



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Filogenia e diversidade de espécies da família Pythiaceae
associadas com hortaliças folhosas no Brasil**

ÉLLEN JÚNIA CANEDO

RECIFE, PE

SETEMBRO, 2024.

ÉLLEN JÚNIA CANEDO

**Filogenia e diversidade de espécies da família Pythiaceae associadas
com hortaliças folhosas no Brasil**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutora em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Ailton
Reis Coorientador: Leonardo
Silva Boiteux

RECIFE - PE

SETEMBRO - 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Suely Manzi – CRB-4 809

C221f Canedo, Éllen Júnia.

Filogenia e diversidade de espécies da família Pythiaceae associadas com hortaliças folhosas no Brasil / Éllen Júnia Canedo. – Recife, 2024.

138 f.; il.

Orientador(a): Ailton Reis.

Co-orientador(a): Leonardo Silva Boiteux.

Tese (Doutorado)—Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em

1. Alface . 2. Filogenia. 3. Coentro. 4. Rúcula 5. Pythium . I. Reis, Ailton, orient. II. Boiteux, Leonardo Silva, coorient. III. Título

CDD 632

Filogenia e diversidade de espécies da família Pythiaceae associadas com hortaliças folhosas no Brasil

ÉLLEN JÚNIA CANEDO

Tese defendida e aprovada em: 27/09/2024

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Ailton Reis

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (UFRPE)

Prof. Dr. André da Silva Xavier (UFRPE)

Profa. Dra. Kamila Câmara Correia (UFCA)

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira (UFU)

RECIFE – PE

SETEMBRO - 2024

*Aos meus pais, Valdir Eustáquio Canedo
e Elzi Antônia de Melo Canedo, e a minha
irmã, Camila Gracielle Canedo de Araújo,
pelos sábios ensinamentos, pela motivação,
apoio incondicional e por sempre me dar o
melhor.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre comigo e por me permitir viver tantas bênçãos, e me ajudar nos momentos difíceis.

Ao meu pai, Valdir Eustáquio Canedo e a minha mãe, Elzi Antônia de Melo Canedo, por todo amor e apoio, e orações. A minha irmã, Camila Canedo, por ouvir meus desabafos, pela amizade e apoio. Aos meus familiares que estão/estiveram sempre na torcida pelo meu sucesso, especialmente a minha avó Dirce pelas orações e aos demais, avós (in memoriam), tios (as), primos (as), e amigos (as), duas ou três linhas não seriam suficientes para citá-los.

Ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela grande oportunidade de cursar o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Embrapa Hortaliças pela ótima infraestrutura cedida para o desenvolvimento da pesquisa. Ao corpo docente do PPGF da UFRPE pelos conhecimentos transmitidos. Especialmente ao Dr. Marco Gama, quando no início do curso, me sugeriu ir a Brasília desenvolver a tese, ideia que já tinha me passado vagamente pela mente, antes mesmo de ingressar no curso.

Ao meu orientador Dr. Ailton Reis, pela orientação, por tantos conhecimentos transmitidos, pelo ótimo acolhimento, presteza, pelo bom convívio, e por ter sido sempre disponível e humilde, o que tornou essa jornada mais leve.

Ao meu coorientador Dr. Leonardo Boiteux, por todo o apoio prestado para os sequenciamentos genômicos e pelas boas contribuições na elaboração da tese.

À Dra. Josiene Veloso, pelo suporte na realização das análises filogenéticas, e por toda paciência na transmissão de conhecimentos.

À Dra. Maria Esther do laboratório de Genômica da Embrapa Hortaliças pela grande contribuição nas PCRs e sequenciamento e por toda ajuda.

À todos os integrantes e ex- integrantes do Laboratório de Fitopatologia do CNPH (funcionários e estagiários), Athaise, Atos, David, Débora, Elenice, Dra. Alice, Dr. Carlos, Dr. Valdir, Cleberly, Bruno, Brendo, Fabiana Laís, Luana, Maria, Ruthe, Tiago, Wagner e Welington, pela troca de conhecimentos, pelo bom convívio e pelos momentos descontraídos. E a todas as pessoas que querem meu bem e rezaram por mim.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	15
INTRODUÇÃO GERAL	15
1. Introdução geral.....	16
2. A cadeia produtiva de hortaliças folhosas	18
3. Cultivo da alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	18
3.1 Aspectos gerais da cultura da alface.....	18
3.2 Doenças que afetam a cultura da alface.....	21
4. Cultivo do coentro (<i>Coriandrum sativum</i> L.).....	23
4.1 Aspectos gerais da cultura do coentro	23
4.2 Doenças que afetam a cultura do coentro.....	24
5. Cultivo da rúcula (<i>Eruca sativa</i>)	24
5.1 Aspectos gerais da cultura da rúcula	24
5.2 Doenças que afetam a cultura da rúcula	25
6. Cultivo da bertalha (<i>Basella alba</i>).....	26
6.1 Aspectos gerais da cultura da bertalha	26
6.2 Doenças que afetam a cultura da bertalha	27
7. <i>Pythium</i>	27
7.1 Filogenia de <i>Pythium</i> spp.	27
7.2 Espécies de <i>Pythium</i> como fitopatógenos	29
7.3 Modo de infecção da planta hospedeira	30
7.4 Ocorrência de <i>Pythium</i> em alface, coentro, rúcula e bertalha	31
8. Referências Bibliográficas.....	32
CAPÍTULO II.....	42
Diversidade de espécies e caracterização de isolados de três gêneros de oomicetos associados a cultivos da alface no Brasil: <i>Pythium</i> , <i>Globisporangium</i> e <i>Phytophythium</i>	42
Resumo	43
Abstract.....	44
Introdução	45
Material e métodos	46
Resultados.....	49
Discussão	67
Conclusões.....	68
Referências bibliográficas	69
CAPÍTULO III	72
Diversidade de espécies de <i>Pythium</i> e <i>Globisporangium</i> associados ao coentro no Brasil	72
Resumo	73
Abstract.....	74
Introdução	74
Material e métodos	75
Resultados.....	78
Discussão	93
Conclusões.....	95
Referências	95
CAPÍTULO IV	99
Identificação molecular de isolados de <i>Pythium</i> e <i>Globisporangium</i> associados com o cultivo da rúcula (<i>Eruca sativa</i>) no Brasil.....	99
Resumo	100
Abstract.....	100

Introdução	101
Material e métodos	102
Resultados.....	104
Discussão.....	113
Conclusões.....	115
Referências	116
CAPÍTULO V	119
Characterization of <i>Pythium</i> isolates causing leaf rot of <i>Basella alba</i> in Brazil	119
CONCLUSÕES GERAIS	1322
MATERIAL SUPLEMENTAR	133

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Setenta e oito isolados de oomicetos dos gêneros *Pythium*, *Phytophthium* e *Globisporagium* obtidos de alface em diferentes unidades federativas do Brasil, entre 2012 e 2023, que identificados no presente trabalho com base na região gênica Cox II..... 49

CAPÍTULO II

Tabela 1. Isolados do complexo *Pythium*, obtidos de coentro em diferentes sistemas de cultivo, em quatro estados do Brasil, entre 2021 e 2023 e identificados com base na região gênica Cox II 78

CAPÍTULO III

Tabela 1. Isolados, do complexo *Pythium*, obtidos de rúcula em diferentes sistemas de cultivo em três unidades federativas, entre 2022 e 2023 105

Quadro 1. Espécies de *Pythium* e seus respectivos hospedeiros na família Brassicaceae e seus locais de ocorrências..... 114

CAPÍTULO IV

Table 1. Leaf rot severity in *Basella alba* induced by five *Pythium* species isolates, in two inoculation assays 131

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Árvore filogenética baseada na informação da sequência Cox II de isolados de espécies de *Pythium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 53

Figura 2. Árvore filogenética baseada na informação da sequência Cox II de isolados de espécies de *Phytophythium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 54

Figura 3. Árvore filogenética baseada na informação da sequência Cox II de isolados de espécies de *Globisporangium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 57

Figura 4. Árvore filogenética baseada na informação de sequência da região ITS de isolados de espécies de *Pythium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 60

Figura 5. Árvore filogenética baseada na informação de sequência da região ITS de isolados de espécies de *Globisporangium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 62

Figura 6. Árvore filogenética baseada na informação de sequências concatenadas de Cox II e da região ITS de isolados de espécies de *Pythium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente

estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site 64

Figura 7. Árvore filogenética concatenada baseada na informação de sequência das regiões Cox II e ITS de isolados de espécies de *Globisporangium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site 66

CAPÍTULO II

Figura 1. Árvore filogenética das espécies de *Pythium* em coentro baseada em Cox II. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 81

Figura 2. Árvore de máxima verossimilhança das espécies de *Globisporangium* associadas com o coentro baseada no gene mitocondrial Cox II. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 83

Figura 3. Árvore filogenética das espécies de *Pythium* associadas com a cultura do coentro baseada na região ITS. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site 86

Figura 4. Árvore filogenética das espécies de *Globisporangium* associadas com o cultivo do coentro baseada na região ITS. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 88

Figura 5. Árvore filogenética concatenada das espécies de *Pythium* associadas com o cultivo do coentro baseada nas regiões Cox II e ITS. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 90

Figura 6. Árvore filogenética concatenada das espécies de *Globisporagium* associadas com o cultivo do coentro baseada nas regiões Cox II e ITS. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 92

CAPÍTULO III

Figura 1. Árvore filogenética das espécies de *Pythium* em rúcula baseada em Cox II. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 107

Figura 2. Árvore de máxima verossimilhança das espécies de *Globisporagium* obtidos de rúcula baseada na região Cox II. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 109

Figura 3. Árvore filogenética das espécies de *Pythium* ocorrendo em rúcula baseada na região ITS. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 111

Figura 4. Árvore filogenética concatenada das espécies de *Pythium* em rúcula baseada nas regiões Cox II e ITS. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site 113

CAPÍTULO IV

Figure 1. Field growing *Basella alba* plants displaying leaf rot symptoms, caused by a complex of *Pythium* species 127

Figure 2. Pathogenicity test in *Basella alba* plants employing the Pyt 911 isolate (three days after inoculation under greenhouse conditions). (A) mock-inoculated control; (B) leaves with a colonized agar disk and without injuries; (C) leaves with the colonized agar disc and wound with a sterile toothpick and (D) leaves with a sterile toothpick wound and no colonized agar disc..... 128

Figure 3. Overview of the pathogenicity tests carried out with *Basella alba* leaves under laboratory conditions employing the Pyt 911 isolate (*Pythium ultimum* var. *ultimum*). (A) leaves inoculated with colonized agar discs; (B) leaves with a colonized agar discs (three days after

inoculation); **(C)** leaves inoculated with colonized agar discs in association with wounds with a sterile toothpick; **(D)** leaves inoculated with colonized agar discs in association with wounds with a sterile toothpick (three days after inoculation); **(E)** control leaves wounded with sterile toothpick with no agar disc; **(F)** control leaves wounded with sterile toothpick without wounds and with no agar disc 129

