9 or 10). Some potato isolates belonged to the clonal lineage BR-1 (20), but many isolates belonged to one possible variant missing band number 22 (Figure 1). Few potato isolates, from Viçosa-MG, had RFLP pattern similar to the tomato isolates (Table 3). Among the 93 isolates tested, there were five distinct RG₅₇ banding pattern that differed by one to five RFLP loci (Table 3).

Only two mitochondrial DNA haplotypes were found among the Brazilian isolates of *P. infestans* tested. The mt-DNA of all A1 isolates had the Ib haplotype, typical of the US-1 clonal lineage. The A2 isolates had the haplotype IIa, typical of the newly introduced lineages.

More than half of the isolates (67,0%) were ranked as either intermediately resistant or resistant to metalaxyl. Out of 82 resistant isolates, 54 (52.2%) were resistant and 28 (22%) were intermediately resistant to metalaxyl (Figure 2). Metalaxyl resistance was more frequently found among tomato isolates than among potato isolates (Figure 2).

Two *P. infestans* genotypes, not previously described, were denominated as US-1.9 and BR-1.1, according to the criteria proposed by Goodwin *et al.* (21). The US-1.9 differed from the US-1 because of the Pep pattern (100/100 instead of 86/100) and for missing band number 9 in the RFLP assay. The BR-1.1 did not have band 22 on the fingerprinting profile with RG₅₇ probe.

A total of 9 multilocus genotypes, based on combinations of the markers (Mating type, Gpi, Pep, mt-DNA and RG₅₇) were identified. From these, two genotypes were found on both hosts (US-1 and US-1.4), four genotypes were found associated with tomatoes (US-1.1, US-1.2, US-1.3, and RU-1) and three genotypes with potatoes (BR-1, BR-1.1, and US-1.9).

DISCUSSION

More than a decade after the first detection of isolates of the A2 mating type of *P. infestans*, isolates of both mating types can be found widespread in south and southeast Brazil. Therefore, there is chance for sexual reproduction of this plant pathogen. However the assessed Brazilian population of *P. infestans* has a clonal structure. A2 isolates were always collected from potato plants, while A1 isolates seem to be specific to tomato plants. Therefore there is a strong host specificity of the lineages of *P. infestans* in Brazil. Few A1 isolates were found on highly susceptible potato plants ('Bintje' and 'Monalisa') collected in a region where potato is not grown commercially, but tomato is. In this traditional tomato growing area, the A1 isolates infecting potatoes most likely came from tomato plants due to the high amount of inoculum available.

According to the results of mating type test, allozymes, and DNA markers, tomato isolates of *P. infestans* in Brazil belong to US-1 lineage and some variants. This lineage remains infecting tomato plants probably because a tomato aggressive lineage was not introduced or because newly introduced lineages were suppressed with chemical control. *P. infestans* can be dispersed by tomato seeds (1). If there is relevant trade of tomato seeds with other countries seed treatment with fungicide would reduce the chances of pathogen establishment in the growing areas. Until recently most of the seeds used by tomato growers have been produced in Brazil. Another explanation for the host specificity of US-1 on tomatoes is related to differential fitness of the new lineage BR-1, i.e. aggressive on potatoes but not on tomatoes. Complementary to this hypothesis, the US-1 lineage could be more adapted to tomatoes.

The clonal lineage BR-1 was probably introduced in Brazil through seed potatoes imported from Europe. There is considerable trade of potato seeds with The Netherlands where sexual recombination can occur and the population of *P. infestans* is highly diverse (9). The 100/100 Gpi and Pep patterns found in BR-1 is common in European population of *P. infestans* (9, 15). The spread of the BR-1 lineage to other potato producing areas could have been through potato seeds and/or market potatoes. The US-1 lineage could have been the dominant

lineage on potatoes in Brazil before the introduction of the A2 isolates. Possibly the old population on potatoes was displaced by new A2 genotypes of *P. infestans* once this is a phenomenon reported in other countries (7, 12, 31,34, 46).

Some variation on the known profiles of allozymes and RG₅₇ was found within the US-1 lineage. Variants of US-1 differed in one or two enzyme profiles, for one enzyme and one RFLP band multilocus genotype, and by one RFLP band in the DNA fingerprinting analysis. Some of these US-1 variants were also observed by Goodwin *et al.* (21, 25). These variations could have resulted by mutation or mitotic recombination (parasexualism). Probably, the US-1 variants were not detected in previous surveys in Brazil because they did not occur before, because the small sample size, or simply because DNA fingerprinting marker was not used previously. Interestingly, the US-1.7 genotype detected by Goodwin *et al.* (21) was not found in this study. However, only one A1 isolate from Rio Grande do Sul State, the region where US-1.7 was originally isolated, was characterized.

An isolate similar to the RU-1 lineage previously found in Russia and Rwanda (21) could have originated in Western Europe and migrated to Eastern Europe and then to Brazil. It seems to be a variant of US-1; but it also could have originated from this lineage by means of mutation or mitotic recombination in two loci, Gpi and Pep. It could also have originated by mutation or mitotic recombination in those countries.

All isolates of *P. infestans* of the A1 mating type had mt-DNA haplotype Ib. This mitochondrial haplotype is typical of the old lineage US-1 (4, 26) and supports the hypothesis that the other A1 isolates differing from US-1 in one or two loci are variants from this lineage and must have arisen by mutation or mitotic recombination. The isolates of the A2 mating type had the IIa mt-DNA haplotype, typical of the new lineages, introduced after 1980 (26).

In this study, a high percentage of US-1 isolates (72.2%) were resistant or intermediately resistant to metalaxyl, while most of the BR-1 isolates (44.4 %) were sensitive. This observation differs from results obtained in United States

(17) and Ecuador (12), where most of the isolates from the old lineage (US-1) are metalaxyl sensitive and most of the new lineage isolates, are metalaxyl resistant. Excessive and inadequate usage of metalaxyl on tomato crops is not uncommon in many growing areas and could have contributed to the higher frequency of isolates resistant to metalaxyl in tomato than in potato crops.

In spite of the presence of both A1 and A2 mating type of *P. infestans* in Brazil for at least 13 years, the data collected in this study brought no evidence of sexual reproduction. The population structure remains clonal as observed by Brommonschenkel (3). Some possible hypothesis for this fact are: *i.* The lack of sexual reproduction is probably due to the high host specificity of two clonal lineages, as is the case in Ecuador (43). This characteristic makes the chance of both mating types coming together a very rare event. *ii.* If both A1 and A2 are present and mate, the oospores are not viable as observed by Mosa et al. (41) in Japan; and *iii.* If oospores could be produced and germinate, the resulting progeny has been less adapted than the relative strains and it could not be fixed as observed by Mayton *et al.* (37). New studies are being carried out to test some of these hypotheses.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to CAPES-Brazil and FAPEMIG for partially supporting this research. We are also grateful to EMATER-MG and EMATER-SC for helping with some samples collecting. Thanks to Dr. Cesar Bauer Gomes (Embrapa Clima Temperado) for providing isolates and to Fabiana H. S. Ribeiro for helping with the metalaxyl resistance work.

LITERATURE CITED

1. Boyd, O.C. 1935. Evidence of seed-borne nature of late blight (*Phytophthora infestans*) of tomatoes. *Phytopathology* 25: 7.
2. Brommonschenkel, S.H. and Matsuoka, K. 1986. Ocorrência do grupo A² de *Phytophthora infestans* em Minas Gerais. *Fitopatol. Bras.* 11:327. (abstract).
3. Brommonschenkel, S.H. 1988. Patogenicidade, compatibilidade, citogenética e padrões isoenzimáticos de isolados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary do Brasil. MS Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brazil.
4. Carter, D.A., Archer, S.A., Buck, K.W., Shaw, D.S. and Shattock, R.C. 1990. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. *Mycol. Res.* 94:1123-1128.
5. Caten, C.E. and Jinks, J.L. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans* I. Cultural variation. *Can. J. Bot.* 46:329-348.
6. Chycosky, C.I. and Punja, Z.K. 1996. Characteristics of populations of *Phytophthora infestans* from potato in British Columbia and other regions of Canada during 1993 to 1995. *Plant Dis.* 80:579-589.
7. Day, J.P. and Shattock, R.C. 1997. Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *Eur. J. Plant Pathol.* 103:379-391.
8. Deahl, K.L., Inglis, D.A. and DeMuth, S.P. 1993. Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* isolates from Northwestern Washington. *Am. Potato J.* 70:779-795.
9. Drenth, A., Turkensteen, L.J. and Govers, F. 1993. The occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in the Netherlands; significance and consequences. *Neth. J. Plant Pathol.* 99(Supplement 3):57-67.
10. Drenth, A., Janssen, E.M. and Govers, F. 1995. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathol.* 44:86-94.
11. Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, St. Paul, MN.

12. Forbes, G.A., Escobar, X.C., Ayala, C.C. Revelo, J., Ordoñez, M.E., Fry, B.A., Doucett, K. and Fry, W.E. 1997. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* 87:375-380.
13. Fraser, D.E., Shoemaker, P.B. and Ristaino, J.B. 1999. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from tomato and potato in North Carolina from 1993 to 1995. *Plant Dis*, 83:633-638.
14. Francis, D.M., St. Clair, D.A. 1997. Population genetics of *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 87:454-461.
15. Fry, W.E., Goodwin, S.B., Matuszak, J.M. Spielman, L.J. and Milgroom, M.G. 1992. Population genetics and continental migrations of *Phytophthora infestans*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:107-129.
16. Fry, W.E., Goodwin, S.B., 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. and Sandlan, K.P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways and implications. *Plant Dis.* 77:653-661.
17. Fry, W.E. and Goodwin, S.B. 1997. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Dis.* 87:1349-1357.
18. Gallegly, M.E. and Galindo, J. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* 48:274-277.
19. Gavino, P. D., Smart, C. D., Sandrock, R. W., Miller, J. S., Hamm, P. B., Lee, T. Y., Davis, R. M. and Fry, W. E. 2000. Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: Generation of an aggressive lineage. *Plant Dis.* 84:731-735.
20. Goodwin, S.B., Drenth, A. and Fry, W.E. 1992. Cloning and genetic analysis of two polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Curr. Genet.* 22:107-115.
21. Goodwin, S.B., Cohen, B.A. and Fry, W.E. 1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11591-11595.
22. Goodwin, S.B., Schneider, R.E. and Fry, W.E. 1995. Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* 79:1181-1185.

23. Goodwin, S.B., Sujkowski, L.S. and Fry, W.E. 1996. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathology* 86:793-800.
24. Goodwin, S.B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87:462-473.
25. Goodwin, S.B., Smart, C.D., Sandrock, R.W., Deahl, K.L., Punja, Z.K. and Fry, W.E. 1998. Genetic change within populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada During 1994 to 1996: role of migration and recombination. *Phytopathology* 88:939-949.
26. Griffith, G.W. and Shaw, D. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Appl. Environm. Ecol.* 64: 4007-4014.
27. Hohl, H.R. and Iselin, K. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behavior. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 83:529-530, 1984.
28. Hooker, W.J. 1981. *Compendium of potato diseases*. APS Press, St. Paul, MN.
29. Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E. and Zitter, T.A. 1991. *Compendium of tomato diseases*. APS Press, St. Paul, MN.
30. Kato, M., Mizubuti, E. S., Goodwin, S. B. and Fry, W.E. 1997. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology* 87:973-978.
31. Koh, Y.J., Goodwin, S.B., Dyer, A.T., Cohen, B.A., Ogoshi, A., Sato, N. and Fry, W.E. 1994. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries *Phytopathology* 84:922-927.
32. Lambreton, L. and Andrivon, D. 1998. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:583-594.
33. Legard, D.E., Lee, T.Y. and Fry, W. E. 1995. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: Aggressiveness on tomato. *Phytopathology* 85: 1356-1361.
34. Marshal-Farrar, K.D., McGraph, M., James, R.V. and Stevenson, W.R. 1998. Characterization of *Phytophthora infestans* in Wisconsin from 1993 to 1995. *Plant Dis.* 82:434-436.

35. Martin, F.N. and English, J.T. 1997. Population genetics of soil-borne fungal plant pathogens. Introduction. *Phytopathology* 87:446-447.
36. Matuszak, J.M., Fernandez-Elquezabal, J., Gu, W.K., Villarreal-Gonzalez, M. and Fry, W.E. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: distribution and dynamics. *Plant Dis.* 78:911-916.
37. Mayton, H., Smart, C.D., Moravec, B. and Fry, W.E. 1999. Inheritance of pathogenicity in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 89:S50.
38. McDonald, B. 1997. Population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87:448-453.
39. Milgroom, M.G. and Fry, W.E. 1997. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Adv. Bot. Res.* 24: 1-30.
40. Miller, J.S. Johnson, D.A. and Hamm, P.B. 1998. Aggressiveness of isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. *Phytopathology* 88:190-197.
41. Mosa, A.A., Kobayashi, K. and Ogoshi, A. 1993. Isoenzyme polymorphism and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan. *Plant Pathol.* 42:26-34.
42. Niederhauser, J.S. 1991. *Phytophthora infestans*: The Mexican connection. Page 25-45 in: *Phytophthora*. Lucas, J.A.; Shattock, R.C., Shaw, D.S., Cooke, L.R. (eds). Mycological Society by Cambridge University, Cambridge, UK.
43. Oyarzun, P.J., Pozo, A., Ordoñez, M.E., Doucett, K. and Forbes, G.A. 1998. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. *Phytopathology* 88:265-271.
44. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
45. Spielman, L.J., McMaster, B.J. and Fry, W.E. 1989. Dominance and recessiveness at loci for virulence against potato and tomato in *Phytophthora infestans*. *Theor. Appl. Genet.* 77:832-838.
46. Spielman, L. J., Drenth, A., Davidse, L. C., Sujkowski, L. J., Gu, W. K., Tooley, P. W. and Fry, W. E. 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? *Plant Pathol.* 40: 422-430.

47. Strömberg, A., Persson, L. and Wikström, M. 1999. Infection of potatoes by oospores of *Phytophthora infestans* in soil. *Plant Dis.* 83: 876.
48. Sujkowski, L.S., Goodwin, S.B. and Fry, W.E. 1994. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology* 84:201-207.
49. Sujkowski, L.S., Fry, B.A., Power, R.J., Goodwin, S.B., Peever, T.L., Hamlen, R.A. and Fry, W.E. 1995. Sensitivity of Mexican isolates of *Phytophthora infestans* to chlorothalonil, cymoxanil and metalaxyl. *Plant Dis.* 79: 1117-1120.
50. Therrien, C.D., Tooley, P.W., Spielman, L.J., Fry, W.E., Ritch, D.L. and Shelly, S.E. 1993. Nuclear DNA content, allozyme phenotypes and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* from Japan. *Mycol. Res.* 97:945-950.

Table 1. Number of isolates of *Phytophthora infestans* and the geographical region and crops from which they were obtained.