Figure 4. Maximum likelihood tree of *Phytium* isolates based upon DNA sequences of *Cox2* gene, with isolates obtained in the present study (initial code Pyl). Numbers at the branches indicate support values (SH-aLRT (≥ 80)/ UFboot (≥ 95) and Bayesian posterior probability values (PP ≥ 0.95). “-” indicates no-significant support or absence of the node. Ex-types are highlighted in bold. *Phytophthora capsici* (CBS 128.23) was used as the outgroup. The scale bar indicates the estimated number of substitutions per site 130

RESUMO GERAL

O complexo *Pythium* engloba cinco gêneros de oomicetos com diversas espécies fitopatogênicas, que provocam sérios prejuízos à produção de hortaliças folhosas no Brasil. A presente pesquisa teve como objetivo identificar e caracterizar isolados do complexo *Pythium* coletados em cultivos de alface, coentro, rúcula e beralha no Brasil. Os isolados foram obtidos de plantas com sintomas de tombamento, podridão de raiz, podridão de fruto ou podridão de folhas, coletadas em campos de produção em diferentes regiões geográficas. Foram conduzidas análises filogenéticas empregando informações da região do espaço interno transcrito (ITS) e da região do gene codificador da citocromo c oxidase II (Cox II). Foram também conduzidos bioensaios para confirmação da patogenicidade dos isolados nas hospedeiras originais. Na cultura da alface predominaram isolados da espécie *Pythium tracheiphilum*, sendo também detectados isolados de *Pythium* sp., *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. graminicola* e *P. catenulatum*. Também foram detectados na alface isolados de espécies do gênero *Globisporangium*, incluindo *G. irregulare*, *G. spinosum*, *G. sylvaticum*, *G. acanthophoron*, *G. ultimum* e *G. splendens* além de uma espécie de *Phytopythium* (*P. helicoides*). No coentro foi observada a presença de diversas espécies de *Pythium*, como *P. oopapillum*, *P. aphanidermatum* e *P. sulcatum*, além da espécie *G. ultimum*. Na cultura da rúcula foram caracterizados nove isolados, sendo três classificados como *Pythium* sp., quatro como *P. oopapillum*, um como *G. irregulare* e outro como *G. ultimum*. Foram obtidos oito isolados do complexo *Pythium* causando podridão foliar em beralha no Brasil dos quais sete foram identificados como *G. ultimum* var. *ultimum* e um como *P. aphanidermatum*. Os testes de patogenicidade demonstraram que *P. aphanidermatum* induz lesões menores nas folhas de beralha, enquanto isolados de *G. ultimum* var. *ultimum* foram mais agressivos e mais prevalentes na cultura da beralha. Este estudo destaca a enorme diversidade de patógenos do complexo *Pythium* bem como a necessidade de um diagnóstico preciso destes oomicetos fitopatogênicos associados com este grupo de hortaliças folhosas no Brasil. Desta forma, o presente estudo fornece informações básicas que são cruciais para o manejo de doenças causadas por estes patógenos, auxiliando no desenvolvimento de estratégias de controle mais eficientes e sustentáveis que possam viabilizar o cultivo destas hortaliças. Essas informações também são essenciais para programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de cultivares com ampla gama de resistência contra os isolados mais representativos dentro deste grupo de patógenos.

Palavras-chave: Alface, beralha, coentro, rúcula, *Globisporangium*, *Phytopythium*.

GENERAL ABSTRACT

The *Pythium* complex encompasses five genera of oomycetes with several phytopathogenic species, which cause serious damage to the production of leafy vegetables in Brazil. The present research aimed to identify and characterize isolates of the *Pythium* complex collected from lettuce, coriander, arugula and bertalha crops in Brazil. The isolates were obtained from plants with symptoms of damping-off, root rot, fruit rot or leaf rot, collected in production fields in different geographic regions of Brazil. Phylogenetic analyzes were conducted using information from the internal transcribed spacer region (ITS) and the region of the gene encoding cytochrome c oxidase II (Cox II). Bioassays were also conducted to confirm the pathogenicity of the isolates in the original hosts. In lettuce, isolates of the species *Pythium tracheiphilum* were the most predominate, while isolates of *Pythium* sp., *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. graminicola* and *P. catenulatum* were also detected. Isolates of species of the genus *Globisporangium* were also found infecting lettuce, including *G. irregulare*, *G. spinosum*, *G. sylvaticum*, *G. acanthophoron*, *G. ultimum* and *G. splendens* in addition to a species of *Phytopythium* (*P. helicoides*). In coriander, the presence of several species of *Pythium* was observed, such as *P. oopapillum*, *P. aphanidermatum* and *P. sulcatum*, in addition to the species *G. ultimum*. Nine isolates were characterized in the arugula culture, three of which were classified as *Pythium* sp., four as *P. oopapillum*, one as *G. irregulare* and the other as *G. ultimum*. Eight isolates of the *Pythium* complex causing leaf rot on bertalha in Brazil were obtained, seven of which were identified as *G. ultimum* var. *ultimum* and one as *P. aphanidermatum*. Pathogenicity tests demonstrated that *P. aphanidermatum* induced smaller lesions on bertalha leaves, while isolates of *G. ultimum* var. *ultimum* were more aggressive and more prevalent in the bertalha culture. This study highlights the enormous diversity of causal agents of the *Pythium* complex as well as the need for an accurate diagnosis of these phytopathogenic oomycetes associated with this group of leafy vegetables in Brazil. Therefore, the present study provides basic information that is crucial for the management of diseases caused by these pathogens, helping to develop more efficient and sustainable control strategies that can enable the cultivation of these vegetables. This information is also essential for plant breeding programs that aim to develop cultivars with a wide range of resistance against the most representative isolates within this group of pathogens.

Keywords: Lettuce, bertalha, coriander, arugula, *Globisporangium*, *Phytopythium*.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Filogenia e diversidade de espécies da família Pythiaceae associadas com hortaliças folhosas no Brasil

1. Introdução geral

A cadeia produtiva de hortaliças representa grande importância para a economia brasileira. As hortaliças são caracterizadas pela sua grande diversidade, sendo um grupo composto por mais de 100 espécies de plantas alimentares de alto valor nutritivo, podendo ser consumida de diferentes formas: cruas, cozidas ou processadas, dependendo da espécie (Brainer, 2021). A produção de hortaliças folhosas, também conhecidas como verduras, faz parte desta cadeia e é representada por plantas herbáceas cujas folhas são consumidas. Esse grupo de hortaliças exige um manejo delicado tanto na produção quanto no transporte, sendo comercializado fresco. Além disso, essas plantas possuem um ciclo curto, necessitando de altos volumes de irrigação, adubação e preparo de solo (Zheng, et al 2021).

Diante da crescente demanda por hortaliças folhosas, é de extrema importância que os campos de cultivo sejam bem manejados desde a sua implantação. Um dos principais desafios que limitam essa cadeia produtiva são os problemas fitossanitários. Além disso, há uma limitação na variedade de produtos químicos e biológicos registrados para o controle de doenças no campo (CNA, 2017).

O complexo *Pythium* (aqui será designado apenas como *Pythium*) é composto por importantes agentes causais de doenças em hortaliças. Sua adaptação a ambientes terrestres e aquáticos lhe proporcionam alta capacidade de sobreviver no solo por longos períodos e rápida reprodução de propágulos quando infectam a hospedeira. Membros deste gênero produzem oósporos que são estruturas de resistência, praticamente perpetuando sua presença em solos infestados (Bollen, 1985). São patógenos que apresentam grande capacidade saprofítica, sendo considerados parasitas facultativos que apresentam preferência por atacar tecidos jovens das plantas (Ho, 2018). As espécies deste gênero estão associadas a podridão radicular, tombamento de mudas e podridão de tecidos vegetais que estejam em contato com o solo.

Uma análise abrangente do gênero *Pythium* foi conduzida, catalogando 106 espécies (Lévesque; De Cock 2004). No entanto, a literatura científica propõe aproximadamente 300 espécies, sendo que apenas metade dessas foram encontradas como patogênicas (Schroeder et al., 2013). Aproximadamente 160 espécies de *Pythium* são classificadas como agentes causais de doenças de plantas, sendo a maioria patógenos radiculares oportunistas (Rai et al., 2020).

No Brasil, as espécies de *Pythium* e sua distribuição geográfica ainda não são bem conhecidas. Algumas espécies foram isoladas e identificadas em diferentes culturas, como o *P. torulosum*, em abacaxi. A espécie *P. acanthicum* já foi registrada em cana-de-açúcar, enquanto que *P. deliense* foi identificada infectando as culturas do pimentão, tomate e cana-de-açúcar, e *Globisporangium irregulare* em abacaxi, amendoim, chicória, coentro e uva-do-brasil (Mendes et al., 1998; Embrapa, 2024). Associadas a diversas espécies de plantas daninhas, em áreas produtoras de hortaliças nos estados do Ceará, Goiás, Pernambuco e no Distrito Federal, foram identificadas seis espécies de *Pythium*: *P. aphanidermatum*, *P. oopapillum*, *P. orthogonon*, *P. myriotylum*, *P. sylvaticum* e *P. ultimum* var. *ultimum*; e duas espécies de *Phytophythium*: *P. chamaeophyon* e *P. oedochilum* (Barboza et al., 2022). Os relatos de ocorrência de *Pythium oopapillum* no Brasil estão limitados a *Ageratum conyzoides* no Distrito Federal e a alface no estado de São Paulo (Gonçalves et al., 2016; Barboza et al., 2022). A espécie *P. tracheiphilum* foi registrado em alface no Distrito Federal (Barboza et al., 2024). As espécies *P. oopapillum*, *Phytophythium helicoides*, *Pythium kashmirensense*, *P. middletonii*, *P. periplocum*, *P. segnitium* e *Phytophythium vexans* foram também detectadas em sistemas hidropônicos de alface e outras folhosas na região de São Paulo (Gonçalves et al., 2016). Em coentro, *P. irregulare* foi inicialmente relatado no Brasil (Infante et al., 2018). Recentemente, houve o primeiro relato de *P. aphanidermatum* causando podridão radicular do coentro no Brasil (Silva et al., 2024).

Para adoção de um manejo correto das doenças causadas por *Pythium* spp., tais como tombamento de mudas e podridões de raízes, é de fundamental importância o conhecimento da diversidade destes patógenos, uma vez que, as diferentes espécies de *Pythium* podem causar sintomas variados em uma mesma espécie de hortaliça, pois elas possuem diferenças em seu nível de patogenicidade. Além disso, em cultivos hidropônicos, onde as condições de umidade e temperatura são altamente controladas, a identificação da espécie pode ser crucial, devido às espécies de *Pythium* prosperarem em diferentes condições (Sutton et al., 2006).

Nesse sentido, quando tais informações estão disponíveis, se torna mais fácil definir o potencial de perdas e adotar manejo preventivo ao longo do cultivo. Sendo assim, é de fundamental importância o conhecimento da ocorrência das espécies destes patógenos presentes nos campos de cultivos de hortaliças folhosas distribuídos ao longo do país, a fim de que tal conhecimento possa subsidiar de forma eficiente manejos de prevenção e erradicação.

2. A cadeia produtiva de hortaliças folhosas

Hortaliças folhosas se caracterizam por serem plantas herbáceas, de folhas comestíveis. Tais hortaliças desempenham importante papel na alimentação humana, pois apresentam níveis elevados de nutrientes (minerais e vitaminas) fundamentais para o bom funcionamento do organismo. Além disso, são fontes de fibras e apresentam baixo teor calórico, tornando-as importantes aliadas da alimentação saudável (Asaolu et al., 2012).

O percentual de participação das regiões brasileiras na comercialização hortigranjeira tem se mantido constante nos últimos anos (Conab, 2023). A região Sudeste representa 53% com 9.150.716 toneladas. A região Nordeste logo em seguida, com 24% (4.222.389 toneladas), o Sul corresponde com 12% (2.110.584 toneladas), seguido da região Centro-Oeste, representando 9% da comercialização (1.642.172 toneladas) e por fim, a região Norte com 2% correspondendo a aproximadamente 275.419 toneladas (Conab, 2023).

Além da importância alimentar, as hortaliças folhosas representam papel importante na diversificação da produção agrícola e na geração de emprego e renda. Um hectare plantado com hortaliças folhosas gera entre três a seis empregos diretos e quantidade equivalente em empregos indiretos (Figueiredo, 2015).

O atrativo de produção de hortaliças folhosas se respalda no fato de que a produção pode ser viável até mesmo em pequenas áreas, exigindo um baixo nível de investimento para se iniciar na atividade (Junqueira; Almeida, 2010). Ao longo do ciclo produtivo, fatores como altas temperaturas e alta ocorrência de chuvas fornecem condições ideais para proliferação de patógenos, provocando desequilíbrios na relação hospedeiro x patógeno x ambiente, conhecida como triângulo da doença (Filgueira, 2000). Este desequilíbrio é capaz de proporcionar grandes prejuízos aos agricultores.

3. Cultivo da alface (*Lactuca sativa* L.)

3.1 Aspectos gerais da cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça pertencente à família Asteraceae. Está inserida no agrupamento das olerícolas e é uma das folhosas com maior relevância global. Existem evidências de que a sua domesticação tenha sido feita a partir da espécie selvagem *Lactuca serriola* L. (Jagger et al, 1941; Vries, 1997). A alface é uma das hortaliças mais consumidas no Brasil e no mundo (Henz; Suinaga, 2009). De acordo com os dados do Censo

Agropecuários de 2017 (IBGE, 2017), a alface foi plantada em 108.382 estabelecimentos agropecuários e a produção foi de 671.509 toneladas.

A alface é amplamente cultivada no mundo todo, e de acordo com os dados publicados pela FAO (2018), a China, Estados Unidos, Índia, Espanha, Itália, Japão, Irã, Turquia, México e Alemanha são os maiores produtores. Na safra de 2021/22 a área cultivada no Brasil na época do verão foi de 13.273 hectares e no inverno de 11.646 hectares unindo os estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Cepea, 2023).

Além da relevância econômica do cultivo de hortaliças folhosas, está a questão socioeconômica, no que tange a geração de empregos, renda e desenvolvimento de diferentes elos de toda a cadeia produtiva (Junqueira; Almeida, 2010). Aliado a isso, o cultivo da alface é predominantemente praticado pela agricultura familiar, com uma produção intensiva que, de acordo com Sousa et al., (2014), gera até cinco empregos por hectare plantado.

Em geral, a alface é uma planta que possui folhas grandes e com consistência bem diversificada entre os tipos varietais. O caule é um órgão reduzido onde as folhas crescem em roseta e as raízes são ramificadas e superficiais (Santos, 2016). A alface é originária de clima temperado, é uma cultura anual e suas cultivares se desenvolvem comumente em climas mais amenos (Henz; Suinaga, 2009). Dessa forma, existe um desafio em selecionar genótipos mais adaptados a climas quentes. A temperatura influencia diretamente na produção de alface, pois tem efeito na arquitetura da planta, produtividade, ciclo e no processo de pendoamento (Diamante, 2013).

Neste contexto, o cultivo de cultivares diferentes é frequentemente testado nas microrregiões brasileiras, a fim de avaliar atributos fundamentais como as características morfológicas da planta, distúrbios fisiológicos, produtividade e atributos sensoriais para determinar as melhores cultivares para cada tipo de condição edafoclimática do país (Lima et al., 2018). O tipo de cultivar escolhido também deve variar de acordo com a umidade da época de plantio, pois, fatores como resistência a doenças e pendoamento precoce, também são importantes na escolha do tipo certo de cultivar (Matos et al., 2011).

As alfaces disponíveis para o mercado nacional podem ser classificadas de acordo com seus aspectos morfológicos, focados na formação da cabeça e nos tipos das folhas (Henz & Suinaga, 2009). Os principais grupos de alface consumidos no Brasil são: americana, crespa, lisa e romana (Kist et al., 2018). Também é comum o cultivo da alface mimosa, roxa e vermelha (Matos et al., 2011). De acordo com Matos et al. (2011) as características dos principais grupos de cultivares de alface são:

- (a) Crespa:** folhas com margens flabeladas (crespas). Alguns exemplos de cultivares são a Jade, Vanda e Valentina e *Black Seeded Simpson*.
- (b) Mimosa:** folhas bem recortadas, coloração verde, vermelha ou roxa. Entre as variedades de mimosa verde temos a Angélica e Saleta e entre as roxas, Maíra e Milamil.
- (c) Lisa:** folhas bem lisas, podendo ocorrer formação de cabeça. Como exemplos temos Elisa, Larissa, Regianemil e Baba de Verão.
- (d) Americana:** A principal característica é a formação de cabeça, ciclo mais longo, folhas de coloração mais escura e com maior crocância. Ex: *Great Lakes 959*, Angelina e Silvana.
- (e) Romana:** plantas de crescimento mais ereto, com nervuras mais grossas nas folhas. Ex: Sophia.
- (f) Roxas e vermelhas:** Tipo varietal de alface que existe para todos os outros grupos, com exceção da Americana. Apresenta pigmento vermelho nas folhas em decorrência das antocianinas nas folhas. Ex: Milamil e Maíra.

As práticas culturais adotadas para o cultivo da alface estão relacionadas à preparo do solo, distanciamento de semeadura, produção das mudas, forma de irrigação e de colheita (Cervantes et al., 2017). A cultura é moderadamente tolerante à salinidade e a temperatura média ideal para o desenvolvimento é de 10 a 20 °C. O sistema hidropônico de cultivo é uma estratégia amplamente adotado pelos produtores, por apresentar diversas vantagens em relação ao manejo, redução de perdas, e melhor qualidade das hortaliças (Alcântara et al., 2023). A hidroponia é um método de cultivo frequentemente usado em alface (Ohse et al., 2001) e diferentemente do método de cultivo tradicional em solo e substrato, utiliza meios de cultura com soluções nutritivas combinadas ao controle de pH, condutividade elétrica (CE) e temperatura da solução (Jones, 2016).

O sistema de cultivo tradicional em campo aberto é o mais importante em relação à área e volume de produção. Pode ser realizado em canteiros abertos, com cobertura de plástico (*mulching*) ou em túneis baixos (Matos et al., 2011). O cultivo tradicional é o mais comum dentro das regiões dos “cinturões verdes” e quando comparado a outras hortaliças (tomate, pepino e pimentão) possui um custo relativamente mais baixo. O cultivo do tipo protegido é realizado em telados ou casas-de-vegetação, cujas escolhas variam de acordo com o tipo climático da região (Henz; Suinaga, 2009). A hidroponia é outra alternativa utilizada para o cultivo de alface e pode ser feita em casas-de-vegetação, telados e varia em dimensões e tratamentos.

culturais. A técnica de hidroponia mais comum para a alface é a NFT (*Nutrient Film Technique*) ou Fluxo Laminar de solução (Ohse et al., 2001).

O conjunto de ações que devem ser realizadas após a semeadura, ou os chamados tratamentos culturais, baseiam-se na forma de irrigação (aspersão ou gotejamento), instalação da cobertura plástica ou *mulching*, transplântio na data correta (20 a 25 dias após a semeadura), cuidado de adubação complementar visando fornecer os nutrientes de acordo com a necessidade da muda, por exemplo o sulfato de amônio e ureia. E também pode ser realizada a fertirrigação (adubação via água). O controle de pragas e doenças é fundamental e particular de acordo com a região e época do ano. O MIP (manejo integrado de pragas) é o mais recomendado para manter o uso mínimo de agrotóxicos. A colheita é recomendada após 45 dias de semeadura e varia de acordo com o tipo de cultivo. Os tratamentos pós-colheita envolvem a lavagem e desinfecção com hipoclorito de sódio e acondicionamento para transporte (Matos et al., 2011).

3.2 Doenças que afetam a cultura da alface

Muitas doenças afetam a cultura da alface e os agentes etiológicos podem ser fungos, oomicetos, bactérias, vírus e nematoides. Entre os fungos que podem atacar a parte aérea estão *Septoria lactucae*, o causador da septoriose ou mancha foliar de *Septoria*, caracterizada por sintomas como manchas cloróticas e irregulares nas folhas, podendo se tornar necróticas por toda a superfície foliar (Cury et al., 2012). A doença é uma das mais importantes, sobretudo nas regiões tropicais e subtropais, por isso, o estudo de acessos resistentes é importante para os programas de melhoramento genético (Perdomo et al., 2023). Entre os fungos que atacam o caule e a raiz da alface, está o *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* que penetra no sistema vascular e causa amarelecimento e murcha das folhas basais prejudicando o desenvolvimento da cabeça e levando à morte da planta (Tofoli et al., 2012). Devido à sua severidade, é de suma importância estudos que busquem por acessos resistentes para incorporar traços genéticos de resistência ao *F. oxysporum* em novas cultivares de alface (Cabral et al., 2019). Além dessas, destaca-se a cercosporiose, causada por *Cercospora longissima*, que causa lesões de tamanhos diferentes, arredondadas ou elípticas (Noronha; Assunção, 2015), e o mofo-cinza, causado por *Botrytis cinerea*, considerada uma doença secundária da alface no Brasil, que pode atingir a cultura tanto no viveiro de mudas como no campo. Os sintomas do mofo-cinza são o aparecimento de manchas encharcadas e escuras, que podem se estender da base ao pecíolo causando a morte da planta (Colariccio; Chaves, 2017). O oídio também é uma doença comum na alface, caracterizada por numerosas estruturas esbranquiçadas no limbo foliar, podendo

evoluir para uma coloração acinzentada, resultando em clorose e/ou necrose (Lopes et al., 2010). No Brasil, a espécie *Golovinomyces orontii* foi reportada como agente causal de oídio em alface, com uma incidência de 100% na cultura (Cabral et al, 2019).