Region	State	Host	
		Tomato	Potato
South	Rio Grande do Sul	1	9
	Santa Catarina	13	15
	Paraná	7	10
Southeast	São Paulo	11	9
	Minas Gerais	91	52
	Rio de Janeiro	8	-
	Espírito Santo	19	4
Total	-	150	99

Table 2. Specific primer sets used for PCR amplification of mitochondrial DNA (mt-DNA) fragments of *Phytophthora infestans* in combination with the digestion reaction used for determination of mt-DNA haplotypes and the digestion product of the four different mitochondrial haplotypes of *P. infestans* found by Griffith and Shaw (24).

Primer set	Product size	Digestion enzyme	Enzyme Buffer	Mitochondrial haplotypes			
				Ia	Ib	IIa	IIb
F1 R1	1,118kb	Msp1	10 x Reaction Buffer 1	350-900	350-642-250	350-900	130-220-900
F2 R2	0,964kb	Eco-R1	10 x NE Buffer 2	360-395-211	360-395-211	360-606	360-606
F4 R4	6,182kb	Cfo1	10 x Reaction Buffer 3	906-211	906-211	1119	1119

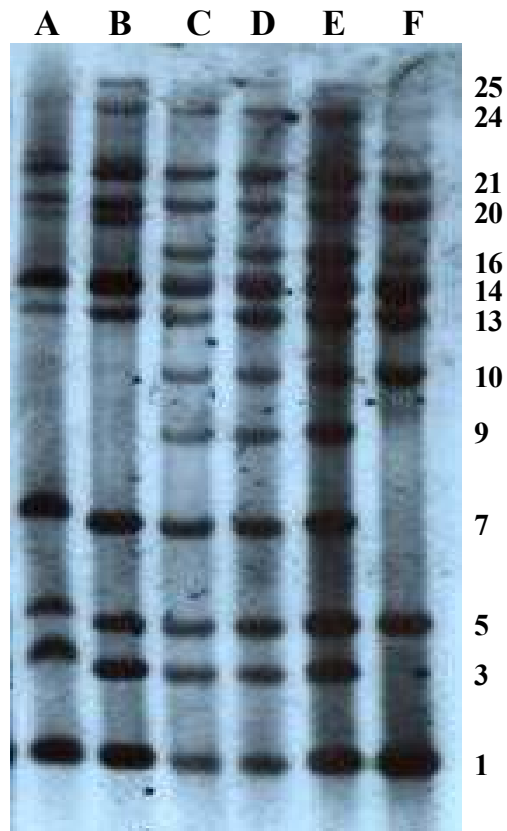


Figure 1. DNA fingerprinting of RFLP using RG57 probe, patterns of *Phytophthora infestans* isolates. Lane A and B, Brazilian isolates with A2 mating type and assumed to be BR-1.1; Lane C and D, Brazilian isolates with A1 mating type and assumed to be US-1; Lane E and F, US-1 and US-8 respectively isolates from the Cornell University collection. RG₅₇ fingerprint band numbers are indicated in the right.

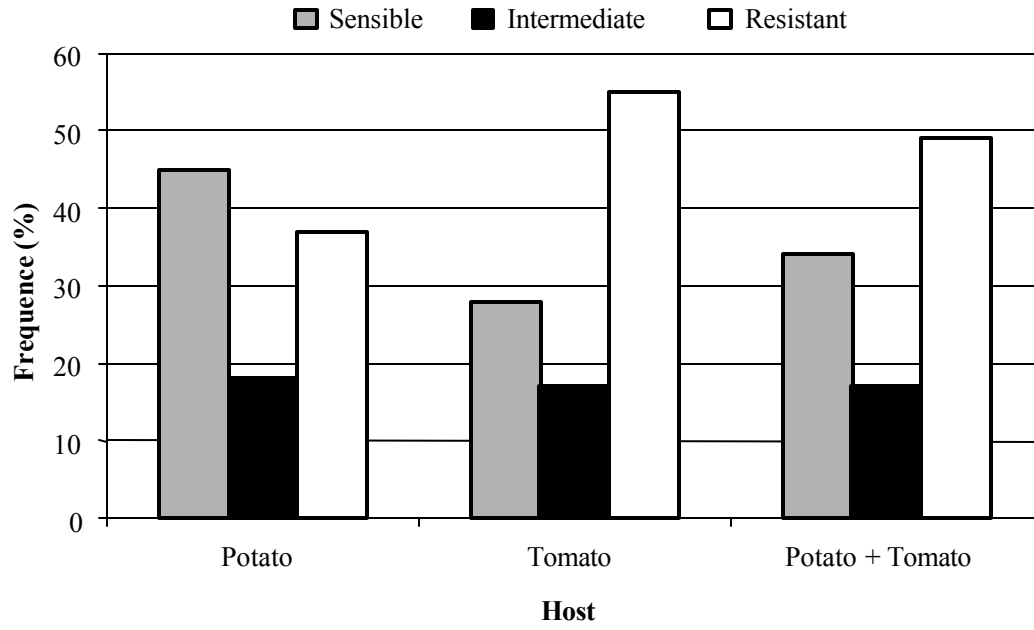


Figure 2. Frequency of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans* resistant, intermediate and sensitive to metalaxyl (Ridomil 2E).

Table 2. Genotypes of *Phytophthora infestans* detected in South and Southeast Brazil in 1998, from potato and tomato.

Host	Group	Gpi ^a	Pep ^b	RG ₅₇	Genotype ^c	N ^o
Tomato	A1	86/100	92/100	1,3,5,7,9,10,13,14,16,20,21,24,25	US-1	44
	A1	86/100	92/100	-	US-1*	13
	A1	86/100	100/100	1,3,5,7,9,10,13,14,16,20,21,24,25	US-1.1	2
	A1	86/100	92/100	1,3,5,7,9,13,14,16,20,21,24,25	US-1.2	1
	A1	86/100	92/100	1,3,5,7,10,13,14,16,20,21,24,25	US-1.3	5
	A1	86/100	100/100	1,3,5,7,9,13,14,16,20,21,24,25	US-1.4	1
	A1	100/100	100/100	1,3,5,7,9,10,13,14,16,20,21,24,25	RU-1	1
Total						67
Potato	A1	86/100	92/100	1,3,5,7,9,10,13,14,16,20,21,24,25	US-1	3
	A1	86/100	92/100	-	US-1*	1
	A1	86/100	100/100	1,3,5,7,10,13,14,16,20,21,24,25	US-1.9	1
	A1	86/100	100/100	1,3,5,7,9,13,14,16,20,21,24,25	US-1.4	1
	A2	100/100	100/100	1,3,5,7,13,14,19,20,21,22,24,25	BR-1	7
	A2	100/100	100/100	1,3,5,7,13,14,19,20,21,24,25	BR-1.1	27
	A2	100/100	100/100	-	BR-1.1*	6
Total						46

^aGlucose-6-phosphate isomerase.

^bPeptidase.

^cGenotype designation sensu Goodwin *et al.* (19).

*Most likely genotype.

- Not done.

Capítulo II

SENSIBILIDADE DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS* AO FUNGICIDA METALAXYL

RESUMO

Duzentos e cinquenta e oito isolados de *Phytophthora infestans*, coletados em campos de tomate e batata das regiões Sul e Sudeste do Brasil nos anos de 1998 a 2000, foram avaliados quanto à sensibilidade ao fungicida metalaxyl pelos métodos do ágar, disco de folhas e disco de folhas segundo FRAC. No teste do ágar, 35,0% dos 210 isolados testados foram resistentes (R), 36% intermediários (I) e 29,0% sensíveis (S). Dos isolados do grupo de compatibilidade A1 (92% de tomate (N=171) e 8% de batata (N=15)), 36% foram R, 31,0% I e 33,0% S. Os isolados do grupo A2 (todos de batata (N=87)), 33% foram R, 24,0% I e 43,0% S. No teste do disco de folha, 24,3% dos 240 isolados testados foram R, 35,0% I e 40,7% S. Dos isolados do grupo A1 (quase todos de tomate) 21,0% foram R, 39,8% I e 39,2% S. Dos isolados do grupo A2, 35,9% foram R, 20,0% I e 44,1% S. No teste do disco de folha, segundo FRAC, a maioria dos 96 isolados testados foi R (44,8 %) e I (51,0%) e

apenas três deles foram S (4,2%). Dentre os isolados do grupo A1 a percentagem de R, I e S foi de 46,0%, 51,0% e 3,0%, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos com a análise dos isolados do grupo A2, 45,0% R, 52,0% I e 3,0% S. Não houve correlação entre grupo de compatibilidade ou hospedeira e resistência ao metalaxyl, isto é, não foi possível diferenciar os dois grupos de compatibilidade de *P. infestans*, presentes no Brasil, por meio da resistência ao metalaxyl.

ABSTRACT

Sensitivity to metalaxyl in Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*.

Two hundred and fifty eight isolates of *Phytophthora infestans*, collected from 1998 to 2000 from tomato and potato fields of the two main producing regions of Brazil (South and Southeast), were tested for metalaxyl resistance. The methodologies used were the agar test, leaf disc test, and leaf disc according to FRAC. In the agar test 35.0% of the 210 isolates were classified as metalaxyl resistant (R), 36.0% as intermediately resistant (I), and 29.0% as metalaxyl sensitive (S). Isolates from the A1 mating type (almost all from tomato) were 36.0% R, 31.0% I, and 33.0% S. Isolates from the A2 mating type (all from potato) were 33.0% R, 24.0% I, and 43.0% S. In the leaf disc test, 24.3% of the 240 isolates tested were classified as R, 35.0% as I, and 40.7% as S. Isolates from the A1 mating type were 21.0% R, 39.8% I, and 39.2% S. Isolates from the A2 mating type were 36.0% R, 20.3% I, and 44.1% sensible. In the leaf test according to the FRAC recommendations, most of the 96 isolates were either R (44.8%) or I (51.0%) and only three were S (4.2%). Isolates from the A1 mating type group were 46.0% R, 51.0% I, and 3.0% S. Isolates from the A2 mating type group were 45.0% R, 52.0% I, and 3.0% S. There was no correlation between host or mating type and metalaxyl resistance. Therefore it was not possible to differentiate mating type A1 from A2 based on metalaxyl resistance.

Additional Key words: late blight, fungicide resistance, tomato, potato

1. INTRODUÇÃO

A seleção de indivíduos resistentes a fungicidas em populações de fungos fitopatogênicos é um evento cada vez mais comum na agricultura, principalmente quando os pesticidas utilizados apresentam sítios de ação específicos (Delp, 1980). Este fator pode trazer problemas não só para o agricultor, com a redução da eficiência dos tratamentos químicos e conseqüentes perdas de produção, mas também para as empresas agroquímicas que têm de retirar seus produtos precocemente do mercado ou restringir o seu uso. Por isso, o monitoramento de populações de fitopatógenos resistentes aos fungicidas, particularmente os sistêmicos, deve ser um componente importante em práticas de manejo de doenças (Gisi & Cohen, 1996; Willians & Gisi, 1992).

Entre os fungicidas passíveis de exercer pressão de seleção sobre as populações fúngicas resistentes estão aqueles da classe das fenilamidas. Os fungicidas desta classe foram lançados no mercado no final da década de 70, como produtos específicos para controle de fitopatógenos pertencentes à classe Oomycetes e ordem Peronosporales (Gisi & Cohen, 1996). Inicialmente, foram eficientes como produtos sistêmicos com ação protetora e curativa de longa atividade (Cohen & Coffey, 1986; Gisi & Cohen, 1996). Dentro desta classe de fungicidas, o metalaxyl tem sido, provavelmente, o mais eficiente e mais utilizado (Cohen & Coffey, 1986).

O metalaxyl foi usado intensivamente para o controle de míldios em várias culturas e para o controle da requeima da batata (*Solanum tuberosum* L.) e do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Cohen & Coffey, 1986; Gisi & Cohen, 1996). A requeima, causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, é um dos principais problemas fitossanitários destas duas culturas. A doença pode ser endêmica ou de ocorrência esporádica, mas causa severas epidemias em praticamente todos os locais onde batata e tomate são plantados (Hooker, 1981; Jones, 1991). Sob condições favoráveis e na ausência de medidas de controle eficazes, a doença pode causar perdas de até 100% na produção. O uso de

fungicidas é a principal medida de controle para a doença e o metalaxyl foi o primeiro fungicida sistêmico eficiente no seu controle.

O modo de ação do metalaxyl é altamente específico. O fungicida inibe a enzima RNA polimerase, interferindo na síntese de RNA ribossômico (rRNA) (Gisi & Cohen, 1996; Gisi *et al.*, 2000; Williams & Gisi, 1992). Esta alta especificidade de ação e seu uso contínuo, principalmente quando em formulação isolada, faz com que haja alta pressão de seleção sobre os indivíduos insensíveis ou pouco sensíveis da população, podendo levar ao surgimento de subpopulações resistentes que podem predominar em um campo ou até em grandes regiões produtoras (Williams & Gisi, 1992). Por volta de 1979, aproximadamente dois anos do início da sua comercialização, foram detectados alguns isolados de *Pseudoperonospora cubensis* resistentes ao metalaxyl em cultivos protegidos em Israel (Reuveni *et al.*, 1980). Em seguida, no início dos anos 80, isolados de *P. infestans* resistentes ao metalaxyl foram relatados em alguns países europeus (Davidse *et al.*, 1981; Dowley & O'Sullivan, 1981; Cooke, 1981).

Migrações ocorridas no final das década de 70 permitiram a transferência de novos genótipos de *P. infestans* do grupo A1 e A2 do planalto central do México, presumível centro de origem e de diversidade do patógeno, para diversos países (Fry & Goodwin, 1997; Goodwin, 1997). Alguns destes novos indivíduos se estabeleceram nessas regiões e passaram a reproduzir apenas de forma assexuada, dando origem às linhagens clonais. Portanto, a população de *P. infestans*, na maioria dos países do mundo exceto o México, é constituída de uma ou algumas linhagens clonais. Estes novos genótipos, na sua maioria, apresentam como característica marcante, além de maior agressividade às hospedeiras, resistência ao metalaxyl (Fry & Goodwin 1997).

Os principais marcadores utilizados para caracterizar uma linhagem clonal são o grupo de compatibilidade, as aloenzimas Glicose fostato isomerase (*Gpi*) e Peptidase (*Pep*), RFLP dos DNAs genômico e mitocondrial. A resistência ao metalaxyl também pode ser utilizada como um marcador para linhagem clonal de *P. infestans* nos países em que há estreita relação entre os mesmos (Fry & Goodwin, 1997). Entretanto, no Brasil, não se sabe se este fato é verdadeiro.