Outras doenças fúngicas comuns são o mofo-branco, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, onde ocorre o apodrecimento das folhas e do caule (Tofoli et al., 2014), a murcha causada por *Agroathelia rolfsii*, caracterizada pelo aparecimento de reboleiras na lavoura (Amorim et al., 2016) e pelo apodrecimento nas folhas em contato com solo e avança para a raiz (Lopes et al., 2010), e a murchadeira causada por *Berkeleyomyces basicola* e *B. rouxiae*, caracterizada por lesões amarronzadas de tamanho variável nas raízes, subdesenvolvimento e murcha nas horas mais quentes do dia (Sala et al., 2008).

Em relação aos oomicetos, diferentes espécies de *Pythium* têm sido relatadas como causadoras de doenças em alface, por exemplo o *P. tracheiphilum* (Sauvageau et al., 2019; Barboza et al., 2024), *P. aphanidermatum* e *P. myriotylum* (Talubnak et al., 2022), *P. dissotocum*, *P. ultimum*, *P. intermedium* e *P. irregulare* (Sutton et al., 2006). Entre os oomicetos que podem atacar a parte aérea da alface estão o míldio (*Bremia lactucae*), que causa grandes danos como manchas angulares verdes-claras, amareladas ou marrons nas folhas (Colariccio; Chaves, 2017). A ocorrência do míldio foi registrada em todo o estado de São Paulo, no Brasil, durante as épocas de baixas temperaturas e alta umidade (Marin et al., 2019).

Também existem doenças bacterianas importantes na cultura da alface, incluindo a mancha-bacteriana (causada por isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians*) que se dissemina rapidamente, causa manchas angulares encharcadas (Lopes et al., 2010). A mancha-cerosa (causada por isolados de *Pseudomonas cichorii*) é caracterizada por manchas escuras ao longo da nervura nas folhas localizadas na parte mais interna da cabeça (Pacífico, 2017). Na região do caule e raiz, a podridão-mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ocasiona murcha nas folhas externas, podendo levar ao apodrecimento intenso da cabeça até em pós-colheita (Vanjildorj et al., 2009).

Alguns nematoides também podem atacar a alface, como os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp., principalmente as espécies *M. incógnita*, *M. javanica* e *M. arenaria*) que prejudicam o desenvolvimento das plantas devido à formação de galhas nas raízes (Oliveira; Rosa, 2014).

Entre os vírus que causam doença na alface estão o complexo de orthotospovírus (*Orthotospovirus*), causadores da doença “vira-cabeça”, os potyvirus (*Potyvirus*) representados por patótipos do *Lettuce mosaic virus* – LMV (vírus do mosaico da alface). Os orthotospovírus

são os mais importantes patógenos virais para a cultura, sendo responsáveis pelas maiores perdas no país (Lima et al., 2016).

4. Cultivo do coentro (*Coriandrum sativum* L.)

4.1 Aspectos gerais da cultura do coentro

O coentro (*Coriandrum sativum* L.) é pertencente à família Apiaceae, sendo originário da região Mediterrânea e, posteriormente, levado para à Ásia, África e Américas (Reis; Lopes, 2016). A cultura é uma olerícola adaptada ao clima quente (acima de 25°C), sendo pouco tolerante a temperaturas mais amenas. O coentro é uma planta herbácea aromática, utilizada principalmente na culinária (Catta, 2019). Nutricionalmente o coentro é uma rica fonte de nutrientes como o cálcio, pró-vitamina A, vitamina C, vitamina B12 e polifenóis, estando presentes tanto nas folhas quanto nas sementes (Bhat et al., 2014). As folhas, são ricas em vitaminas, minerais e flavonóides e as sementes são ricas em antioxidantes (Bhat et al., 2014).

De modo geral, observa-se uma carência de informações sobre a produção de coentro no Brasil, principalmente em função de esta acontecer majoritariamente em pequenas propriedades (Reis; Lopes, 2016). No entanto, de acordo com os dados do Censo Agropecuário de 2017 (IBGE, 2017), o coentro foi plantado em 65.491 estabelecimentos agropecuários e sua produção atingiu 120.583 toneladas.

O coentro completa seu ciclo em aproximadamente 25 dias após a semeadura (Pereira et al., 2012). As plantas dessa hortaliça atingem uma altura média de 25 a 60 cm e possuem raízes pequenas, variando de 15 a 20 cm. As sementes do coentro germinam entre três e cinco dias após o plantio. Devido ao seu ciclo curto, a colheita geralmente ocorre entre 30 e 45 dias após a semeadura (Grangeiro et al., 2011).

Além dos sistemas convencionais e orgânicos, cultivos de coentro têm sido implementados em condições de estufas plásticas e fertirrigação (Reis; Lopes, 2016). O cultivo do coentro pode ser significativamente beneficiado pelos sistemas hidropônicos e semi-hidropônicos, tanto suspenso quanto com substrato. Esses métodos apresentam vantagens sobre o cultivo tradicional no solo, especialmente pela reutilização eficiente de recursos hídricos, quebra da sazonalidade e otimização do uso do espaço de cultivo (Souza et al., 2023).

De acordo com dados do Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, existem atualmente no Brasil 46 cultivares registradas (Brasil, 2024). As cultivares podem ser classificadas como tardias e precoces. O grupo das cultivares precoces é mais adaptado ao clima

tropical e apresenta fase vegetativa mais curta, em geral de 30 a 45 dias. A este grupo pertencem os cultivares ‘Verdão’, Fevo, ‘Palmeira’ e ‘Tabocas’ (Diniz, 2012). Cultivares mais tardias são melhor adaptadas aos climas subtropical ou temperado e apresentam desenvolvimento pleno entre 50 a 60 dias. Podem ser destacados neste grupo as cultivares ‘Santo’, ‘Tapacurá’, ‘Asteca’, ‘Americano Gigante’, Coimbra e ‘Português’.

4.2 Doenças que afetam a cultura do coentro

No Brasil, estudos envolvendo patógenos na cultura do coentro ainda são considerados incipientes. Até pouco tempo, os trabalhos com a cultura envolviam estudos do seu potencial como hospedeira alternativa e estudos referentes à associação de fungos presentes nas sementes.

Dentre as doenças causadas por fungos e oomicetos relatadas no coentro estão o tombamento de mudas (causada por *Alternaria dauci*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium* sp.), a queima de folhas (causada por *Alternaria dauci*) (Ferreira, 2013; Reis; Lopes, 2016), a murcha de Fusarium (*Fusarium oxysporum*) as manchas amareladas nas folhas causadas por oídio (*Oidiopsis haplophylli*) (Reis et al. 2004; Reis; Lopes, 2016), a mancha de cercospora (*Cercospora* sp.) (Noronha; Assunção, 2015) e a doença da vesícula (causada por *Protomyces macrosporus*) (Leharwan; Gupta, 2019). Dentre os nematodoides, destacam-se *Meloidogyne* (*M. incognita* e *M. javanica*) e *Rotylenchulus reniformis*.

5. Cultivo da rúcula (*Eruca sativa*)

5.1 Aspectos gerais da cultura da rúcula

A rúcula (*Eruca sativa*) é uma hortaliça folhosa pertencente à família Brassicaceae. Originada da região mediterrânea, é popular principalmente em áreas de colonização italiana no Brasil. Suas características têm sido crescentemente admiradas e procuradas pelos consumidores, sendo apreciada pela sua picância no paladar e cheiro característico e intenso (Cfn, 2024). Por isso, a sua produção atual não tem atendido à demanda do mercado. Este fato tem resultado em uma expansão das áreas da cultura no Brasil, especificamente na região Sudeste (Purqueiro et al., 2007). Conforme o Censo Agropecuário de 2017 (IBGE, 2017), a produção da rúcula neste ano foi de 40.527 toneladas em 20.567 estabelecimentos agropecuários.

A crescente demanda desta hortaliça no mercado também pode ser uma consequência das suas características nutricionais. A rúcula é rica em potássio, enxofre, ferro, pró-vitamina A e vitamina C (Freitas et al., 2009). Além disso, suas folhas possuem altos teores de fibras, polifenóis, flavonoides e glucosinolatos (glucoerucina), portanto, considerada um alimento funcional (Xu et al., 2014).

A rúcula caracteriza-se por folhas com pungência discreta. Suas folhas são relativamente espessas e divididas, com coloração verde e nervuras do limbo foliar verde-claras (Sala et al., 2004). As plantas cultivadas possuem altura entre 15 e 20 cm e necessitam de polinização cruzada para a produção de suas sementes. Suas folhas basais se organizam em rosetas e suas folhas caulinares apresentam características lobadas ou dentadas. Suas flores são de coloração branca ou amarela. A folhosa pode ser cultivada nos sistemas de canteiro, hidropônico, aquapônico e tradicional (Souto et al., 2023). Entre as cultivares de rúcula disponíveis para o mercado brasileiro estão ‘Donatella’, ‘Antonella’, ‘Silvestre’, ‘Rokita’, ‘Gigante Folha Larga’ e ‘Cultivada’. As condições de temperatura ótimas para o desenvolvimento das plantas estão entre 15 e 18 °C (Filgueira, 2008). A produção de rúcula no Brasil fica em 6º lugar entre as hortaliças folhosas, ficando depois somente da alface, repolho, couve, agrião e espinafre (Vilela; Luengo, 2022). Sua produção ocupa 22,8% da área total de 174.061 hectares estimada para a produção de hortaliças.

5.2 Doenças que afetam a cultura da rúcula

Os fungos são os principais fitopatógenos da rúcula, causando mancha foliar (*Alternaria* sp.), fusariose (*Fusarium* sp.), tombamento (*Pythium* sp.) e podridão radicular (*Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*) (Reis et al., 2021). A rúcula é afetada em menor proporção por bactérias e por protozoários. Dentre as doenças bacterianas destacam-se a queima bacteriana, podridão negra e a murcha (Raid; Miranda, 2023). Já a principal doença causada por protozoário é a hérnia das crucíferas (*Plasmodiophora brassicae* Woronin), caracterizada pela formação de galhas nas raízes das plantas infectadas. Essas galhas são causadas pelo crescimento anormal das células radiculares, induzido pelo patógeno (Reis et al., 2021). O *P. brassicae* na forma de zoósporo encontra as raízes e permanece na forma de plasmódio, dando origem aos esporângios ou esporos que por fim produzem os zoósporos. Os mesmos ao encontrarem as raízes formam um cisto que aumenta consideravelmente de tamanho, resultando na morte da planta (Reis, 2009).