Para avaliação da resistência de *P. infestans* ao metalaxyl, vários métodos têm sido empregados. Entre estes, alguns dos mais utilizados são o cultivo de isolados do patógeno em meio de cultura contendo diferentes concentrações do fungicida, método do ágar (Sozzi & Staub, 1987; Shattock, 1988); e métodos utilizando porções do hospedeiro como os do disco de folha em concentrações de 0; 5 e 100ppm (Matuszak *et al.*, 1994); e 0; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100ppm (Sozzi *et al.* 1992). O método do ágar apresenta como vantagens a praticidade e baixo custo, entretanto exige o isolamento do patógeno em cultura pura. O método do disco de folha também apresenta baixo custo e não exige o isolamento do fungo (Gisi & Cohen, 1996). Estes métodos, apesar de poderem divergir em alguns casos, podem ser usados como complementares em programas de monitoramento, proporcionando informações mais precisas sobre a situação atual da resistência (Gisi & Cohen, 1996; Sozzi & Staub, 1987).

Apesar de a detecção de isolados de *P. infestans* resistentes ao metalaxyl (Davidse *et al.*, 1981; Dowley & O'Sullivan., 1981; Cooke, 1981; Goodwin *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 1998) e estudos sobre a genética da resistência já estarem sendo desenvolvidos há bastante tempo, principalmente em países da Europa e América do Norte (Fabritius, *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Shattock, 1988), no Brasil praticamente não se dispõem de relatos de ocorrência de isolados de *P. infestans* resistentes. Aparentemente, o único relato disponível é o de Castro & Shaw (1992), os quais descrevem isolados resistentes e sensíveis coletados há quase uma década. Contudo, o trabalho não foi publicado na íntegra e não fornece detalhes sobre amostragem, metodologia e análises.

Como o controle da requeima é dependente do uso de fungicidas, a análise de sensibilidade de isolados do fungo aos produtos utilizados é de importância para o manejo da doença. São freqüentes os relatos de tomaticultores e bataticultores quanto à baixa eficiência do metalaxyl no controle da doença. A predominância de isolados resistentes ao fungicida poderia explicar a baixa eficiência do produto.

Este trabalho teve como objetivos: *i.* determinar se há resistência de *P. infestans* a metalaxyl; *ii.* determinar a freqüência de ocorrência de isolados

resistentes de *P. infestans* coletados nas duas principais regiões produtoras de batata e de tomate estaqueado do Brasil, Sul e Sudeste. Adicionalmente, testou-se a hipótese que as duas linhagens de *P. infestans* que ocorrem no Brasil, US-1 e BR-1, não diferem quanto à resistência ao metalaxyl.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados de *Phytophthora infestans*

Duzentos e cinquenta e oito isolados foram coletados em 122 campos de produção, sendo 43 de batata e 79 de tomate, situados em duas regiões geográficas do Brasil, Sul e Sudeste. Estas regiões respondem pela maior parte da produção nacional de batata e de tomate estaqueado. Os isolados obtidos foram caracterizados para o grupo de compatibilidade conforme metodologia padrão (Spielman *et al.*, 1989). De cada campo, foram avaliados de um a cinco isolados quanto a resistência ao metalaxyl (Tabela 1).

2.2. Avaliação da sensibilidade de isolados de *P. infestans* ao metalaxyl

A sensibilidade de isolados brasileiros de *P. infestans* ao metalaxyl foi determinada por meio de três bioensaios: 1. Teste em meio de cultura; 2. Teste em disco de folha 1 e 3. Teste em discos de folhas - método FRAC (Fungicide Resistance Action Committee).

2.2.1. Teste do ágar

Neste teste, a resistência de 210 isolados ao metalaxyl foi determinada com base no crescimento radial das colônias em meio de centeio sacarose ágar -

B (CSB), no qual foi adicionado metalaxyl, conforme metodologia descrita anteriormente (Deahl *et al.*, 1993; Sujkowski *et al.*, 1995; Sozzi & Staub, 1987, Matuszak *et al.*, 1994). Discos de meio de cultura contendo micélio, de 8mm de diâmetro, foram retirados de colônias do patógeno com sete a 10 dias de idade e transferidos para o centro de placas de Petri contendo CSB com 0 (testemunha), 5 ou 100 ppm de metalaxyl. Previamente, duas suspensões estoques de metalaxyl (Ridomil 2E) foram preparadas em água destilada esterilizada, nas concentrações de 5 e 100 mg/ml. Cada isolado, em cada concentração do fungicida, foi crescido em duas placas. Cada placa constituiu uma repetição. O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado e foi repetido uma vez.

As placas foram mantidas em câmaras de incubação (BOD) a 18°C no escuro. Aos 14 e 21 dias de incubação os dois diâmetros opostos das colônias foram medidos, quando aqueles das colônias crescidas na ausência do fungicida eram maiores que 30mm. O diâmetro de cada colônia foi corrigido subtraindo-se os 8mm correspondentes ao disco de micélio.

Para determinar a reação dos isolados ao metalaxyl, os diâmetros médios das colônias no meio com 5 e 100ppm de metalaxyl foram multiplicados por 100 e divididos pelo diâmetro médio das colônias, do mesmo isolado, na testemunha. Isolados que apresentaram crescimento menor que 40% do crescimento observado no tratamento testemunha, foram considerados como sensíveis. Isolados que, a 5ppm, apresentaram crescimento superior a 40% do crescimento da testemunha, mas que, a 100ppm, apresentaram crescimento inferior a 40% do da testemunha, foram considerados intermediários. Foram considerados como resistentes, aqueles isolados com crescimento superior a 40% do da testemunha, em 5 e 100ppm de metalaxyl (Therrien et al., 1993).

2.2.2. Teste do disco de folha 1

A resistência ao metalaxyl foi estimada baseada na capacidade do patógeno em esporular sobre um disco de folha de batata ou tomate, conforme o hospedeiro de origem do isolado (Matuszak *et al.*, 1994; Sozzi & Staube, 1987). O inóculo foi obtido a partir do cultivo dos isolados em folíolos de tomate ou batata, mantidos em laboratório até a esporulação abundante do patógeno. Discos de folha de 13 a 15 mm de diâmetro foram retirados, com auxílio de um furador de rolha, de plantas de batata 'Bintje' ou de tomate 'Kada' com 1,5 a 3 meses de idade, cultivadas em casa-de-vegetação. Cinco discos de folíolos de batata ou de tomate foram colocados, com a face abaxial voltada para cima, em 10 ml de uma suspensão de 0 (testemunha), 5 ou 100 ppm de metalaxyl (Ridomil 2E), contidas em placas de Petri de 5,5cm de diâmetro. Os discos foram inoculados com 10µl de uma suspensão de 1 a $2,5 \times 10^4$ esporângios/ml. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara de crescimento a 18°C e 16 h de iluminação, por seis dias. A esporulação do patógeno sobre os discos de folha foi estimada após seis dias, com o auxílio de uma escala de notas variando de 0 a 5 onde: 0 = sem sintomas aparentes; 1 = presença de necrose; 2, 3, 4 e 5 = 5%, 5-20%, 20-50% e > 50% respectivamente, da superfície do disco coberta por esporulação do patógeno (Sozzi *et al.* 1992). Foram usadas três placas, com cinco discos cada, para cada combinação isolado-concentração. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Cada placa foi considerada como uma repetição. Cada isolado foi testado duas vezes ou mais, quando os dois primeiros resultados não correspondiam à mesma reação.

Para determinar a reação dos isolados ao fungicida metalaxyl, a esporulação obtida a 5 e a 100ppm foi dividida pela esporulação na testemunha e multiplicado por 100. Os critérios para determinar as classes de resistência foram os mesmos adotados no teste anterior (item 2.2.1.).

2.2.3. Teste do disco de folha - método FRAC

A sensibilidade dos isolados ao metalaxyl foi estimada seguindo a metodologia preconizada pelo Comitê de Ação contra a Resistência a Fungicidas - FRAC ("Fungicide Resistance Action Committee") (Sozzi *et al.*, 1992). Discos de folha (13 mm de diâmetro) foram obtidos de plantas de batata cultivar Bintje ou de tomate cultivar Kada, com 1 a 2 meses de idade, cultivadas em casa-de-vegetação. Cinco discos de folíolos de batata ou de tomate foram colocados, com a face abaxial para cima, em 10 ml de uma suspensão de 0 (testemunha); 0,01; 0,1; 1; 10 ou 100 ppm de metalaxyl (Ridomil 2E), contidas em placas de Petri de 5,5 cm de diâmetro. Cada disco foi inoculado com 10 μ l de uma suspensão contendo 2x10⁴ esporângios/ml. Foram usadas duas placas, com cinco discos cada, para cada combinação isolado-concentração. Cada isolado foi testado ao menos duas vezes. As condições de incubação e a escala para avaliação da esporulação nos discos foram as mesmas empregadas no item 2.2.2. (Sozzi *et al.* 1992).

Para determinar a reação dos isolados ao metalaxyl, os dados foram transformados em índice de Townsend-Heuberger e depois ajustados pela fórmula de Abbott (Hubert, 1992). Estimou-se dose do produto capaz de inibir em 50% a esporulação do patógeno (DL₅₀) por meio da regressão linear dos valores de inibição de esporulação em função da concentração de fungicida transformada com logaritmo. Todas as análises estatísticas foram executadas com o auxílio do programa The SAS System versão 8.0.

Para se estabelecer a reação de cada isolado foram utilizados dois critérios:

- 1) Isolados em que a DL₅₀ do produto variou entre 0,001 e 0,01 ppm foram considerados sensíveis; isolados em que a DL₅₀ variou entre 0,01 e 10ppm foram considerados intermediários e isolados em que a DL₅₀ ficou acima de 10ppm, foram considerados resistentes (Sozzi *et al.*, 1992).
- 2) Foram considerados sensíveis os isolados em que a DL₅₀ ficou abaixo de 10ppm e resistentes os iguais ou acima disto (Sozzi *et al.*, 1992).

3. RESULTADOS

3.1. Teste do ágar

No teste do ágar, os 210 isolados testados variaram bastante quanto à resistência ao metalaxyl. A frequência de isolados resistentes foi 35%, de intermediários 36% e a de sensíveis foi 29%. A proporção de isolados resistentes e intermediários predominou sobre os sensíveis com mais de 70% dos isolados apresentando resistência ao fungicida (Figura 1A).

Não houve relação entre o grupo de compatibilidade e a resistência ao metalaxyl. Dentro dos dois grupos foram encontrados isolados resistentes, intermediários e sensíveis. Observou-se valores de frequência similares para os isolados resistentes (36,1%), intermediários (30,6%), e sensíveis (33,3%) dentro do grupo A1. A frequência de isolados resistentes e intermediários constituiu mais de 65,0% do total. No grupo A2, os sensíveis (42,9%), individualmente, apresentaram frequência mais alta do que os isolados resistentes (33,3%) e intermediários (23,8%). Agrupando os isolados resistentes e intermediários, estes constituíram mais de 55% do total e superaram, em frequência, os sensíveis (Figura 1B).

Na região Sul, os isolados sensíveis (56,8%) foram muito mais frequentes que os intermediários (22,7%) ou os resistentes (20,5%). A frequência de isolados sensíveis foi superior à soma dos resistentes com intermediários (Figura 1C). A maior frequência relativa de isolados sensíveis foi observada para Santa Catarina. Na região Sudeste, houve um equilíbrio entre isolados resistentes (39,2%), intermediários (30,1%) e sensíveis (30,7%). Entretanto, quando somadas as frequências de resistentes com os de intermediários, a frequência deste grupo superou, em muito, a frequência de isolados sensíveis (Figura 1C), indicando uma tendência de seleção para resistência ao fungicida no campo. No

Estado de São Paulo, 67,0% dos isolados analisados foram resistentes, 11,0% intermediários e apenas 22,0% sensíveis. No Rio de Janeiro e em Minas Gerais também houve predominância de isolados resistentes em relação aos intermediários e sensíveis, só que numa frequência menor que em São Paulo. Apenas no Estado do Espírito Santo os isolados sensíveis predominaram sobre os demais. A frequência de isolados resistentes mais intermediários na região Sudeste foi de 69,0%; superior à observada na região Sul (43,0%).

3.2. Teste do disco de folha 1

No teste do disco de folha, também houve alta variação entre os 240 isolados testados. A frequência de isolados sensíveis foi de 41,0%, a de intermediários foi de 35,0% e a de resistentes 24,0%. A soma das frequências de resistentes e intermediários, foi próxima a 60% dos isolados (Figura 2A).

Dentre os isolados do grupo de compatibilidade A1, predominaram os isolados intermediários (39,8%) e sensíveis (39,2%) em relação aos resistentes (21,0%). No grupo A2, a maior parte dos isolados foram classificados como sensíveis (44,1%), seguida dos resistentes (35,6%) e dos intermediários (20,3%). A proporção de isolados resistentes foi bem maior dentro do grupo A2 do que no grupo A1, enquanto os intermediários foram mais abundantes no grupo A1 e os sensíveis praticamente iguais dentro dos dois grupos (Figura 2B). Também aqui, como já havia ocorrido no teste do ágar, não houve correlação entre grupo de compatibilidade e resistência ao metalaxyl.

Comparando as duas regiões amostradas, observou-se que na região Sul a proporção de isolados sensíveis (51,0%) superou à dos isolados resistentes (32,7%) somada à dos intermediários (16,3%). Na região Sudeste, a proporção de isolados sensíveis (39,2%) foi praticamente igual à de isolados intermediários (38,7%) e superior à de resistentes (22,1%) (Figura 2C). Portanto, observaram-se maiores frequências de isolados resistentes e sensíveis na região Sul em relação à Sudeste, enquanto que os intermediários foram mais frequentes nesta última.

Entretanto, a soma das freqüências de isolados resistentes e intermediários na Região Sudeste foi 61,0%; valor superior ao calculado para este grupo (intermediários + resistentes) para a região Sul (49,0%). Há de se ressaltar aqui que, o número de isolados analisados da região Sudeste foi superior (duas vezes mais) ao número de isolados da região Sul, o que pode ter contribuído para estas diferenças.

Na região Sudeste, dentro do grupo de compatibilidade A1, houve uma proporção baixa de isolados resistentes (17,4%), enquanto predominaram os isolados intermediários (41,6%) e os sensíveis (41,0%). Ao contrário, dentro do grupo A2 predominaram os isolados resistentes (45,5%) sendo estes inferiores à soma dos sensíveis (30,3%) e intermediários (24,2%). Na hospedeira tomate, a proporção de isolados (todos do grupo A1) resistentes também foi menor que as outras duas classes. Na hospedeira batata (maioria do grupo A2), a proporção de isolados resistentes foi mais alta, mas não muito superior às de intermediários e sensíveis, as quais foram praticamente iguais.

Na região Sul observou-se um fenômeno contrário ao da região Sudeste. Os isolados resistentes (52,2%) foram maioria no grupo A1, superando a soma de intermediários (17,4%) e sensíveis (30,4%). No grupo A2, a proporção de resistentes (15,4%) e intermediários (15,4%) foi menor e, mesmo somados, a freqüência deste grupo é menor (30,8%) que a dos sensíveis (69,2%).

Nas hospedeiras batateira e tomateiro, as freqüências de isolados resistentes, intermediários e sensíveis foi similar àquela estimada por grupo de compatibilidade. Isto porque todos os isolados de tomate eram A1 e os de batata, com exceção de dois, eram A2.

3.3. Teste do disco de folha - método FRAC

No teste do disco de folha conduzidos de acordo com as recomendações do FRAC, observaram-se resultados discordantes dos obtidos nos dois testes anteriores. No geral, pelo critério número um de classificação dos isolados, a

maioria dos 96 isolados testados situou-se nas classes resistente (44,8%) e intermediária (51,0%) e apenas 3 isolados (4,2%) ficaram na classe sensível. Com a utilização do segundo critério de classificação dos isolados, cerca de 45% destes foram resistentes e 55% sensíveis (Figura 3A).

Quando se avaliou a reação dos isolados dentro dos grupos de compatibilidade, os resultados foram semelhantes aos obtidos com todos os isolados juntos. No grupo A1 cerca de 46% dos isolados foram resistentes, 51% intermediários e apenas 3% sensíveis. No grupo A2 essas frequências foram de 45%, 52% e 3%; respectivamente (Figura 3B).

Na Região Sul foi verificada menor frequência de isolados resistentes (28,6%) em comparação com os intermediários (66,7%) e com poucos isolados sensíveis (4,7%). Na Região Sudeste, a proporção de isolados resistentes (48,0%) e intermediários (49,3%) foi similar e, constatou-se pequena proporção de isolados sensíveis (2,7%) (Figura 3C). Se fosse considerado somente o critério 2 de classificação dos isolados, a frequência de isolados resistentes na Região Sudeste seria maior do que na Região Sul.

4. DISCUSSÃO

A ocorrência de isolados de *P. infestans* resistentes ao metalaxyl foi constatada em todos os estados amostrados. A frequência de isolados sensíveis, intermediários e resistentes foi variável e, aparentemente, não está associada ao grupo de compatibilidade do patógeno. Isto é, não seria possível distinguir as duas linhagens clonais de *P. infestans* do Brasil, US-1 (A1) e BR-1 (A2) baseado apenas na resistência ao metalaxyl. Foram encontrados isolados das três classes de resistência em ambos os grupos de compatibilidade. Situação similar foi constatada no Canadá, onde também foram detectados isolados com diferentes níveis de resistência, dentro de diferentes linhagens clonais e em diferentes províncias (Peters *et al.*, 1998). Demonstrando que a resistência ao metalaxyl muitas vezes não está associada a linhagem clonal.

Neste estudo, foram obtidos isolados resistentes e intermediários de lavouras nas quais não houve aplicação de metalaxyl. Mesmo na ausência de pressão de seleção por parte do fungicida, há uma proporção natural de isolados resistentes e intermediários nestas lavouras. Existe ainda a possibilidade de que o inóculo, que gerou epidemias nas mesmas, tenha vindo de lavouras mais antigas que possuíam alta frequência de isolados intermediários e, ou, resistentes. Isolados insensíveis ao metalaxyl também têm sido detectados em lavouras não pulverizadas nos Estados Unidos (Goodwin *et al.*, 1996), Canadá (Peters *et al.*, 1998) e Holanda (Fry *et al.*, 1991).

Ensaio utilizando o método do ágar podem ser usados no monitoramento da resistência, entretanto as características de crescimento e esporulação de determinados isolados de *P. infestans* são diferentes nestas condições (Sozzi & Staub, 1987). Os resultados do método do ágar foram, em sua maioria, corroborados pelo teste do disco. Isto é consistente com observações de outros autores (Goodwin *et al.*, 1996; Sozzi & Staub, 1987; Matuszak *et al.*, 1994). Sozzi & Staub (1987) encontraram boa correlação entre os métodos do ágar e do disco de folha, mas enfatizaram o uso de técnicas “in vivo” para confirmar resultados do ágar. Gisi & Cohen (1996) também recomendam que os resultados de sensibilidade obtidos “in vitro” sejam verificados com testes “in vivo” antes de concluir sobre os mesmos. No caso de ser utilizado apenas um método, o teste do disco deve ser preferido em relação ao teste do ágar.

Diferenças detectadas entre os resultados obtidos com o método do ágar em relação ao do disco de folha podem ter sido originadas não só pelas características de cada teste mas também porque alguns isolados utilizados em um dos testes não foram usados no outro. Entre os grupos de compatibilidade também houve diferença entre os testes dentro do grupo A1 enquanto que dentro do grupo A2 a correlação foi alta. Em contrapartida, os resultados obtidos no teste FRAC diferiram em muito destes resultados iniciais. Quase não foram detectados isolados sensíveis no critério 1 de classificação. Isto ocorreu, provavelmente, devido à faixa estreita de DL50 para os isolados sensíveis (0,001 a 0,01 ppm). Se o intervalo para classificação como sensível fosse mais amplo,

por exemplo, de 0 a 0,1 ou 1ppm, ter-se-ia maior distinção entre as classes. Porém, ainda assim, muitos isolados seriam classificados como resistentes.

Neste estudo, nos dois primeiros testes, foi possível diferenciar bem as três categorias de sensibilidade ao metalaxyl nos isolados testados, não somente independente do grupo de compatibilidade, como também da hospedeira ou da região de origem dos mesmos. Da mesma forma, outros autores também conseguiram separar as populações de *P. infestans* nas três categorias (Deahl *et al.*, 1993; Shattock, 1988). A possibilidade de separar os isolados brasileiros de *P. infestans* em três categorias parece indicar um padrão contínuo de sensibilidade ao fungicida. Isto pode significar que, como observado em outros locais, mais de um gene possa estar envolvido no controle da resistência (Peters *et al.*, 1998) ou que seria um único gene, conferindo resistência parcial (Shattock, 1988). Contrariamente, em alguns estudos, os autores separaram a sensibilidade de *P. infestans* ao metalaxyl em apenas duas classes (resistente ou sensível) (Goodwin *et al.*, 1996; Matuszak *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1997). Também neste estudo, o teste do disco de folha senso FRAC indica a presença de apenas duas classes, resistente e intermediário pelo critério 1 e resistente e sensível pelo critério 2.

Se for considerado somente o critério 2 de Sozzi *et al.* (1992) para classificação da resistência dos isolados, a frequência de isolados resistentes na Região Sudeste é muito maior do que na Região Sul, pelo método FRAC. No teste do disco de folha, se forem somados os resistentes com os intermediários da região Sudeste (61%), a proporção seria maior que a observada na Região Sul (49%). Tais resultados foram observados no teste do ágar. Diferenças na resistência de populações de *P. infestans*, entre regiões, também foram detectadas no Equador (Forbes *et al.*, 1997), no Canadá (Peters *et al.*, 1998) e na África do Sul (McLeod *et al.*, 2001).

Análises enzimáticas e de DNA dos isolados A1 de *P. infestans* do Brasil confirmaram que os mesmos pertencem à linhagem US-1 (Goodwin *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 2000). Esta linhagem clonal é considerada sensível ao metalaxyl pelo menos na América do Norte e em alguns países europeus (Fry & Goodwin,

1997). Entretanto, aqui no Brasil foram encontrados isolados A1 de *P. infestans* classificados como sensíveis, intermediários e resistentes ao metalaxyl. Esta situação é verificada em outros locais como nas Filipinas (Koh *et al.*, 1994), no Equador (Oyarzun *et al.*, 1998) e na África do Sul (McLeod *et al.*, 2001). Neste último país, isolados US-1 de batata foram resistentes enquanto que os isolados US-1 de tomate foram todos sensíveis, contrastando com os nossos resultados. Como possíveis explicações para isto, os autores sugeriram haver especificidade de hospedeiro mesmo dentro de US-1 e, ou, a aplicação de metalaxyl, via quimigação, poderia estar expondo o fungo a subdosagens do produto. No caso da nova linhagem clonal BR-1, à qual pertencem os isolados A2 do Brasil, também foram encontrados isolados resistentes, intermediários e sensíveis. Estes resultados são consistentes com resultados de outros trabalhos onde a resistência ao metalaxyl é relatada frequentemente nas linhagens clonais novas de *P. infestans*, introduzidas após 1980 (Fry & Goodwin, 1997). No geral, não foram encontradas grandes diferenças na resistência dos isolados US-1 e BR-1. Algumas diferenças encontradas em algumas regiões e, ou, estados devem refletir situações locais ou problemas de amostragem.

Em muitos locais no Brasil, foram encontrados isolados de *P. infestans* resistentes e intermediários. Nestes locais, as epidemias de requeima devem estar sendo parcialmente, ou não estar sendo controladas, com o uso do metalaxyl. A baixa eficiência do produto, já observada por produtores, pode ser explicada, em parte, pela ocorrência de isolados de *P. infestans* resistentes ao metalaxyl. Entretanto, há locais onde predominam isolados sensíveis. O uso do fungicida, em mistura com um produto protetor eficiente (principalmente o mancozeb) de acordo com as recomendações do fabricante (Gisi & Cohen, 1996, Dowley *et al.*, 1995), ainda é um componente importante num programa de manejo da doença (Gisi & Cohen, 1996; Goodwin *et al.*, 1996; Samoucha & Cohen, 1989).

Se o critério FRAC, descrito em Sozzi *et al.* (1992), for adequado para avaliação de resistência ao metalaxyl quase a totalidade da população de *P. infestans* do Brasil apresenta resistência ao fungicida. Os resultados obtidos indicam que a situação de resistência de *P. infestans* a metalaxyl no Brasil é

preocupante. Por isso, em caso extremo, poder-se-iam recomendar medidas drásticas de manejo da resistência como a interrupção, a princípio temporária, do uso deste fungicida no país. O objetivo seria a redução na frequência de isolados resistentes e intermediários para níveis aceitáveis. A liberação de uso, mesmo de misturas com um fungicida protetor, só seria permitida juntamente com estratégias de prevenção da resistência. Tais medidas já foram implementadas em outros países (Staub, 1991; Dowley *et al.*, 1995; McLeod *et al.*, 2001). É imperativo o uso adequado do produto, conforme recomendação do fabricante.

Os resultados do monitoramento da população de fitopatógenos, visando detectar resistência a fungicidas, devem ser informados aos pesquisadores, extensionistas, agricultores e às indústrias. O conhecimento das possíveis mudanças que estejam ocorrendo na população do patógeno no campo podem ajudar a explicar possíveis mudanças na epidemiologia da doença. Tais mudanças poderiam implicar na reavaliação das estratégias de controle da doença. No caso da requeima, tais informações são potencialmente úteis pois: *i.* o controle da doença é dependente do uso de fungicidas; *ii.* o patógeno apresenta alto risco de resistência aos fungicidas fenilalamidas; e *iii.* o alto custo das lavouras de tomate e batata associado ao alto potencial de destruição da requeima fazem com que o risco de perda de produção seja elevado. O monitoramento deve, portanto, ser continuado para acompanhar a dinâmica da resistência e, como consequência, se as estratégias de manejo estão sendo eficazes.

5. REFERÊNCIAS

- CASTRO, C. & SHAW, D.S. Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* do Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 17:165. 1992.
- COHEN, Y. & COFFEY, M.D. Systemic fungicide and the control of oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*. 24:311-338. 1986.

- COOKE, L.R. Resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* in Northern Ireland. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference. 641-649. 1981.
- DAVIDSE, L.C., LOOIJEU, D., TURKENSTEEN, L.J. & Van der ALS, D. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of potato blight in Dutch potato fields. Netherlands Journal of Plant Pathology. 87:65-68. 1981.
- DEAHL, K.L., INGLIS, D.A. & DeMUTH, S.P. Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* from Northwestern Washington. American Potato Journal. 70:779-795. 1993.
- DELP, C.J. Coping with resistance to plant disease control agents. Plant Disease. 64:652-57. 1980.
- DOWLEY, L.J. & O'SULLIVAN, E. Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary in Ireland. Potato Research. 24:531-534. 1981.
- DOWLEY, L.J., COOKE, L.R. & O'SULLIVAN, E.O. Development and monitoring of an anti-resistance strategy for phenylamide use against *Phytophthora infestans*. In: DOWLEY, L.J., BANNON, E., COOKE, L.R., KEANE, T. & O'SULLIVAN, E. *Phytophthora infestans* 150. Dublin, Boole Press Ltd. 1995.p.130-136.
- FABRITIUS, A-L., SHATTOCK, R. & JUDELSON, H.S. Genetic analysis of metalaxyl insensitivity loci in *Phytophthora infestans* using linked DNA markers. Phytopathology. 87:1034-1040. 1997.
- FORBES, G.A., ESCOBAR, X.C., AYALA, C.C., REVELO, J., ORDOÑEZ, M.E., FRY, B.A., DOUCETT, K. & FRY, W.E. Population genetics structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. Phytopathology. 87:375-380. 1997.
- FRY, W.E. AND GOODWIN, S.B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. Plant Disease. 87:1349-1357. 1997.
- FRY, W.E., DRENTH, A, SPIELMAN, L.J., MANTEL, B., DAVIDSE, L.C & GOODWIN, S.B. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. Phytopathology. 81:1330-1336. 1991.
- GISI, U. & COHEN, Y. Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. Annual Review of Phytopathology. 34:549-572. 1996.
- GISI, U., CHIN, K.M., KNAPOVA, G., FÄRBER, R.K., MOHR, U., PARISI, S., SIEROTZKI, H. & STEINFELD, U. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. Crop Protection. 19:863-872. 2000.

- GISI, U., HERMANN, D., OHL, L. & STEDEN, C. Sensitivity profiles of *Mycosphaerella graminicola* and *Phytophthora infestans* populations to different classes of fungicides. *Pesticide Science*. 51:290-298. 1997.
- GOODWIN, S.B., COHEN, B.A. & FRY, W.E. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 91:11591-11595. 1994.
- GOODWIN, S.B., SUJKOWSKI, L.S. & FRY, W.E. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathology*. 86:793-800. 1996.
- HOOVER, W.J. *Compendium of Potato Diseases*. APS Press, St. Paul, MN. 1981.
- HUBERT, J.J. *Bioassay*. 3rd Ed. Dubuque. Kendall/Hunt Publishing Company. 1992. 198pp.
- JONES, J.B., JONES, J.P., STALL, R.E. & ZITTER, T.A. *Compendium of Tomato Diseases*. APS Press, St. Paul, MN. 1991.
- KOH, Y.J., GOODWIN, S.B., DYER, A.T., COHEN, B.A., OGOSHI, A., SATO, N. & FRY, W.E. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries *Phytopathology* 84:922-927. 1994.
- LEE, T.Y., MIZUBUTI, E.S.G., FRY, W.E. Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology*. 26:118-130. 1999.
- MATUSZAK, J.M., FERNANDEZ-ELQUEZABAL, J., GU, W.K., VILLARREAL-GONZALEZ, M. & FRY, W.E. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: Distribution and dynamics. *Plant Disease*. 78:911-916. 1994.
- MILLER, J.S., HAMM, P.B. & JOHNSON, D.A. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in the Columbia basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995. *Phytopathology*. 87:656-660. 1997.
- McLEOD, A., DENMAN, S., SADIE, A. & DENNER, F.D.N. Characterization of South African isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*. 85: 287-291. 2001.