Além destes, a rúcula também é afetada por oomicetos, principalmente pela ferrugem branca (*Albugo candida*) e por tombamento (*Pythium* sp.). A ferrugem branca manifesta-se nos tecidos foliares e caulinares se caracterizando pela presença de pústulas esbranquiçadas individuais ou agrupadas. As pústulas formam manchas amarelo-claras na superfície inferior das folhas (Latinovic et al., 2019). Essas lesões interferem na atividade fotossintética e o fungo pode se tornar sistêmico afetando o desenvolvimento normal da planta. Por outro lado, a infecção por isolados de *P. aphanidermatum* provoca sintomas como descoloração e desorganização do sistema radicular, levando ao tombamento e morte das plantas (Freire; Cardoso, 2009). Da mesma forma, a espécie *P. dissotocum* é frequentemente isolada de plantas que apresentam tombamento (Sutton et al., 2006).

6. Cultivo da bortalha (*Basella alba*)

6.1 Aspectos gerais da cultura da bortalha

A bortalha é uma planta trepadeira pertencente à família Basellaceae (Basellaceae, 2020), nativa nas regiões tropicais da Índia e Sudeste Asiático (Kinupp & Lorenzi, 2014). Também chamada de espinafre-de-malabar, alugbati, espinafre-do-ceilão e couve-de-cerca, a bortalha é considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC), cujas folhas são utilizadas para consumo de diversas formas em muitas partes do mundo (Yen *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2022).

A bortalha se adapta bem a climas tropicais e subtropicais, prefere solos ricos em matéria orgânica e bem drenados. É necessário manter uma irrigação moderada para garantir a umidade do solo, especialmente durante os períodos secos. A planta pode crescer em áreas sombreadas e requer poucos tratos agrícolas. Práticas como o manejo integrado de pragas e a colheita seletiva ajudam a manter a saúde da planta e a qualidade das folhas para consumo (Singh et al., 2018; Silva et al., 2022).

A bortalha é rica em nutrientes essenciais, como vitaminas (A e C), minerais (ferro, cálcio), proteínas e fibras, tornando-se uma boa opção alimentar para combater a desnutrição, especialmente em comunidades com acesso limitado a alimentos nutritivos. Seu cultivo é relativamente fácil e adaptável a condições variadas, permitindo que seja uma fonte constante de alimentos. Ao incluir essa planta na dieta, pode-se melhorar a ingestão de nutrientes essenciais, promovendo a segurança alimentar e contribuindo para a saúde geral da população (Singh et al., 2018).

6. 2 Doenças que afetam a cultura da bertalha

Entre as principais doenças que afetam *Basella alba* estão as manchas foliares causadas por *Cercospora beticola* (Begum; Cumagun, 2010), *Acrothecium basellae* e *Alterania* sp. (Mussi-Dias, 2011). Além dessas, destacam-se a podridão foliar causada por *Rhizoctonia* sp. (Pereira; Coelho Netto, 2011) e as galhas em raízes geradas por nematoides do gênero *Meloidogyne* (Boari, 2016). Até o momento, doenças induzidas por espécies de *Pythium* não foram relatadas para esta cultura no Brasil.

7. *Pythium*

7.1 Filogenia de *Pythium* spp.

O gênero *Pythium* foi descrito em 1858, sendo a espécie *P. monospermum* Pringsh. a espécie-tipo do gênero. Com o passar do tempo a filogenia e o surgimento de novos gêneros e espécies foi tornando o que se considerava “*Pythium*” um complexo. Entretanto, por questão de comodidade, nesta tese este complexo ainda será tratado como “gênero *Pythium*”, que atualmente pertence à família Pythiaceae, ordem Peronosporales, classe Peronosporomycetos, filo Oomycota e reino Chromista (Beakes; Thines, 2017). O gênero inclui centenas de espécies, que habitam o solo e alguns ambientes aquáticos (Gracia et al, 1991; Levesque et al., 2010; Sauvageau et al., 2019). As espécies podem ser saprófitas, fitopatogênicas e patogênicas a insetos, algas, peixes, nematóides e mamíferos (Gracia et al, 1991; Martin; Loper, 1999; Nguyen et al, 2022). No entanto, a maioria dos estudos têm focado nas espécies fitopatogênicas, devido aos danos nas plantas de importância econômica.

O gênero *Pythium* é caracterizado por possuir hifas hialinas e cenocíticas (sem septos). Basicamente, existem dois tipos de esporângios, os filamentosos e os globosos (ovoides). Os zoósporos são produzidos dentro de uma vesícula formada na extremidade dos esporângios. Os oósporos se desenvolvem dentro de estruturas denominadas oogônias (gametângios femininos) que podem ser lisas ou ornamentadas. Os anterídios (gametângios masculinos) são formados por uma célula anteridial séssil, intercalar ou posicionados terminalmente em um pedúnculo anteridial. Após a fertilização, em alguns casos raros, podem ser formados mais de um oósporo dentro do oogônio (Van der Plaats-Niterink, 1981).

A taxonomia das espécies de *Pythium*, por muito tempo, foi baseada no estudo de características morfológicas, entre elas a mais relevante é o tipo e tamanho dos esporângios e oogônia, origem e forma do oósporo, número e posição dos anterídeos em relação à oogônia e formato das hifas (Waterhouse, 1963; Van der Plaats-Nitering, 1981; Dick, 1990; Ho, 2018). No entanto, a classificação das espécies por análises morfológicas se tornou complexa devido às semelhanças entre as espécies e dificuldade de cultivo de algumas espécies em meios de cultura (Schroeder et al., 2013).

Sendo assim, novos estudos, incluindo marcadores moleculares começaram a ser utilizados para identificação das espécies de *Pythium*. Após a evolução das técnicas de sequenciamento de DNA e filogenética molecular, alguns estudos sugeriram a divisão do gênero (Levesque; Cock, 2004; Nguyen et al., 2022). Estudos combinando informações morfológicas e a variabilidade genética da região espaçadora transcrita interna (ITS) do rDNA mais 5.8 S (ITS1-5.8S-ITS2) e dos domínios variáveis D1–D3 da região 28S do rDNA (LSU) sugeriram a divisão do gênero *Pythium* em 11 clados contemplando três grupos: espécies com esporângios filamentosos, esporângios contíguos e com esporângios ovóides (Levesque; Cock, 2004; Nguyen et al., 2022).

Estudos mais recentes, baseados na investigação das regiões 28S de rRNA, ITS, subunidades da *Cox1*, *Cox2* e beta-tubulina propuseram a subdivisão dos indivíduos dos grupos baseados na morfologia e semelhança dos esporângios. Foram identificados quatro grandes clados que refletem a morfologia dos esporângios, com espécies com esporângios filamentosos em um clado e espécies com esporângios globosos em outros clados. No clado 1 agruparam-se isolados de *Pythium* com esporângios filamentosos a lobulares. No clado 2 inclui isolados de *Pythium* com zoosporângios globosos a esféricos. E no clado 3 contém isolados de *Pythium* com esporângios esféricos, junto com outras espécies em outros clados nas árvores filogenéticas (Hulvey et al., 2010; Lévesque & de Cock 2004; Martin 2000; Riethmuller et al., 2002; Robideau et al., 2011; Villa et al., 2006).

Mais recentemente, o gênero *Pythium sensu stricto* passou por uma reformulação após estudos filogenéticos com sequências da subunidade 2 da citocromo oxidase c oxidase (*Cox2*) e dos domínios D1–D2 do rDNA da 28S (Uzuhashi; Kakishima; Tojo, 2010)). Os resultados do estudo levaram os autores a dividirem o gênero em *Elongisporangium* (esporângio alongados), *Globisporangium* (esporângios globosos), *Ovatisporangium* (= *Pythophitium*) (esporângios ovóides ou piriformes, às vezes irregulares) e *Pilasporangium* (esporângios globosos e não proliferantes). No entanto, houve poucas evidências moleculares para convencer a comunidade científica da nova divisão proposta pelos autores (Nguyen et al, 2022). Da mesma forma, um

novo gênero foi proposto (determinado *Phytophythium*) (Bala et al., 2010), sendo amplamente aceito pela comunidade científica, em razão das robustas evidências morfológicas e filogenéticas.

Neste contexto, o estudo de filogenômica realizado por Nguyen et al. (2022) avaliou o genoma de 109 linhagens de *Pythium* e parentes próximos, combinou os dados com 10 genomas sequenciados anteriormente e confirmou a divisão do gênero proposta por Uzuhashi, Kakishima e Tojo (2010), que adota as nomenclaturas *Pythium*, *Elongisporangium* e *Globiosporangium*. Além de reclassificar de dentro de *Elongisporangium* e *Globiosporangium* algumas espécies de *Pythium* recém descritas.

7.2 Espécies de *Pythium* como fitopatógenos

O gênero *Pythium* possui diversas espécies fitopatogênicas, causadoras de danos severos em diversas culturas. As principais doenças causadas por espécies de *Pythium* são o tombamento de mudas, podridão de raiz, podridão do colo, podridão mole em órgãos de reserva e podridão do caule (Arora et al., 2021). A infecção se inicia com o apodrecimento leve dos frutos, raízes e caules, além de atingir sementes antes e depois da germinação, afetando os tecidos jovens das plantas.

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzp. é uma das espécies mais importantes, possuindo uma distribuição cosmopolita. Sua infecção causa murcha e apodrecimento no hospedeiro, principalmente, nas raízes. Sua agressividade em altas temperaturas é capaz de reduzir o vigor, qualidade e produtividade de diversos grupos de plantas: Amaranthaceae, Amaryllidaceae, Araceae, Basellaceae, Bromeliaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Coniferaceae, Convolvulaceae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Gramineae, Leguminosae, Linaceae, Malvaceae, Moraceae, Passifloraceae, Rosaceae, Solanaceae, Umbelliferar, Violaceae, Vitaceae e Zingiberaceae (Parveen; Sharma, 2014).

Espécies de *Pythium* atacam cultivos hidropônicas, causando podridão nas raízes. Entre as espécies relatadas estão o *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. dissotocum* Drechsler, *P. ultimum* Trow var. *ultimum*, *P. intermedium* e *P. irregulare* (Sutton et al, 2005; Pirez-Zottarelli et al., 2009). Em cultivos hidropônicos de alface, as espécies *P. debaryanum* Hesse, *P. irregulare* Buisman, *P. myriotylum* Drechsler e *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix também foram relatadas como patogênicas (Stanghellini; Rasmussen, 1994). A espécie *P. helicoides* Drechsler também foi isolada de culturas hidropônicas de alface (Yanez, 2000; Teixeira et al., 2006). Geralmente, o inóculo dessas espécies está presente no solo e nos resíduos vegetais nos

telados e campos. As espécies de *Pythium* podem ser introduzidas nestes ambientes por meio da dispersão pelo vento, solos, resíduos orgânicos, pessoas, equipamentos e água (Sutton et al., 2005).