- OYARZUN, P.J., POZO, A., ORDOÑEZ, M.E., DOUCETT, K. & FORBES, G.A. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. *Phytopathology*. 88:265-271. 1998.
- PETERS, R.D., PLATT, H.W. & HALL, R. Characterization of changes in populations of *Phytophthora infestans* in Canada using mating type and metalaxyl sensitivity markers. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 20: 259-273. 1998.
- REIS, A., SMART, C.D, FRY, W.E., MAFFIA, L.A. & MIZUBUTI, E.S.G. A população de *Phytophthora infestans* no Brasil continua clonal e apresenta alta especialização por hospedeiro. *Fitopatologia Brasileira*. 25:466. 2000.
- REUVENI, M., EYAL, M. & COHEN, Y. Development of resistance to metalaxyl in *Pseudoperonospora cubensis*. *Plant Disease*. 64:1108-1109. 1980.
- SAMOUCHA, Y. & COHEN, Y. Field control of potato late blight by synergistic fungicidal mixtures. *Plant Disease*. 73:751-753. 1989.
- SHATTOCK, R.C. Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*. 37:4-11. 1988.
- SOZZI, D. & STAUB, T. Accuracy of methods to monitor sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenylamide fungicides. *Plant Disease*. 71: 422-425. 1987.
- SOZZI, D., SCHWINN, F.J. & GISI, U. Determination of the sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenylamides: a leaf disc method. *Bulletin OEPP*. 22: 306-309. 1992.
- SPIELMAN, L.J., MCMASTER, B.J. & FRY, W.E. Dominance and recessiveness at loci for virulence against potato and tomato in *Phytophthora infestans*. *Theoretical and Applied Genetics*. 77:832-838. 1989.
- STAUB, T. Fungicide resistance: practical experience with with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annual Review of Phytopathology*. 29:421-442. 1991.
- SUJKOWISK, L.S., FRY, B.A., POWER, R.J., GOODWIN, S.B., PEEVER, T.L., HAMLEN, R.A. & FRY, W.E. Sensitivity of Mexican isolates of *Phytophthora infestans* to chlorothalonil, cymoxanil, and metalaxyl. *Plant Disease*. 79:1117-1120. 1995.
- THERRIEN, C.D., TOOLEY, P.W., SPIELMAN, L.J., FRY, W.E., RITCH, D.L. & SHELLY, S.E. Nuclear DNA content, allozyme phenotypes and metalaxyl

sensitivity of *Phytophthora infestans* from Japan. Mycological Research. 97:945-950. 1993.

WILLIAMS, R.J. & GISI, U. Monitoring pathogen sensitivity to phenylamide fungicides: principles and interpretation. Bulletin OEPP. 22:299-306. 1992.

Tabela 1: Número de lavouras amostradas e de isolados de *Phytophthora infestans* obtidos em diferentes estados brasileiros.

Região	Estado	Nº de Lavouras		Nº de Isolados		Total
		Tomate	Batata	Tomate	Batata	
Sul	Rio G. do Sul	1	6	1	10	11
	Santa Catarina	4	6	8	12	20
	Paraná	7	8	16	15	31
Sudeste	São Paulo	4	3	10	8	18
	Rio de Janeiro	13	-	26	-	26
	Minas Gerais	40	18	82	39	121
	Espírito Santo	10	2	28	3	31
Total		79	43	171	87	258

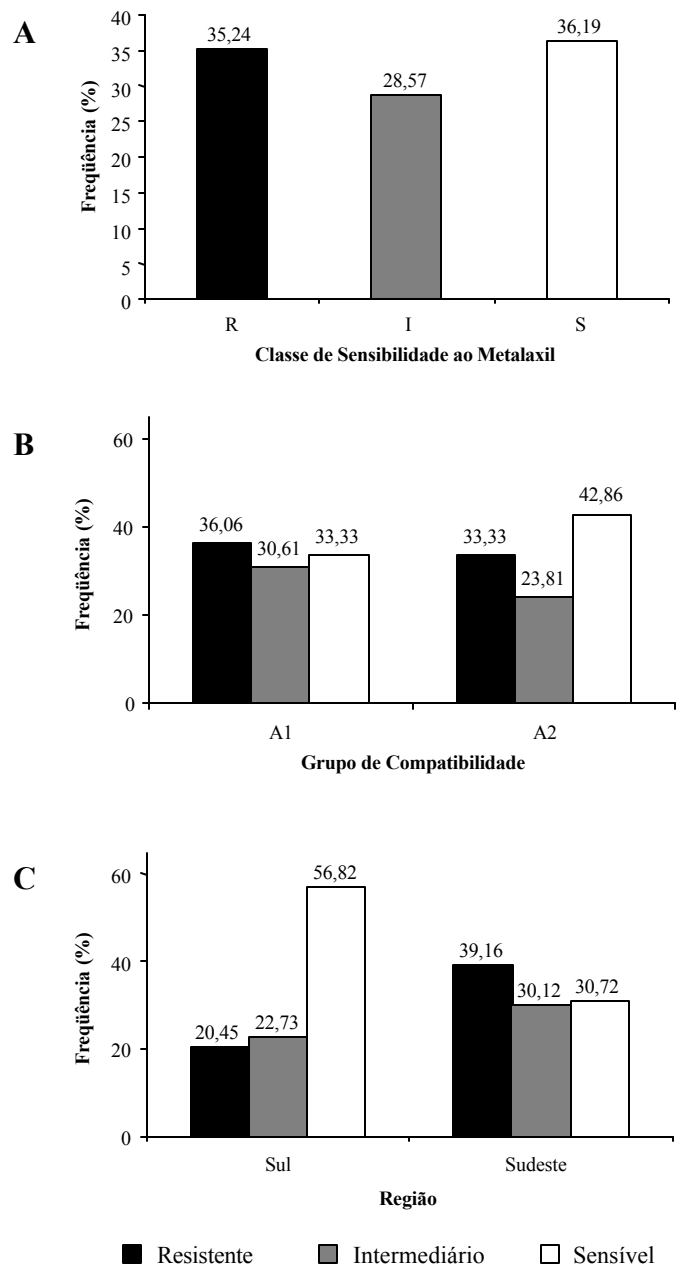


Figura 1: Frequência de isolados de *Phytophthora infestans* resistentes (R), intermediários (I) e sensíveis (S) ao metalaxyl, avaliada pelo método ágar e distribuídos por: A) gráfico geral (todos os isolados); B) grupo de compatibilidade e C) região amostrada.

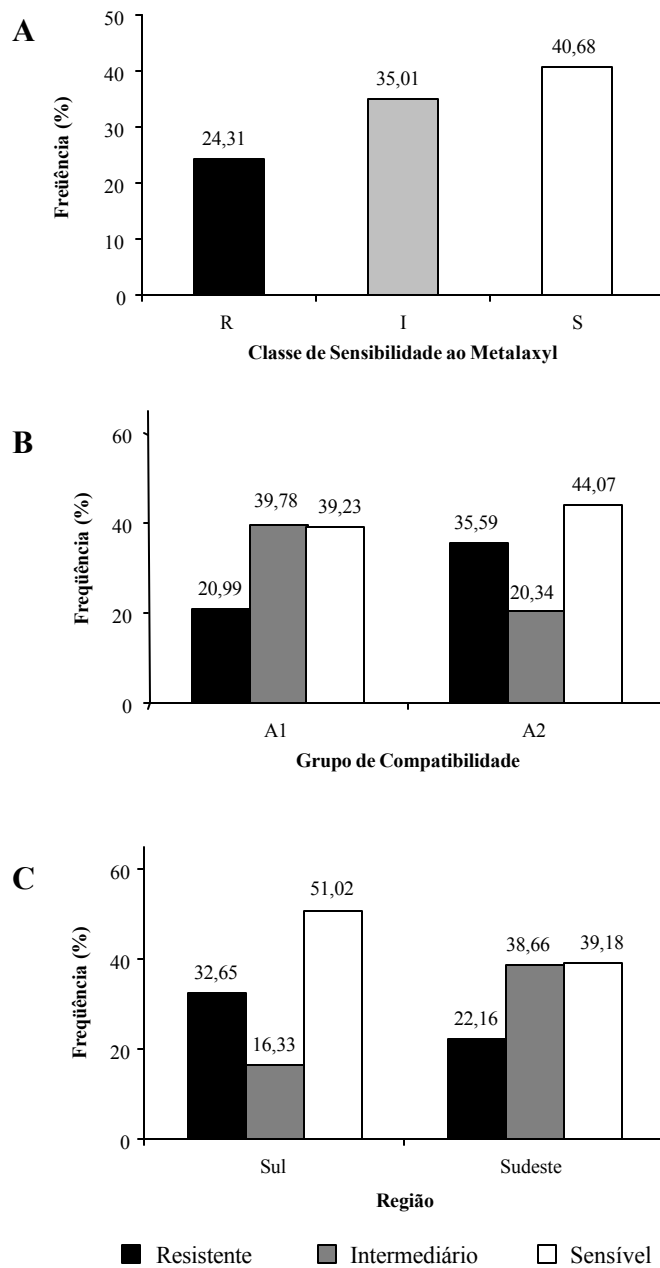


Figura 2: Frequência de isolados de *Phytophthora infestans* resistentes (R), intermediários (I) e sensíveis ao metalaxyl, avaliada pelo método do disco de folha e distribuídos por: A) gráfico geral; B) grupo de compatibilidade e C) região amostrada

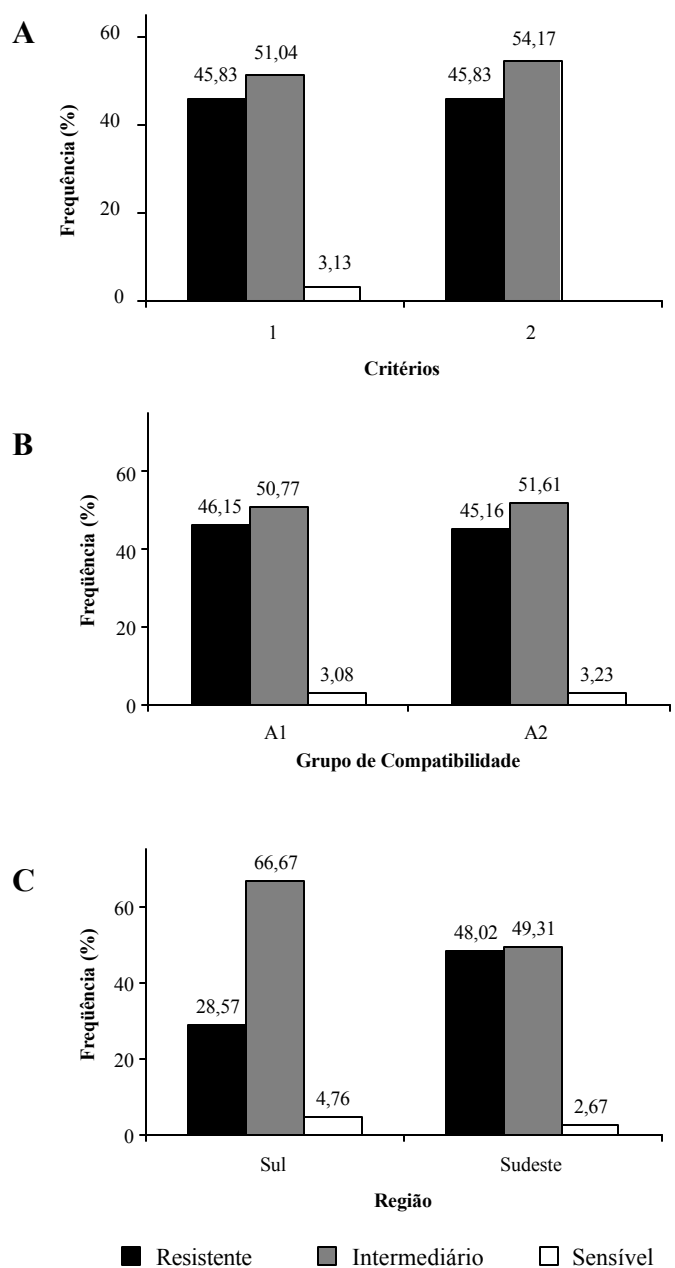


Figura 3: Frequência de isolados resistentes (R), intermediários (I) e sensíveis (S) ao metalaxyl, avaliada pelo método FRAC e distribuídos por: A) gráfico geral com os dois critérios de avaliação (1. Isolados em que a DL_{50} do produto variou entre 0,001 e 0,01 ppm foram considerados sensíveis; isolados em que a DL_{50} variou entre 0,01 e 10ppm foram considerados intermediários e isolados em que a DL_{50} ficou acima de 10ppm, foram considerados resistentes. 2. Foram considerados sensíveis os isolados em que a DL_{50} ficou abaixo de 10ppm e

resistentes os iguais ou acima disto); B) grupo de compatibilidade e
C) região amostrada

Capítulo III

DIVERSIDADE E COMPLEXIDADE DE PATÓTIPOS DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS* COLETADOS EM CAMPOS DE BATATA E TOMATE DAS REGIÕES SUL E SUDESTE DO BRASIL

RESUMO

Estudos de diversidade e de complexidade de patótipos têm sido conduzidos para melhor compreender os aspectos da biologia de populações de fitopatógenos e para subsidiarem táticas de manejo de resistência. Neste trabalho, investigaram-se a diversidade e a complexidade de patótipos de 87 isolados de *Phytophthora infestans*, agente etiológico da requeima da batateira e do tomateiro, coletados em campos de tomate e batata nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, nos anos de 1998 a 2000. Foi utilizada uma série de clones de batata (genes R1 a R5, R7 a R8 e R10 a R11) e variedades de tomate (genes *Ph1* e *Ph2*) diferenciadores de patótipos de *P. infestans*. Foram encontrados 43 patótipos, contendo de 3 a 11 genes cada um, sendo os isolados do grupo de compatibilidade A2 mais complexos que aqueles do grupo A1. Maior diversidade de patótipos, dentro das populações, foi observada na subpopulação da região

Sudeste e naquela formada por isolados coletados em 2000. Nas populações com maior diversidade de patótipos constatou-se menor complexidade. No geral, detectou-se alta diversidade entre as populações estudadas, as quais apresentaram poucos patótipos em comum.

ABSTRACT

Diversity and complexity of *Phytophthora infestans* pathotypes collected in potato and tomato fields in South and Southeast Brazil.

Studies on diversity and complexity of plant pathogen pathotypes have been carried out to understand basic population biology aspects and also to support development and deployment of resistant cultivars. In this study, analyses of pathotype diversity and complexity were carried out with 87 isolates of *Phytophthora infestans*, collected in potato and tomato fields in the South and Southeast regions of Brazil, during 1998 and 2000. For virulence assessment, potato clones carrying major genes (R1, R2, R3, R4, R5, R7, R8, R10, and R11) and tomato varieties carrying the *Ph1* and *Ph2* genes were used. Forty three pathotypes were determined. The number of virulence factors varied from 3 to 11 and the most complex pathotypes were found for isolates of the A2 mating type. Virulence gene 5 was the rarest one, followed by gene 8, while genes 3 and 4 were the most frequently found. Higher pathotype diversity within populations was found in the Southeast and in the 2000 populations. The less diverse populations had the the most complex pathotypes. High diversity was observed among populations according to Roger's index of diversity.