Existe uma grande variedade de hospedeiras para as espécies de *Pythium*, como o tomate, várias hortaliças folhosas e pepinos (Kumar, 2020). Além disso, também é observada uma variação intraespecífica da agressividade do fitopatógeno. Como foi relatado por Hampton & Buchholts (1962), isolados de *P. graminicola* provenientes de campos de milho, aveia e setária apresentaram maior agressividade comparados aos isolados de trigo, cevada e centeio. Essas diferenças intraespecíficas também foram registradas para as espécies *P. myriotylum*, *P. aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. irregulare* e *P. arrhenomanes*. No entanto, também é possível que a diferença dos níveis de agressividade observados para essas espécies em diferentes hospedeiros seja um resultado da concentração do inóculo, devido à variação de esporulação e frequência de germinação dentro das espécies (Martin, 2000).

7.3 Modo de infecção da planta hospedeira

Os fatores ambientais exógenos possuem papel importante no processo de infecção dos hospedeiros. Além disso, as condições favoráveis também parecem variar entre as espécies de *Pythium*. De modo geral, condições determinantes são a umidade, temperatura, quantidade e conteúdo de matéria orgânica, além do pH e tipo de solo (Arora et al., 2021), sendo a temperatura considerada o fator mais importante para a maioria das espécies (Dubey et al., 2020).

O processo de infecção dos hospedeiros de *Pythium* spp. pode se iniciar, principalmente, nas sementes. O processo fisiológico de germinação das sementes, com a liberação de exudados no solo, pode induzir a germinação dos propágulos de *Pythium* (Martin; Loper, 1990, Arora et al., 2021). A suscetibilidade das sementes depende do genótipo e da quantidade e composição dos exsudatos que variam de acordo com a idade (Harman et al., 1978; Woodstock; Taylorson, 1981). A umidade do solo também influencia na infecção das sementes, uma vez que níveis mais baixos de umidade também reduzem a distância que os nutrientes se difundem no microambiente, conseqüentemente, diminuindo o número de propágulos que podem iniciar o processo de infecção (Martin; Loper, 1999).

O gênero *Pythium* é um oomiceto de solo que contém micélio em fase vegetativa, esporângios e zoósporos na fase assexuada e oósporos como esporo sexual. Seu ciclo de vida em espécies de *Capsicum*, de acordo com uma revisão sistemática de ARORA et al. (2021),

inicia-se pelos oósporos como estrutura primária resistente e que permanece viável por muito tempo no solo. No entanto, também existem registros de esporângios de *Pythium* sobrevivendo por longos períodos no solo. Na presença de exsudados das raízes dos hospedeiros, os propágulos germinam rapidamente e penetram nas estruturas das plantas. Os esporângios podem produzir tubos hifais ou produzir zoósporos em condições de alta umidade. Além dos propágulos produzidos, as diferentes espécies de *Pythium* sobrevivem de maneira saprofítica em forma de micélio no solo. Nas sementes, mudas, raízes e plantas mais jovens, o oomiceto sobrevive heterotroficamente levando à morte dos hospedeiros.

7.4 Ocorrência de *Pythium* em alface, coentro, rúcula e bertalha

A espécie *Pythium tracheiphilum* foi identificada pela primeira vez em 1965 como causador de podridão do caule e murcha vascular na cultura da alface (Matta, 1965). Posteriormente, foi registrado no Reino Unido, América do Norte e Austrália (Hall, 1989, Kumar et al., 2007, Nordskog et al., 2008). Em 2015, também foi isolado de alfaces apresentando sintomas característicos de infecção por *Pythium* na Argentina (Kiehr et al., 2015). Mais recentemente, essa espécie foi associada como a mais importante para a cultura, podendo causar perdas de mais de 50% de produção (Van der Heyden et al., 2019). A espécie *P. tracheiphilum* também foi identificada como causador de doenças em outras culturas, como podridão de folhas e cabeça em couve-chinesa na Dinamarca (Moller; Hockenhull, 1997) e necrose vascular em plantas de chicória na Espanha (Berbegal et al., 2011). Além disso, *P. tracheiphilum* foi registrado parasitando alface no Brasil (Barboza, 2020; Lopes, 2020; Barboza et al., 2024).

O modo de dispersão do *P. tracheiphilum* ocorre através de respingos de água no solo, diferentemente da infecção pelas raízes e caule pelas outras espécies (Tortolero; Sequeira, 1978). As plantas infectadas apresentam tamanho menor e folhagens amareladas e murchas. Outro sintoma característico é a raiz principal das plantas infectadas apresentar deformações, textura áspera, descolorida e sem desenvolvimento de radículas secundárias. De modo geral, as plantas mais jovens são mais suscetíveis (7 a 14 dias de idade). E mesmo sobrevivendo à infecção, plantas doentes se mantêm menores em relação às outras (Jacquet, 1979). Os oósporos são as estruturas mais importantes de infecção do *P. tracheiphilum*, e podem sobreviver no solo por muitos meses e até anos. Os esporângios também podem ser veículos de contaminação, porém, mantêm um período mais curto de viabilidade (Martin; Looper, 1999).

As espécies de *Pythium* e *Phytophythium* afetam uma ampla gama de hospedeiras, tendo grande importância econômica. Um estudo de Gonçalves et al. (2016) em sistemas hidropônicos no estado de São Paulo identificou várias espécies destes patógenos associados a plantas de rúcula em São Paulo, incluindo *P. oopapillum*, *P. kashmirensense*, *P. middletonii*, *P. periplocum*, *P. segnitium*, *P. vexans* e *P. helicoides*. Barboza (2020) também observou *Pythium myriotylum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. spendens*, *P. aphanidermatum*, *Phytophythium vexans* e *P. chamaeophyon* como causadores de podridão em rúcula, com diferentes incidências. Adicionalmente, *P. acanthophoron* e *P. ultimum* var. *ultimum* foram registrados como causadores de podridão em plantas da cultivar de coentro ‘Verdão’ (Barboza, 2020).

Em coentro, a ocorrência de *Pythium aphanidermatum* foi relatada pela primeira vez no Município de Vitória da Conquista na Bahia em 2024 (Silva et al., 2024). Gonçalves et al. (2016) detectaram sete espécies diferentes de *Pythium* (*P. oopapillum*, *P. kashmirensense*, *P. middletonii*, *P. periplocum* e *P. segnitium*) associadas a raízes de plantas de alface, salsa, rúcula e agrião. Por outro lado, não há relatos de *Pythium* ocorrendo em bortalha no Brasil.

8. Referências Bibliográficas

- ALCÂNTARA, M. B. C. et al. Análise de sistemas com diferentes meios de produção na cultura da alface. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 21, n. 11, p. 22080-22093, 2023.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN, F. A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**, Volume 2, Doenças das Plantas Cultivadas. 5. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2016. 810 p.
- ARORA, H. et al. *Pythium* damping-off and root rot of *Capsicum annuum* L.: impacts, diagnosis, and management. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 823, 2021.
- ASAOLU, S. S.; ADEFEMI, O. S.; OYAKILOME, I. G.; AJIBULU, K. E.; ASAOLU, M. F. Proximate and mineral composition of Nigerian leafy vegetables. **Journal of Food Research**, v. 1, n. 3, p. 214, 2012.
- BALA, K.; ROBIDEAU, G. P.; COCK, A. W. *Phytophythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Levesque, gen. nov. and *Phytophythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Levesque, sp. nov. **Persoonia**, v. 24, p. 136-137, 2010.
- BARBOZA, E. A. **Diversidade de *Pythium* e *Phytophythium* associados a hortaliças e plantas invasoras no Brasil, sensibilidade de isolados a mefenoxam e gama de hospedeiras**. 2020. 116 f., il. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

BARBOZA, E. A.; CABRAL, C. S.; ROSSATO, M.; MARTING, F. H. S. R.; REIS, A. ***Pythium* and *Phytophythium* species associated with weeds collected in vegetable production fields in Brazil.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 74, n. 5, p. 796-808, 2022.

BARBOZA, E.A.; LOPES, L.H.R.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; CABRAL, C.S.; VIEIRA, W.A.S.; ROSSATO, M.; RIBEIRO, F.H.S.; REIS, A. *Pythium tracheiphilum* causing leaf rot and wilting in lettuce in Brasília-DF, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 172, p. online, 2024.

BEAKES, G. W.; THINES, M. Hyphochytriomycota and oomycota. In: ARCHIBALD, J. M.; SIMPSON, A. G. B.; SLUIMAN, H. J. (Eds.). **Handbook of the Protists**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 435-505.

Begum, M. M. and Cumagun, C. J. R., First record of *Cercospora basellae-albae* from the Philippines. *Australasian Plant Disease Notes*, 5(1), 2010. p.115-116.

BERBEGAL, M.; ÁLVAREZ, L. A.; PÉREZ-SIERRA, A.; ARMENGOL, J. Identification of *Pythium tracheiphilum* as the causal agent of vascular necrosis of endive (*Cichorium endivia*) in Spain. **Phytoparasitica**, v. 40, p. 1-4, 2012.

BHAT, S. et al. Coriander (*Coriandrum sativum* L.): Processing, nutritional and functional aspects. **African Journal of Plant Science**, v. 8, n. 1, p. 25-33, 2014.

BOLLEN, G. J. Lethal temperatures of soil fungi. In: PARKER, C. A.; ROVIRA, A. D.; MOORE, K. J.; WONG, P. T. W. (Eds.). **Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. cap. 5, p. 191-193.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro nacional de cultivares**. Brasília: MAPA, 2024. Disponível em: <http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>. Acesso em: 08 jun. 2024

BRAINER, M.S.C.P. **Produção de hortaliças na área de atuação do BNB**. Caderno Setorial ETENE – Ano 6, n. 180, 2021. 14 p. Disponível em: <<https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/handle/123456789/902>>. Acesso em: 05 ago. 2024

CABRAL, C. S. et al. A single dominant gene/locus model for control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 resistance in lettuce (*Lactuca sativa*). **Euphytica**, v. 215, p. 1-11, 2019.

CABRAL, C. S. et al. Description of *Golovinomyces orontii* as the causal agent of lettuce (*Lactuca sativa*) powdery mildew in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 4, p. 761-761, 2019.

CATTA, B. S. **Análise parasitológica da parte aérea e sistema radicular do *Coriandrum sativum* L. cultivado nos municípios de Pombos, Vitória de Santo Antão e Cabo de Santo Agostinho**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - ESALQ/USP. **Hortifruti Brasil**. Anuário 2022, 2023. Disponível em:

<<https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-hf-brasil-retrospectiva-2022-perspectiva-2023.aspx>>. Acesso em 2 jul. 2024.

CERVANTES, C.; LAYNESA, F. P.; PACIS, J. B. Validation and Documentation of Organic Production Systems for Lettuce (*Lactuca sativa*) Camarines Sur, Filipinas. **Revista Internacional of Tecnologia Agricolagy**, v. 2, p. 1277-1284, 2017.

CONSELHO FEDERAL DE NUTRIÇÃO (CFN). **Rúcula**. Brasília, DF: CFN, 2024. Disponível em: <<https://www.cfn.org.br/index.php/rucula-2/#:~:text=Caracter%C3%ADsticas%3A%20a%20r%C3%BAcula%20apresenta%20plantas,sabor%20picante%20e%20cheiro%20acentuado>>. Acesso em: 17 ago. 2024.

COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R. **Aspectos fitossanitários da cultura da alface**. Boletim Técnico, Instituto Biológico, v. 71, p. 45-55, 2017.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Centrais de Abastecimento: Comercialização total de frutas e hortaliças de 2023**. Brasília, DF: CONAB, 2024.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). **Mapeamento e quantificação da cadeia de hortaliças no Brasil: Desafios e oportunidades**. Brasília, DF: CNA, 2022. Disponível em: <https://www.cnabrasil.org.br/assets/arquivos/bibliotecas/livro_final3_mapeamento_e_quantificacao_da_cadeia_de_hortalicas_08.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2024

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 118-120, 2005.

CURY, M. F. N. et al. Avaliação de doenças foliares em função do espaçamento e adubação nitrogenada no almeirão. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 1947-1955, 2012.

DA SILVA, N. M. P.; AUCIQUE-PEREZ, C. E.; SILVA, A. L.; BARRETO, R. W. *Alternaria brassicae* causes leaf spots on *Eruca sativa* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 15, p. 1-3, 2020.

DIAMANTE, M. S.; SEABRA Jr, S.; INAGAKI, A. M.; SILVA, M. B. D.; DALLACORT, R. Produção e resistência ao pendoamento de alfaces tipo lisa cultivadas sob diferentes ambientes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 133-140, 2013.

DICK, J. Linn. Soc., Bot. v. 91, p. 313, 1985. *Pythium papillatum* V. D. Matthews, J. Elisha Mitchell. **Scient. Soc.**, v. 43, p. 231, 1928.

DINIZ, G. M. M. **Resistência do coentro (*Coriandrum sativum* L.) à *Meloidogyne incognita* (raças 1 e 3) e *Meloidogyne javanica***. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

DUBEY, M. K.; ZEHRA, A.; AAMIR, M.; YADAV, M.; SAMAL, S.; UPADHYAY, R. S. Isolation, identification, carbon utilization profile and control of *Pythium graminicola*, the causal agent of chilli damping-off. **Journal of Phytopathology**, v. 168, p. 88–102, 2020.

EMBRAPA. **Banco de informações sobre fungos: consulta ao banco de dados**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2024. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 17 ago. 2024.

FAO. FAOSTAT crops. 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/>. Acesso em 2 jul. 2024.

FAO. Production quantities of Lettuce and chicory by country. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 31 out. 2023.

FERREIRA, M. F. **Epidemiologia de doenças radiculares na cultura do coentro no município de Arapiraca-AL**. 2013. 32 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2013.

FIGUEIREDO, J. B. de. Hortaliças: negócio do futuro ou do presente? **Casa da Agricultura**, 2015. Disponível em: https://www.cati.sp.gov.br/revistacasadaagricultura/22/RevistaCA_Olericultura_Ano18_n2.pdf. Acesso em: 7 jul. 2024.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2000. 402 p.

MARTIN, F.N.; LOPER, J. E. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: Ecology, epidemiology, and prospects for biological control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 2, p. 111-181, 1999.

FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, B. B. Patógenos associados a hortaliças em cultivos hidropônicos no Estado do Ceará. **Embrapa**, 2009. Fortaleza, Ceará. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/659065/1/cot140.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2024.

FREITAS, K. D.; BEZERRA, N. F.; GRANGEIRO, L. D. C.; LIMA, J. D.; MOURA, K. H. S.; BARROS JÚNIOR, A. P. Desempenho agrônomo de rúcula sob diferentes espaçamentos e épocas de plantio. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 3, p. 449-454, 2009.

GONÇALVES, D. R.; JESUS, A. L.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. *Pythium* and *Phytophthora* species associated with hydroponically grown crops around the city of São Paulo, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, p. 397-405, 2016.

GONZAGA, Z. C.; HUBERT, B.; DIMABUY, H. B.; SUMALINOG, R. R.; CAPUNO, O. B. (2014). Increasing productivity of Malabar Spinach (*Basella alba* L and *Basella rubra* L.) grown in the marginal upland area of Inopacan, Leyte through different mulching materials. **Annals of Tropical Research**, 3(Supplement), 166-178.

GRACIA, J. A.; REELEDER, R. D.; BÉLAIR, G. Interactions between *Pythium tracheiphilum*, *Meloidogyne hapla* and *Pratylenchus penetrans* on lettuce. **Phytoprotection**, v. 72, p. 87-130, 1991.

GRANGEIRO, L. C. et al. Avaliação agroeconômica das culturas da beterraba e coentro em função da época de estabelecimento do consórcio. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 242-248, 2011.

HALL, G. Unusual or interesting records of plant pathogenic Oomycetes. **Mycological Research**, v. 93, p. 78-88, 1989.

HAMPTON, R. O.; BUCHHOLTZ, W. F. Host specialization in *Pythium graminicolum*. **Iowa State Journal of Science**, v. 37, p. 43-66, 1962.

HARMAN, G. E.; NEDROW, B.; NASH, G. T. Stimulation of fungal spore germination by volatiles from aged seeds. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 2124-2127, 1978.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. A. **Tipos de alface cultivados no Brasil**. Comunicado Técnico, Embrapa, Brasília, DF, 2009.

HULVEY, J.; TELLE, S.; NIGRELLI, L.; LAMOUR, K.; THINES, M. Salisapiliaceae – a new family of oomycetes from marsh grass litter of southeastern North America. **Persoonia**, v. 25, n. 1, p. 109-116, 2010.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Censo Agropecuário 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>>. Acesso em 2 jul. 2024.

INFANTE, N. B. et al. First report of coriander (*Coriandrum sativum*) seedling damping-off caused by *Pythium irregulare* in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 2, p. 456-456, 2018.

JACQUET, M. *Pythium tracheiphilum* Matta. **Agent du flétrissement de la laitue (*Lactuca sativa* L.): Étude biologique et épidémiologique**. 1979. PhD thesis, Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve-d'Ascq, France.

JAGGER, I. C. **The Imperial strains of lettuce**. Washington: United States Department of Agriculture, 1941. (Circular, 596). Disponível em: <<https://archive.org/details/imperialstrains596jagg>>. Acesso em: 7 jul. 2024.

JENKINS, D. G.; COOK, K. L.; GARLAND, J. L.; BOARD, K. F. *Pythium* invasion of plant-based life support systems: Biological control and sources. **Life Support Biosphere Science**, v. 7, n. 2, p. 209-218, 2000.

JONES Jr, J. B. **Hydroponics: A Practical Guide for the Soilless Grower**. Boca Raton: CRC Press, 2016.

JUNQUEIRA, A. M. R.; ALMEIDA, I. L. A participação da agricultura familiar na produção de hortaliças e o mercado dos orgânicos. **Revista Cultivar**, 2010. Disponível em: <https://www.grupocultivar.com.br/noticias/artigo-a-participacao-da-agricultura-familiar-na-producao-de-hortaliças-e-o-mercado-dos-organicos>. Acesso em: 31 out. 2023.

KIEHR, M.; DELHEY, R.; LUSTO, J. Marchitamiento y podredumbre vascular (*Pythium tracheiphilum*) de lechuga en Bahía Blanca, Argentina. **Phyton (Buenos Aires)**, v. 84, n. 2, p. 423-426, 2015.

KIRK, P. M. et al. (Ed.). **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi**. 10. ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. **Anuário Brasileiro de Horu&Fruti 2019**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2018. 96 p.

KUMAR, R.; GUPTA, A. (Ed.). **Seed-borne diseases of agricultural crops: detection, diagnosis & management**. Singapore: Springer, 2020.

KUMAR, S. et al. First record of *Pythium tracheiphilum* associated with lettuce wilt and leaf blight in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 2, p. 7-9, 2007.

LATINOVIC, J.; LATINOVIC, N.; JAKŠE, J.; RADISEK, S. First report of white rust of rocket (*Eruca sativa*) caused by *Albugo candida* in Montenegro. **Plant Disease**, v. 103, n. 1, p. 163-163, 2019.

LEHARWAN, M.; GUPTA, M. Stem gall of coriander: a review. **Agricultural Reviews**, v. 40, n. 2, p. 121-128, 2019.

LÉVESQUE, C. A.; DE COCK, A. W. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, v. 108, n. 12, p. 1363–1383, 2004.

LIMA, M. F. et al. **Doença vira-cabeça em alface: sintomatologia, transmissão, epidemiologia e medidas de controle**. Circular Técnica, Embrapa, Brasília, DF, 2016.

LIMA, M. S. S. et al. Qualidade e produtividade econômica de cultivares de alface conduzidas nas condições edafoclimáticas do sudeste paraense. **Revista Agroecossistemas**, v. 10, n. 1, p. 227-240, 2018.

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

LOPES, L. H. **Etiologia e prevalência da podridão de saia em alface no Distrito Federal**. 2020. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

MADEIRA, R. N. et al. **Manual de produção de hortaliças tradicionais**. Brasília: Embrapa, 2013. 153 p.

MARIN, M. V. et al. Distribution of races and virulence factors of *Bremia lactucae* in the main lettuce production area in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 395-407, 2020.

MARTIN, F. N. Phylogenetic relationships among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene. **Mycologia**, v. 92, n. 4, p. 711–727, 2000.

MARTIN, F. N.; LOPER, J. E. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: Ecology, epidemiology, and prospects for biological control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 2, p. 111-181, 1999.

MATOS, F. A. C. et al. Alface. Saiba como cultivar hortaliças para colher bons negócios. **Agricultura Familiar**, Brasília: Plano Mídia, 2011.