1. INTRODUÇÃO

Até algum tempo atrás, quando não havia ampla disponibilidade de técnicas moleculares para estudos de variabilidade genética, a virulência era uma das poucas características utilizadas como marcador para estudos de diferença entre os isolados de um fitopatógeno (McDonald & McDermott, 1993; Sujkowski *et al.*, 1996). Os estudos de variabilidade genética de populações de fitopatógenos baseavam-se, em grande parte, nas diferenças ou similaridades de virulência dentro e entre as populações estudadas. Os dados obtidos com os trabalhos de investigação de patótipos, além de utilizados para estudos de genética de população, são úteis para melhoristas e extensionistas que gostariam de desenvolver e propagar o uso de novas variedades resistentes para determinadas regiões, de modo que essas permaneçam efetivas por longo tempo no campo e que possam diminuir as perdas causadas por fitopatógenos (McDonald & McDermott, 1993).

Um dos patógenos cuja diversidade de agressividade e virulência tem sido mais investigado é *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary (Andrison, 1994; Forbes *et al.*, 1997; Goodwin *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1998; Sujkowski *et al.*, 1996), agente causal da requeima ou mela, uma das principais doenças da batateira e do tomateiro nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Souza Dias & Iamauti, 1997; Kurozawa & Pavan, 1997). Estudos de variação na virulência deste fitopatógeno vêm sendo desenvolvidos desde pelo menos a década de 50 (Black *et al.*, 1953; Cicarone *et al.*, 1959; Dowley *et al.*, 1975; Hermansen *et al.*, 2000; Malconson, 1969; Malconson, 1979; Peters *et al.*, 1998; Tooley *et al.*, 1986).

Os problemas causados por esta doença tornaram-se muito mais sérios após a migração de novos genótipos do México, centro de origem de *P. infestans*, para outros países (Fry *et al.*, 1992; Fry & Goodwin, 1997). A maioria dos novos genótipos, por apresentar características superiores de adaptabilidade, representa um problema a mais para o manejo da doença. O organismo *P. infestans* é heterotático e contém dois grupos de compatibilidade, A1 e A2 (Erwin &

Ribeiro, 1996). Com as migrações, novos genótipos de *P. infestans*, dos dois grupos de compatibilidade, foram dispersos para locais onde antes só havia isolados do grupo A1, possibilitando a ocorrência de reprodução sexuada (Goodwin *et al.*, 1994). Ademais, a maioria dos novos genótipos é resistente ao metalaxyl, fungicida mais eficiente no controle da doença até pouco tempo, e são mais agressivos e, ou, virulentos que os genótipos antigos. Estes fatos contribuíram para despertar o interesse pelo conhecimento da variabilidade genética de população de *P. infestans* nas duas últimas décadas (Fry & Goodwin, 1997).

Os novos genótipos ou linhagens clonais de *P. infestans* apresentam diversidade e complexidade de virulência distintos dos genótipos preexistentes (Goodwin *et al.*, 1995). A diversidade de virulência dos novos genótipos é, em geral, menor do que a do genótipo antigo ou linhagem clonal US-1, a qual também foi menos diversa do que a população de *P. infestans* do México, que apresenta reprodução sexuada (Goodwin *et al.*, 1995). Entretanto, a complexidade das patótipos pertencentes às novas linhagens clonais é maior que em US-1 (Andrison, 1994). Situação idêntica ocorre na Polônia (Sujkowski *et al.*, 1996), no Equador (Forbes *et al.*, 1997) e no Canadá (Peters *et al.*, 1998). Nesses estudos, por meio de índices, foi possível investigar aspectos importantes da virulência de *P. infestans* tais como descrição do número de fenótipos, a distribuição de frequência de cada patótipo e o grau de sobreposição fenotípica entre duas ou mais populações separadas no tempo ou no espaço (Andrison, 1994; Kolmer, 1991).

No Brasil, estudos recentes apontaram a existência de duas linhagens clonais de *P. infestans*. A linhagem US-1 é composta por isolados do grupo de compatibilidade A1, causa requeima em tomateiro e é considerada uma linhagem antiga. A linhagem BR-1 é composta por isolados do grupo de compatibilidade A2, causa requeima em batateira e, possivelmente, foi introduzida mais recentemente no país (Goodwin *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 2000). Porém, há escassez de informações acerca da composição de patótipos de *P. infestans* no Brasil. O primeiro estudo de variabilidade de patótipos de *P. infestans* foi

realizado em São Paulo, no qual se utilizou a antiga série diferenciadora de patótipos composta por apenas quatro genes de resistência, R1 a R4 (Ciccarone *et al.*, 1959). Na época, constatou-se que, apesar de os isolados serem todos A1 (provavelmente US-1), em batata predominaram os patótipos 4 e 1,4, enquanto que em tomate os patótipos 3 e 3,4. Mais tarde, outro estudo foi conduzido no Brasil, com um série diferenciadora mais ampliada e foi verificado a predominância dos genes de avirulência complementares aos genes R1, R2, R4, R10 e R11 em batata (Castro e Shaw, 1992).

As populações de *Phytophthora infestans* têm alta variabilidade genética e a frequência e distribuição de patótipos é dinâmica (Ciccarone *et al.*, 1959; Castro & Shaw, 1992). O que ocorre em um ano em um dado local pode ser alterado em curto espaço de tempo. Monitoramento e estudos atuais são importantes para compreender melhor a genética de populações de *P. infestans*. Por essa razão, delineou-se este estudo com o objetivo de determinar e comparar a diversidade e complexidade de virulência dentro e entre as populações de *P. infestans* das regiões Sudeste e Sul do Brasil de 1998 a 2000, bem como das subpopulações dos grupos A1 e A2 e das hospedeiras batata e tomate. Os patótipos foram determinados com ajuda de uma série diferenciadora de clones de batata e cultivares de tomate apresentando genes para resistência vertical (Van Der Plank, 1968) a *P. infestans*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *Phytophthora infestans*. Oitenta e sete isolados foram coletados, durante os anos de 1998 a 2000, em lavouras comerciais e experimentais de tomate estaqueado e de batata das regiões Sul e Sudeste (principais regiões produtoras destas duas hortaliças no Brasil). Os isolados foram previamente caracterizados para o grupo de compatibilidade, fenótipo para a enzima glucose 6 – fosfato isomerase (*Gpi*) e sensibilidade ao fungicida metalaxyl, sendo alguns

caracterizados para a enzima Peptidase (*Pep*) e submetidos à análise de RFLP do DNA genômico com a sonda RG-57 (Reis *et al.*, 2000).

Determinação de patótipos: A virulência de cada isolado foi determinada por meio de testes em folíolos destacados (Tooley *et al.*, 1986) e, ou, discos de folhas (Peters *et al.*, 1998; Hermansen, 2000). Foram utilizados nove clones diferenciadores de batata correspondentes aos genes simples R1, R2, R3, R4, R5, R7, R8, R10 e R11 e dois de tomate correspondentes aos genes *Ph1* (New Yorker) e *Ph2* (Caline). Como testemunhas, foram utilizadas a cultivar de batata Bintje e o de tomate Santa Cruz Kada, sem genes de resistência vertical a *P. infestans*. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação e utilizadas no período de 6 a 9 semanas de idade. Nos testes com folíolos, três destes foram depositados em câmaras úmidas (gerbox com papel de filtro umedecido), com a superfície abaxial voltada para cima. Foram utilizados dois gerbox para cada isolado. Nos testes com discos de folhas, cinco discos (15mm de diâmetro) de folíolos de cada diferenciadora foram postos para flutuar em duas placas de Petri plásticas de 5 ou 9 cm, contendo 10 ml de água esterilizada.

De lesões, em folíolos destacados de tomate e batata, obtiveram-se esporângios, com os quais preparou-se suspensão de $2 - 2,5 \times 10^4$ esporângios/ml. Desta suspensão, depositou-se 30 μ l em cada folíolo ou disco. As placas ou gerbox foram mantidos em câmara incubadora a $18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas por sete dias. Após este período, os discos ou folíolos foram observados sob microscópio estereoscópio para presença ou ausência de esporulação de *P. infestans*. No caso de haver esporulação em pelo menos três dos dez discos ou esporulação abundante em um destes, a interação foi considerada positiva. Apenas naqueles isolados em que se observaram lesões grandes e bem esporuladas nas cultivares testemunhas é que se considerou válido o teste. Do contrário, o ensaio foi repetido. Todos os isolados, com exceção de oito, foram testados por pelo menos duas vezes. O número de genes de virulência de cada isolado foi determinado com base no número de interações compatíveis sobre a série diferenciadora de tomate e batata (Tooley *et al.* 1986).

Análise dos dados: A diversidade de patótipos dentro das populações do Brasil foi analisada nas seguintes comparações de interesse: Sul e Sudeste, grupos A1 e A2, tomate e batata e dos anos de 1998 e 2000. Para tal, foram calculados os seguintes índices de diversidade: Índice de Simpson $H_s = 1 - \sum [ni(ni - 1)/Ni(Ni - 1)]$, onde ni = número de indivíduos com o iésimo fenótipo e Ni é o número de isolados testados. Índice de Shannon $H_w = - \sum pi \cdot \ln(pi)$, onde pi = frequência do iésimo fenótipo, é indicativo do número de fenótipos distintos e uniformidade (“evenness”) da distribuição de frequência de fenótipos. Índice de Gleason $H_g = (N_p - 1)/\ln(N_i)$, onde N_p = número de patótipos diferentes e N_i é o número de isolados testados, é indicativo do número de fenótipos (patótipos) obtidos em um dado tamanho de amostra. (Andrison, 1994; Kolmer, 1991; Kolmer, 1992; Manisterki *et al.*, 2000). Os índices de Shannon e de Gleason são afetados pelo tamanho da amostra. Assim, foram utilizadas formas corrigidas desses índices para minimizarem os erros. O índice de Shannon foi corrigido como $H_{wr} = H_s/\ln(N_i)$ e o de Gleason como $H_{gr} = (N_p - 1)/(N_i - 1)$ (Andrison, 1994).

A diversidade de patótipos entre populações foi calculada pelo índice de Roger $H_r = 0,5 \sum |P_{i1} - P_{i2}|$. Este índice varia de 0,0 (quando as populações possuem os mesmos genes de virulência, nas mesmas frequências) a 1,0 (quando as duas populações não possuem qualquer patótipo em comum). Calculou-se também a complexidade de virulência pelos índices $C_i = \sum (P_i Y_i)$ (número médio de genes de virulência por isolado) e $C_p = \sum Y_i / N_p$ (número médio de genes de virulência por patótipo), onde Y_i = número de genes de virulência do iésimo patótipo, para todas as populações descritas acima (Andrison & Vallavieille-Pope, 1993).

3. RESULTADOS

Com base nas reações nos nove clones diferenciadores de batata e das duas variedades diferenciadoras de tomate, os 87 isolados testados foram

classificados em 43 patótipos. Considerando todos os isolados coletados, apenas cinco patótipos apresentaram frequência entre 5% e 8%. Vinte e sete patótipos foram detectados apenas uma vez na população total amostrada. O número de genes de virulência variou de 3 a 11 por patótipo sendo detectado, em média, sete deles por isolado testado (Tabela 1).

Foram detectados 17 patótipos entre os 30 isolados coletados na Região Sul e 36 entre os 57 obtidos da Região Sudeste. Apenas 10 patótipos foram comuns às duas regiões. Na Região Sul havia apenas três isolados com frequência superior a 10%, enquanto que na Região Sudeste, apenas um.

Entre as subpopulações dos grupos A1 e A2 foram identificados 27 patótipos entre os 51 isolados do grupo A1 e 21 patótipos entre os 36 isolados do grupo A2. Cinco patótipos foram de ocorrência comum e dois ocorreram com frequência acima de 10% no grupo de isolados A1 e apenas um ocorreu com frequência acima de 10% dentre aqueles patótipos do grupo A2.

Quanto à hospedeira, foram caracterizados 25 patótipos entre os 45 isolados coletados em campos de tomate e 24 entre os 42 isolados coletados em campos de batata. Seis patótipos em comum às duas hospedeiras. Em tomate, foram detectados apenas dois patótipos com mais de 10% de frequência e apenas um em batata.

Finalmente, entre os isolados coletados nos dois anos amostrados, verificou-se a ocorrência de 17 patótipos entre os 31 isolados coletados em 1998 e de 34 patótipos entre os 54 isolados coletados em 2000. Nove patótipos foram observados em ambos os anos e três apresentaram frequência superior a 10% em 1998. Entretanto, nenhum patótipo ocorreu com frequência superior a 10% entre os isolados coletados em 2000. Em alguns casos, isolados de um mesmo campo foram classificados como diferentes patótipos (dados não-apresentados).

As cultivares de tomate e, ou, clones de batata diferenciadores de patótipos de *P. infestans*, individualmente, variaram muito quanto à suscetibilidade aos isolados testados e entre aqueles dos diferentes grupos de compatibilidade (Figura 1). No geral, R5 foi suplantado com menor frequência (13,8%) pelos 87 isolados testados, seguido pelos genes R3 (26,4%), R2 (37,9%)

e R1 (41,4%). Os genes de virulência complementares a R3 e R4 apresentaram a mesma frequência (96,6%), sendo R3 e R4, portanto, suplantados por quase todos os isolados testados. Os clones com os genes R2, R5 e R8, quando suplantados, na maioria das vezes, observou-se pouca esporulação e esta ocorria apenas ao redor do ponto de inoculação.

Dentro dos grupos de compatibilidade, observou-se que os genes de virulência mais raros, como aqueles complementares à R5 e R8, ocorreram com maior frequência nos isolados do grupo A2. Para o gene de virulência associado a R2, maior frequência de patótipos foi observada entre os isolados do grupo A1 (47,1%) em comparação com A2 (25,0%). O gene de virulência 5, complementar a R5, praticamente não foi detectado nos patótipos menos complexos. Os genes *Ph1* e *Ph2* foram suplantados com maior frequência, 100 e 98%, respectivamente, por isolados do grupo A1 os quais são todos, com exceção de cinco isolados, originários de tomate. Observou-se que nas cultivares de tomate com os genes *Ph1* e *Ph2*, quando suplantados por isolados do grupo A2, havia pouca esporulação do patógeno.

Observou-se variação quanto à diversidade e complexidade de patótipos dentro das populações de *P. infestans* estudadas. As tendências para diversidade e complexidade foram semelhantes com o uso de praticamente todos os índices, sejam eles absolutos ou corrigidos (Tabela 2). Dentro da população formada pelos isolados da Região Sudeste foi verificada maior diversidade de patótipos comparado à diversidade dentro da subpopulação formada pelos isolados da Região Sul (Tabela 2). Quando os isolados foram divididos em populações com base no grupo de compatibilidade, observou-se que a diversidade dentro da população de isolados do grupo A1 (linhagem US-1) foi maior que dentro da população do grupo A2 (linhagem BR-2), de acordo com os índices de Shannon e de Gleason não corrigidos. Entretanto, quando se aplicou a correção para tamanho de amostra, os resultados foram alterados e maior diversidade foi observada dentre os isolados do grupo A2. Não houve diferenças acentuadas entre os índices de diversidade para as populações oriundas de tomate ou de

batata. Maior diversidade foi encontrada dentro dos isolados coletados no ano de 2000 comparada àquela estimada para os isolados coletados em 1998.

A complexidade dos patótipos variou de 3 genes de virulência (complementares a R4, *Ph1* e *Ph2*), em um isolado coletado em tomate (grupo A1) na Região Sudeste em 2000, a 11 genes em dois isolados de batata (grupo A2) e um de tomate (A1) (Tabela 1). Maior complexidade de patótipos, de acordo com os dois índices calculados (C_i e C_p), foi encontrada para as populações que apresentaram menor diversidade (Tabela 2). Os isolados da região Sul apresentaram menor diversidade de patótipos comparada aos dos isolados do Sudeste, mas os patótipos eram mais complexos. A população A2, menos diversa pelos índices de Shannon e Gleason, foi mais complexa ($C_i = 8,00$ e $C_p = 7,57$) que a população A1 ($C_i = 6,31$ e $C_p = 6,37$) (Tabela 2). Em consequência, a população de isolados de batata é muito mais complexa que a de tomate e a de 98, que era muito menos diversa, é mais complexa que a de 2000 para o índice C_i e praticamente igual para C_p . Portanto, no geral, as populações mais diversas eram as menos complexas e vice versa.

Quando comparadas duas a duas pelo índice de Roger (diversidade entre subpopulações afins), as diferentes populações apresentaram, no geral, altos índices de dissimilaridade entre si (Tabela 3). Na população do Brasil, uma alta diversidade de patótipos foi detectada entre as subpopulações dos grupos A1 e A2 ($H_r = 0,85$), seguido pelas de tomate e batata ($H_r = 0,82$). Esta última comparação foi altamente relacionada à primeira face a alta especificidade de hospedeiro (os isolados do grupo A1 causam requeima em tomate e os do grupo A2, em batata). Menor diversidade entre as populações foi encontrada entre as subpopulações de 1998 e 2000 e entre as subpopulações do Sul e do Sudeste.

Ao analisar somente as subpopulações da região Sul, constatou-se que a diversidade foi maior quando se compararam as subpopulações formadas com base no hospedeiro - tomate e batata ($H_r = 0,82$), seguida das subpopulações definidas com base no ano de coleta (1998 ou 2000) ($H_r = 0,78$) e menor entre as subpopulações formadas com base nos grupos de compatibilidade A1 e A2 ($H_r = 0,73$) (Tabela 3).

Ao analisar somente as subpopulações da região Sudeste, a diversidade foi maior entre as subpopulações formadas com base nos grupos de compatibilidade A1 e A2 ($H_r = 0,90$), seguida das subpopulações de acordo com o hospedeiro - tomate e batata ($H_r = 0,87$) e menor nas subpopulações formadas com base no ano de coleta 1998 e 2000 ($H_r = 0,73$) (Tabela 3).

4. DISCUSSÃO

Há alta diversidade e complexidade de patótipos de *P. infestans* do Brasil. Em ambas as linhagens clonais foram detectados 43 patótipos, que variaram de simples a complexos e que ocorreram com diferentes frequências. Há uma relação de um patótipo para aproximadamente cada dois isolados testados.

Os resultados de estudos anteriores sugeriram que havia alta diversidade genética de isolados de *P. infestans* no Brasil (Ciccarone *et al.*, 1959; Castro & Shaw, 1992). No presente estudo ampliou-se o número de clones diferenciadores e incluíram-se duas cultivares de tomate. Dessa forma, foi possível detectar um número ainda maior de patótipos. Se a série diferenciadora fosse limitada aos clones utilizados no trabalho anterior (R1 a R4) (Ciccarone *et al.*, 1959), observa-se que a diversidade de patótipos atual é maior que a observada por esses autores.

O grande número de patótipos de *P. infestans* (43) encontrado neste trabalho pode ser devido não só à alta diversidade da população mas também ao critério adotado para avaliação dos ensaios. Este pode ter proporcionado um alto número de combinações de genes de virulência e, com isso, superestimado o número de patótipos em cada população estudada. Entretanto, este mesmo critério tem sido utilizado em outros estudos de diversidade de patótipos de *P. infestans* (Tooley *et al.*, 1986; Hermansen, *et al.*, 2000). Os resultados encontrados por outros autores indicaram uma proporção de um patótipo para cada dois (Tooley *et al.*, 1986) ou para cada 3,5 isolados testados (Hermansen, *et al.*, 2000) e, em média, foram semelhantes aos relatados neste trabalho.

A baixa frequência de isolados apresentando o mesmo fenótipo pode ser devido a problemas de amostragem. É possível que o número de isolados testados não tenha sido suficiente para detecção de um mesmo patótipo com maior frequência. Entretanto, em outros trabalhos, o número de isolados utilizado foi semelhante ao deste (Forbes *et al.*, 1997; Goodwin *et al.*, 1995; Sujkowski *et al.*, 1996), e foram encontradas números e frequências de patótipos tanto similares ao observado neste trabalho (Goodwin *et al.*, 1995) como diferentes (Forbes *et al.*, 1997; Sujkowski *et al.*, 1996). Além disso, neste trabalho número de isolados testados por campo foi pequeno (um a três, sendo na maioria das vezes apenas um) e deve ter contribuído para esta observação. Mesmo os isolados coletados em um mesmo campo e, ou, região na maioria das vezes não apresentavam o mesmo fenótipo, o que indica alta diversidade de patótipos. Possivelmente, altas taxas de mutação nos genes de avirulência estejam ocorrendo, pois a população de *P. infestans* tem estrutura clonal e não há evidências de recombinação (Reis *et al.*, 2000).

A virulência sobre os genes R5, R8 e R2 foi bastante rara, indicando uma tendência de fixação dos seus genes complementares de avirulência na população brasileira de *P. infestans*. Enquanto isto, a virulência sobre os genes R3 e R4 está próxima da fixação, apesar da provável inexistência destes genes nas variedades comerciais de batata do Brasil. Este fato indica que a seleção exercida por parte dos genes R não é responsável por esta fixação. Os resultados obtidos coincidem com aqueles obtidos por Hermansen *et al.* (2000) nas populações de *P. infestans* da Finlândia e da Noruega. Em outros trabalhos, também os genes de virulência 5 e, ou, 8 foram raros na população estudada (Forbes *et al.*, 1997; Oyarzun *et al.*, 1998; Sujkowski *et al.*, 1996; Tooley *et al.*, 1986). Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho diferem muito daqueles obtidos por Castro e Shaw (1992) os quais encontraram maior incidência de fatores de virulência para os genes R1, R2, R4, R10 e R11, havendo apenas coincidência de resultados para o gene R4. Mudanças na composição das populações de *P. infestans*, amostragem em regiões distintas e até mesmo diferenças de metodologia podem explicar, ao menos em parte, a divergência de resultados. Pelo observado neste trabalho, em

muitos campos e, ou, regiões, os genes R5 e R8 poderiam prevenir ou permitir um atraso no início da epidemia no campo em determinada estação de cultivo. Entretanto, a duração de seu efeito provavelmente não seria longa.

Os genes *Ph1* e *Ph2* foram suplantados por quase todos os isolados de tomate testados (linhagem US-1). Este resultado indica que os fatores de virulência para estes genes de resistência estão praticamente fixados nesta população, apesar da provável inexistência dos genes *Ph1* e *Ph2* nas cultivares e híbridos de tomate usados no Brasil. Estas observações se assemelham àquelas de Goodwin *et al.* (1995) e Oyarzum *et al.* (1998) com isolados provenientes de tomates da América do Norte e Equador, respectivamente.

O fato de os genes de virulência mais raros aparecerem quase exclusivamente nos patótipos mais complexos foi observado em outros trabalhos (Andrivon, 1994; Forbes *et al.*, 1997; Oyarzum *et al.*, 1998). Andrivon (1994) afirma que esta tendência deve ser característica das peculiaridades evolutivas de *P. infestans*. Uma destas características seria uma maior influência da mutação em relação a recombinação genética na evolução de patótipos de *P. infestans*, assim como observado em populações de *Puccinia striiformis*, principalmente aquelas de reprodução assexuada (Welling & McIntosh, 1990).

As populações analisadas diferiram em muito na sua diversidade e complexidade de patótipos. A tendência de maior diversidade de patótipos na antiga linhagem clonal US-1 (grupo A1), comparado com a nova linhagem BR-1 (grupo A2) na população de *P. infestans* do Brasil está de acordo com observações de outros autores que investigaram a população de *P. infestans* da América do Norte, Equador e Canadá (Goodwin *et al.*, 1995; Forbes *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 1998). Segundo estes últimos autores, esta situação deve ser reflexo do acúmulo de mutações na linhagem US-1, depois de longo tempo de reprodução exclusivamente assexuada. A diversidade entre as populações obtidas de tomate e de batata é reflexo da diversidade encontrada entre US-1 e BR-1 devido a associação de cada uma destas linhagens com um dos hospedeiros.

A tendência de maior complexidade de patótipos encontrada na linhagem BR-1 parece ser regra geral entre as novas linhagens, introduzidas recentemente.

Esta tendência também foi observada em outros estudos com populações de *P. infestans* de locais onde ainda havia ou há a presença de linhagens novas e antigas como na Polônia (Sujkowski *et al.*, 1996); Equador (Forbes *et al.*, 1997) e Canadá (Peters *et al.*, 1998). A seleção promovida por genes R não deve ser a razão para a presença de patótipos complexos em BR-1. Este alto número de genes de virulência talvez tenha sido introduzido juntamente com esta linhagem e tenha permanecido na população, mesmo sem necessidade, assim como deve ter ocorrido no Equador (Forbes *et al.*, 1997). Estes autores afirmam que estas observações suportam o argumento de que a seleção estabilizadora, preconizada por Van der Plank (1968), não é importante no patossistema *P. infestans* x batata. Apesar de os resultados aqui relatados apontarem para uma conclusão semelhante, não é possível inferir sobre esse aspecto com segurança.

A diversidade de patótipos encontrada entre as populações de *P. infestans* das regiões Sul e Sudeste possivelmente não ocorre pela pressão de seleção por parte da hospedeira, uma vez que as variedades de tomate e batata cultivadas nas duas regiões são praticamente as mesmas. Além disso, somente a mutação não seria suficiente para causar toda a diversidade constatada. Outros mecanismos evolutivos que podem estar atuando para a existência desta diversidade entre populações devem ser a deriva genética que ocorre de estação para estação de cultivo, juntamente com um efeito fundador, conforme preconizado por Goodwin *et al.* (1992), para populações de *Rhynchosporium secalis* nos Estados Unidos. Também uma provável ausência ou baixa taxa de migração entre as duas regiões deve estar contribuindo para a diferenciação das populações do Sudeste e do Sul.

A grande diversidade de patótipos e a ampla ocorrência de patótipos complexos de *P. infestans* nas duas regiões amostradas, as quais são as principais produtoras de batata e tomate de mesa, praticamente inviabiliza a utilização de resistência vertical para controle da doença. Portanto, os programas de melhoramento genético de batata e tomate devem buscar a incorporação de resistência horizontal à requeima nas duas culturas.

5. REFERÊNCIAS

- ANDRIVON, D. Race structure and dynamics in populations of *Phytophthora infestans*. Canadian Journal of Botany. 72:1681-1687. 1994.
- ANDRIVON, D. & VALLAVIEILLE-POPE, C. Racial diversity and complexity in regional populations of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in France over a 5-year period. Plant Pathology. 42:443-464. 1993.
- BLACK, W., MASTENBROEK, C., MILLS, W.R. & PETERSON, L.C. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. Euphytica. 2:173-240. 1953
- CASTRO, C. & SHAW, D.S. Caracterização de isolados de *Phytophthora infestans* do Brasil. Fitopatologia Brasileira. 17:165. 1992.
- CICARONE, A., BLACK, W. & CRUZ, B.P.B. Observações preliminares sobre as raças de *Phytophthora infestans* no Estado de São Paulo, Brasil. Arquivos do Instituto biológico. 26:177-184. 1959.
- DOWLEY, L.J., ROUTLEY, D.G. & PEIRCE, L.C. Ontogenic predisposition of tomato foliage to race 0 of *Phytophthora infestans*. Phytopathology. 65: 1422-1424. 1975.
- FORBES, G.A., ESCOBAR, X.C., AYALA, C.C., REVELO, J., ORDOÑEZ, M.E., FRY, B.A., DOUCETT, K. & FRY, W.E. Population genetics structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. Phytopathology. 87:375-380. 1997.
- FRY, W.E. & GOODWIN, S.B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. Plant Disease. 87:1349-1357. 1997.
- FRY, W.E., GOODWIN, S.B., MATUSZAK, J.M., SPIELMAN, L.J. & MILGROOM, M.G. Population genetics and continental migrations of *Phytophthora infestans*. Annual Review of Phytopathology. 30:107-129. 1992.
- GOODWIN, S.B. The population genetics of *Phytophthora*. Phytopathology. 87:462-473. 1997.
- GOODWIN, S.B. & ALLARD, R.W. Hierarchical structure of pathogenic variation among *Rhynchosporium secalis* populations in Idaho and Oregon. Canadian Journal of Botany. 70:810-817. 1992.

- GOODWIN, S.B., COHEN, B.A. & FRY, W.E. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 91:11591-11595. 1994.
- GOODWIN, S.B., SUJKOWSKI, L.S. & FRY, W.E. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineage of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology*. 85: 669-676. 1995.
- GROTH, J.V. & ROELFS, A.P. Effect of sexual and asexual reproduction on race abundance in cereal rust populations. *Phytopathology*. 72: 1503-1507. 1982.
- GROTH, J.V. & ROELFS, A.P. The concept and measurement of phenotypic diversity in *Puccinia graminis* on wheat. *Phytopathology*. 77:1395-1399. 1987.
- HERMANSEN, A., HANNUKALA, A., NAERSTAD, R.H. & BRURBERG, M.B. Variation in populations of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. *Plant Pathology*. 49:11-22. 2000.
- KOLMER, J.A. Nonrandom distribution of virulence and phenotypic diversity in two populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in Canada. *Phytopathology*. 79:1313-1317. 1989.
- KOLMER, J.A. Phenotypic diversity in two populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in Canada during 1931-1987. *Phytopathology*. 81:311-315. 1991.
- KUROZAWA, C. & PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. & REZENDE, J.A.M. (eds.). *Manual de Fitopatologia*. Vol.2. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo. 3^a Ed. Ceres. 1997. p.690-719.
- MALCONSON, J.F. Races of *Phytophthora infestans* occurring in Great Britain. *Transactions of the British Mycological Society*. 53:417-423. 1969.
- MALCONSON, J.F. Isolation and identification of races of *Phytophthora infestans* from breeders' assessment plots. *Transactions of the British Mycological Society*. 73:155-156. 1979.
- MANISTERKI, J., EYAL, Z., BEM-YEHUDA, P. & KOSMAN, E. Comparative analysis of indices in the study of virulence diversity between and within populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in Israel. *Phytopathology*. 90: 601-607. 2000.

- McDONALD , B.A. & MCDERMOTT, J.M. Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience*. 43:311-319. 1993.
- PETERS, R.D., PLATT, H.W. & HALL, R. Changes in race structure in Canadian population of *Phytophthora infestans* based on specific virulence to selected potato clones. *Potato Research*. 41:355-370. 1998.
- REIS, A., SMART, C.D, FRY, W.E., MAFFIA, L.A. & MIZUBUTI, E.S.G. A população de *Phytophthora infestans* no Brasil continua clonal e apresenta alta especialização por hospedeiro. *Fitopatologia Brasileira*. 25:466. 2000.
- ROELFS, A.P. & GROTH, J.V. A comparison of virulence phenotypes in wheat stem rust populations reproducing sexually and asexually. *Phytopathology*. 70:855-862. 1980.
- SOUZA DIAS, J.A.C. & IAMAUTI, M.T. Doenças da batateira (*Solanum tuberosum* L.). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. & REZENDE, J.A.M. (eds.). Manual de Fitopatologia. Vol.2. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo. 3ª Ed. Ceres. 1997.
- SUJKOWSKI, L.S., GOODWIN, S.B. & FRY, W.E. Changes in specific virulence in Polish populations of *Phytophthora infestans*: 1985-1991. *European Journal of Plant Pathology*. 102: 555-561. 1996.
- TOOLEY, P.W., SWEIGARD, J.A. & FRY, W.E. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations. *Phytopathology*. 76:1209-1212. 1986.
- VAN DER PLANK, J.E. Disease Resistance in Plants. New York, Academic Press. 1968.
- WELLINGS, C.R. & MCINTOSH, R.A. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Australasia: pathogenic changes during the first ten years. *Plant Pathology*. 39:316-325. 1990.

Tabela 1. Frequência de patótipos de *Phytophthora infestans* agrupados de acordo com o grupo de compatibilidade A1 e A2, diferentes regiões produtoras, a cultura de origem ou ano de coleta.

Patótipo	Frequência (%)								
	Tomate	Batata	A1	A2	Sul	Sudeste	1998	2000	Brasil
1,2,3,4,5,7,8,10,11,Ph1,Ph2	2,22	4,76	1,96	5,56	6,90	1,72	9,68	0,00	3,45
1,2,3,4,5,7,10,11, Ph2	0,00	2,38	0,00	2,78	3,45	0,00	0,00	1,85	1,15
1,2,3,4,7,8,10,Ph1, Ph2	0,00	2,38	0,00	2,78	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
1,2,3,4,7,11, Ph1,Ph2	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
1,2,3,4,5,10,11	0,00	2,38	0,00	2,78	3,45	0,00	0,00	1,85	1,15
1,3,4,5,7,8,10,11, Ph1,Ph2	0,00	4,76	0,00	5,56	3,45	1,72	3,23	1,85	2,30
1,3,4,5,8,10,11,Ph1,Ph2	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	0,00	1,15
1,3,4,5,7,10,11, Ph1,Ph2	0,00	4,76	0,00	5,56	3,45	1,72	0,00	3,70	2,30
1,3,4,7,8,10,11, Ph1,Ph2	0,00	16,67	1,96	16,67	13,79	5,17	12,90	5,56	8,05
1,3,4,7,11, Ph1, Ph2	0,00	2,38	0,00	2,78	0,00	1,72	3,23	0,00	1,15
1,3,4,7,10,11, Ph2	0,00	2,38	0,00	2,78	3,45	0,00	0,00	1,85	1,15
1,3,4,7,10,11, Ph1,Ph2	0,00	7,14	0,00	8,33	0,00	5,17	0,00	5,56	3,45
1,3,4,7,8,10,11, Ph1	0,00	4,76	0,00	5,56	0,00	3,45	0,00	3,70	2,30
1,3,4,7,8,10,11, Ph2	0,00	4,76	0,00	5,56	0,00	3,45	0,00	3,70	2,30
1,3,4,7,8,10,11	0,00	2,38	0,00	2,78	0,00	1,72	3,23	0,00	1,15
1,3,4,7,10, 11	0,00	4,76	0,00	5,56	0,00	3,45	0,00	3,70	2,30
1,3,4,11	0,00	2,38	0,00	2,78	3,45	0,00	0,00	1,85	1,15
1,3,7,Ph1, Ph2	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
1,3,4,7,11, Ph1	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
1,4,7,10, 11, Ph2	0,00	2,38	0,00	2,78	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
2,3,4,7,10, Ph1, Ph2	4,44	4,76	5,88	2,78	0,00	6,90	6,45	3,70	4,60
2,3,4,7, Ph1, Ph2	13,33	0,00	11,76	0,00	17,24	1,72	12,90	3,70	6,90
2,3,4,10, Ph1, Ph2	2,22	0,00	1,96	0,00	3,45	0,00	0,00	1,85	1,15
2,3,4,10,11, Ph1, Ph2	4,44	0,00	3,92	0,00	3,45	1,72	3,23	1,85	2,30
2,3,4,7,10,11, Ph1,Ph2	6,67	7,14	5,88	8,33	10,34	5,17	16,13	1,85	6,90
2,3,4,7,11, Ph1, Ph2	6,67	4,76	9,80	0,00	6,90	5,17	3,23	7,41	5,75
2,3,4,11, Ph1, Ph2	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
2,4,10, Ph1, Ph2	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	3,23	0,00	1,15
3,4,5,7,8,10,11, Ph1,Ph2	0,00	2,38	0,00	2,78	0,00	1,72	3,23	0,00	1,15
3,4,5,10,11, Ph1, Ph2	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
3,4,7,10,11, Ph1, Ph2	6,67	2,38	7,84	0,00	6,90	3,45	0,00	7,41	4,60

Tabela 1., Cont.

Patótipo	Frequência (%)								
	Tomate	Batata	A1	A2	Sul	Sudeste	1998	2000	Brasil
3,4,7,8,10, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
3,4,10,11, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
3,4,7,10, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	3,23	0,00	1,15
3,4,7,11, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
3,8,10,11, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	3,23	0,00	1,15
3,4,7,8,10, <i>Ph1</i>	0,00	2,38	0,00	2,78	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
3,4,7, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	15,56	0,00	13,73	0,00	0,00	12,07	6,45	7,41	8,05
3,4,10, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
3,4,11, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	0,00	2,38	1,96	0,00	3,45	0,00	0,00	1,85	1,15
3,7,11, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	3,23	0,00	1,15
3,4, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	4,44	2,38	3,92	2,78	6,90	1,72	3,23	3,70	3,45
4, <i>Ph1</i> , <i>Ph2</i>	2,22	0,00	1,96	0,00	0,00	1,72	0,00	1,85	1,15
	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabela 2. Diversidade e complexidade de patótipos dentro de diferentes populações de *Phytophthora infestans* no Brasil.

População	Ni ^a	Np ^b	HS ^c	HW ^d	HWR ^e	HG ^f	HGR ^g	Ci ^h	Cp ⁱ
Brasil	87	43	0,97	3,48	0,78	9,40	0,49	7,01	6,79
Sul	30	17	0,94	2,71	0,80	4,70	0,55	7,52	7,18
Sudeste	57	36	0,97	3,34	0,83	8,66	0,63	6,76	6,89
Grupo A1	51	27	0,95	3,00	0,76	6,61	0,52	6,31	6,37
Grupo A2	36	21	0,96	2,87	0,80	5,58	0,57	8,00	7,57
Tomate	45	25	0,95	2,95	0,78	6,30	0,55	6,22	6,32
Batata	42	24	0,96	2,99	0,80	6,15	0,56	7,86	7,42
1998	31	17	0,94	2,62	0,76	4,66	0,53	7,42	6,47
2000	54	34	0,98	3,38	0,85	8,27	0,62	6,78	6,68

^aNi = Número de isolados, ^bNp = Número de patótipos (patótipos), ^cHs = Índice de Simpson, ^dHw = Índice de Shannon, ^eHWR = Índice de Shannon ajustado para pequenas populações, ^fHG = Índice de Gleason, ^gHGR = Índice de Gleason ajustado para pequenas populações, Ci e Cp Índices de complexidade (Andrison, 1994).

Tabela 3. Índice de Roger (Hr) de diversidade entre populações, comparadas duas a duas, de *Phytophthora infestans* do Brasil

Populações	Hr
Brasil	
Região Sul x Região Sudeste	0,70
Grupo A1 x Grupo A2	0,85
Tomate x Batata	0,77
1998 x 2000	0,69
Região Sul	
Grupo A1 x Grupo A2	0,73
Tomate x Batata	0,82
1998 x 2000	0,78
Região Sudeste	
Grupo A1 x Grupo A2	0,90
Tomate x Batata	0,87
1998 x 2000	0,73

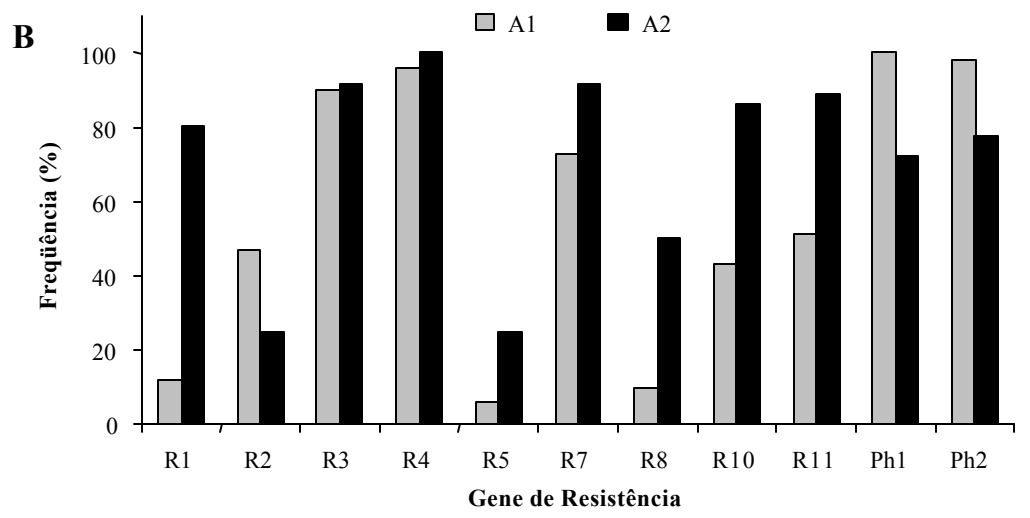
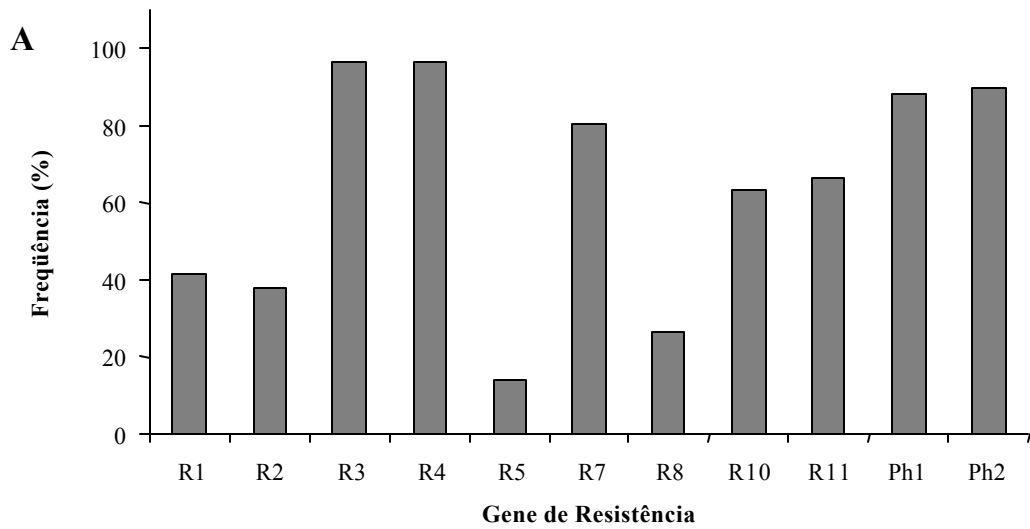


Figura 1. Frequência com que os genes de resistência são suplantados nas populações de *Phytophthora infestans* do Sul e Sudeste do Brasil (A) e dentro dos grupos de compatibilidade A1 e A2 (B).

CONCLUSÕES GERAIS

A população de *P. infestans* no Brasil continua clonal, com duas linhagens US-1 e BR-1. As principais características da linhagem US-1 são: grupo de compatibilidade A1, haplotipo mitocondrial Ib, perfil isoenzimático para Gpi e Pep 86/100 e 92/100, respectivamente e padrão de bandas na análise de 25 locos RFLP do tipo 1,3,5,7,9,10,13,14,16,20,21,24,25. As principais características da linhagem BR-1 são: grupo de compatibilidade A2, haplotipo mitocondrial IIa, perfil isoenzimático para Gpi e Pep 100/100 e 100/100, respectivamente e padrão de bandas na análise de RFLP do tipo 1,3,5,7,13,14,19,20,21,22,24,25.

As linhagens clonais são altamente especializadas em seus hospedeiros. Isolados da linhagem clonal US-1 causam requeima em tomate enquanto isolados da linhagem BR-1 em batata, predominantemente. Em dois locais, Viçosa, MG e Pelotas, RS, foram encontrados isolados de US-1 causando requeima em batata. Possivelmente, nesses locais, o inóculo para essas epidemias foi proveniente de campos de produção de tomate.

Existe isolados de *P. infestans* resistentes ao metalaxyl nos sete estados do Sul e Sudeste brasileiro e dentro das duas linhagens clonais, US-1 e BR-1. Parece não haver diferença entre as duas linhagens, quanto à resistência ao produto, ou seja, não é possível diferenciar as linhagens BR-1 de US-1 por meio

da resistência ao metalaxyl. Houve pouca correspondência entre os resultados dos testes de resistência ao metalaxyl quando se empregou o método do ágar e os métodos de disco de folha. Para maior confiabilidade dos resultados é necessário a utilização dos dois tipos de testes, para estudos de monitoramento da resistência de *P. infestans* ao metalaxyl.

Existe alta diversidade de raças dentro das populações de *P. infestans* no Brasil e baixa entre as mesmas. As raças, no geral, são complexas e as da linhagem BR-1 são mais complexas que as de US-1. Por estes motivos, programas de melhoramento de batata, devem dar maior ênfase a resistência quantitativa.