- MATTA, A. Una malattia della lattuga prodotta da una nuova specie di *Pythium*. **Phytopatologia Mediterranea**, v. 4, p. 48–53, 1965.
- MELO, P. C. T.; VILELA, N. J. **Importância da cadeia produtiva brasileira de hortaliças**. In: 13º Reunião Ordinária da Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Hortaliças. Brasília: Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA, 2007.
- MENDES, M. A. S. et al. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998.
- MØLLER, K.; HOCKENHULL, J. Leaf and head rot of Chinese cabbage-a new field disease caused by *Pythium tracheiphilum* Matta. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 245-249, 1997.
- NGUYEN, H. et al. Whole genome sequencing and phylogenomic analysis show support for the splitting of genus *Pythium*. **Mycologia**, v. 114, p. 501-515, 2022. doi: 10.1080/00275514.2022.2045116.
- NORDSKOG, B. et al. Fungal pathogens in Norwegian lettuce fields. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B–Soil and Plant Science**, v. 58, n. 3, p. 230-235, 2008.
- NORONHA, M. A.; ASSUNÇÃO, M. C. **Identificação e manejo das principais doenças do coentro e alface no estado de Alagoas**. Comunicado Técnico, Embrapa, dez. 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/141878/1/cot-179.pdf>>. Acesso em: jul. 2024.
- OHSE, S. et al. Qualidade de cultivares de alface produzidos em hidroponia. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 181-185, 2001.
- OLIVEIRA, C. M. G.; ROSA, J. M. O. **Nematoides parasitos da alface**. PROSAF - Programa de Sanidade em Agricultura Familiar. Centro Experimental do Instituto Biológico, p. 1-14, 2014.
- PACÍFICO, M. G. Bacterioses - Terror da alface no plantio de verão. **Revista Campo & Negócios Hortifruti**, ago. 2017. Disponível em: <<https://revistacampoenegocios.com.br/bacterioses-terror-da-alface-no-plantiodeverao/>>. Acesso em: set. 2021.
- PARVEEN, T.; SHARMA, K. Management of “soft rot” of ginger by botanicals. **International Journal of Pharmaceutical Life Sciences**, v. 5, n. 4, p. 3478-3484, 2014.
- PERDOMO, D. N. et al. Identification of stable sources of rate-reducing resistance to *Septoria lactucae* in lettuce germplasm. **Phytoparasitica**, v. 51, n. 5, p. 1123-1132, 2023.
- PEREIRA, A. A. **Oomicetos (Oomycota) no campo agrícola de Nazária, Piauí - Sustentabilidade na prevenção e controle dos fitopatógenos em agricultura familiar**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- PEREIRA, M. F. S. et al. Composição nutricional de cultivares de coentro por ocasião do teste de emergência de plântulas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 5, p. 11, 2012.

PURQUEIRO, L. F. V. et al. Efeito da adubação nitrogenada de cobertura e do espaçamento sobre a produção de rúcula. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 464-470, 2007.

REIS, A.; LOPES, C. A.; LIMA, M. L. P.; BOITEUX, L. S. *Eryngium foetidum*, *Petroselinum crispum* and *Coriandrum sativum*: new apiaceae hosts of *Oidiopsis taurica* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 29, 339. 2004.

REIS, A.; RODRIGUES, F. A. **Murcha-de-fusário em alface: diagnose e manejo**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 72). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/779907/1/cot72.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2024.

REIS, A.; LOPES, C. A. **Doenças do coentro no Brasil**. 2016. Circular Técnica, Brasília, DF. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/157359/1/CT-157.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2024.

REIS, A. et al. **Principais doenças das brássicas causadas por fungos, oomicetos e protozoários: identificação e manejo**. 2021. Circular Técnica, Embrapa, Brasília, DF. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229882/1/CT-176-30dez2021.pdf>>. Acesso em: 4 jul. 2024.

RIETHMÜLLER, A.; VOGLMAYR, H.; GÖKER, M.; WEIß, M.; OBERWINKLER, F. Phylogenetic relationships of the downy mildews (*Peronosporales*) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. **Mycologia**, v. 94, n. 5, p. 834–849, 2002.

ROBIDEAU, G. P. et al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 1002–1011, 2011.

SALA, F. C. et al. Reação de cultivares de alface a *Thielaviopsis basicola*. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 398-400, 2008.

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

SANTOS, R. P. A. **Características agronômicas e qualidade da alface (*Lactuca sativa* L.) sob fertilização orgânica e mineral**. 2016. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SANTOS, R. S. S. et al. Uso de águas salobras na produção de rúcula cultivada em substrato de fibra de coco. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 113-118, 2012.

SAUVAGEAU, A.; GRAVEL, V.; VAN DER HEYDEN, H. Soilborne inoculum density and environmental parameters influence the development of *Pythium* stunt caused by *Pythium tracheiphilum* in head lettuce crops. **Plant Disease**, v. 103, n. 7, p. 1685-1692, 2019.

SCHROEDER, K. L. et al. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. **Plant Disease**, v. 97, p. 4-20, 2013.

SILVA, E. M. et al. Primeiro relato de *Pythium aphanidermatum* causando tombamento, podridão de colo e raiz de coentro no Brasil. **Journal of General Plant Pathology**, p. 168–172, 2024. doi: 10.1007/s10327-024-01171-7.

SILVA, A.; DE JESUS SILVA, A.; DE JESUS BENEVIDES, C. M.; Revisão sistemática sobre PANC no Brasil: aspectos nutricionais e medicinais. **Scientia: Revista Científica Multidisciplinar**, v. 7, n. 1, p. 132-151, 2022.

SINGH, A., DUBEY, P.K., CHAURASIYA, R., MATHUR, N.; KUMAR, G.; BHARATI, S.; ABHILASH, P.C. Indian spinach: an underutilized perennial leafy vegetable for nutritional security in developing world. **Energ. Ecol. Environ.** 3, 195–205, 2018. doi: 10.1007/s40974-018-0091-1.

SOUTO, M. S. et al. Aquaponia x produção convencional: influência de doenças na produtividade na cultura da rúcula (*Eruca sativa*). **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 7, p. 22094-22111, 2023.

SOUSA, T.P.de; SOUZANETO, E.P.; SILVEIRA, L. R. de S.; SANTOSFILHO, E. F. DOS; MARACAJÁ, P. B. Produção de alface (*Lactuca sativa* L.), em função de diferentes concentrações e tipos de biofertilizantes. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 4, p. 168–172, 2014.

SOUZA, N. C. F. de C.; BORGES, L. da S.; AVIZ, R. O. de; CASAIS, L. K. N. **Relato de experiência: cultivo de coentro em diferentes sistemas hidropônicos**. In: SOUZA, N. C. F. de C.; BORGES, L. da S.; AVIZ, R. O. de; CASAIS, L. K. N. (Eds.). **Manejo fisiológico e nutricional de plantas: abordagens práticas na agricultura**. Guarujá: Científica Digital, 2023.

STANGHELLINI, M. E.; RASMUSSEN, S. L. Hydroponics. A solution for zoosporic pathogens. **Plant Disease**, v. 78, p. 1125-1132, 1994.

STANGHELLINI, M. E.; KRONLAND, W. C. Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 70, n. 11, p. 1053-1056, 1986.

SUTTON, J. C. et al. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 307-321, 2006.

TALUBNAK, C. et al. Morphological and molecular identification of *Pythium* spp. from hydroponically-grown lettuce. **Science & Technology Asia**, p. 143-154, 2022.

TEIXEIRA, L. D.; ZOTTARELLI, C. L. A. P.; KIMATI, H. Efeito da temperatura no crescimento micelial e patogenicidade de *Pythium* spp. que ocorrem em alface hidropônica. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 221-226, 2006.

TOFOLI, J. G. et al. **Fusariose da alface: agente causal, sintomas e manejo**. Comunicado Técnico, n. 168, Instituto Biológico, 2012. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/publicacoes/comunicados-documentos-tecnicos/comunicados-tecnicos/fusariose-da-alface-agente-causal-sintomas-e-manejo#:~:text=A%20fusariose%20do%20alface%20%C3%A9,atrofia%20e%20morte%20da s%20plantas>>. Acesso em: 1 jul. 2024.

TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. Míldio e mofo branco da alface: doenças típicas de inverno. **Instituto Biológico**, v. 76, p. 19-24, 2014.

TORTOLERO, O.; SEQUEIRA, L. A vascular wilt and leaf blight disease of lettuce in Wisconsin caused by a new strain of *Pythium tracheiphilum*. **Plant Disease Reporter**, v. 62, p. 616-620, 1978.

UZUHASHI, S.; KAKISHIMA, M.; TOJO, M. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. **Mycoscience**, v. 51, n. 5, p. 337-365, 2010.

VAN DER HEYDEN, H. et al. Detection and quantification of *Pythium tracheiphilum* in soil by multiplex real-time qPCR. **Plant Disease**, v. 103, n. 3, p. 475-483, 2019.

VAN DER PLAATS-NITERINK, A. J. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*, n. 21, 1981.

VANJILDORJ, E. et al. Enhancement of tolerance to soft rot disease in the transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) inbred line, Kenshin. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 1581–1591, 2009.

VILELA, N. J.; LUENGO, R. F. A. Produção de hortaliças folhosas no Brasil. **Campo & Negócios Hortifruti**, Uberlândia, ano XII, n. 146, p. 22-27, 2017.

VILLA NO, K.; KAGEYAMA, K.; ASANO, T.; SUGA, H. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 410–422, 2006.

VRIES, I. M. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 165-174, 1997.

WATERHOUSE, G. M. Key to the species of *Phytophthora* de Barry. **Mycological Papers**, v. 92, p. 1–22, 1963.

WOODSTOCK, L. W.; TAYLORSON, R. B. Ethanol and acetaldehyde in imbibing soybean seeds in relation to deterioration. **Plant Physiology**, v. 67, p. 424–428, 1981.

XU, Z. H. et al. Breeding of salad rocket (*Eruca sativa* Mill.) varieties for healthy functional proposes. **Journal of Agricultural, Life and Environmental Science**, v. 26, n. 1, p. 24-30, 2014.

YÁÑEZ, L. D. T. **Identificação, patogenicidade e sensibilidade a produtos químicos in vitro de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.).** 2000. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

ZHENG, S.; WANG, Q.; ZUOA, J. **Handling and processing of fresh-cut leafy vegetables.** Acta Horticulturae, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1319.14>>. Acesso em 05 ago. 2024.

CAPÍTULO II

Diversidade de espécies e caracterização de isolados de três gêneros de oomicetos associados a cultivos da alface no Brasil: *Pythium*, *Globisporangium* e *Phytophthium*

Diversidade de espécies e caracterização de isolados de três gêneros de oomicetos associados a cultivos da alface no Brasil: *Pythium*, *Globisporangium* e *Phytophythium*.

Éllen Junia Canedo¹, Ruthe Lima de Souza, Fabiana Helena Silva Ribeiro Martins, Maria Esther de Noronha Fonseca², Josiene Silva Veloso¹, Leonardo Silva Boiteux^{1,2}, Ailton Reis^{1,2}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife-PE, Brasil;

²Embrapa Hortaliças, 70275-970, Brasília-DF, Brasil.

Resumo

A alface (*Lactuca sativa*) é uma das hortaliças folhosas mais populares no Brasil e no mundo. Todavia, durante seu cultivo, várias doenças podem comprometer a produção e a qualidade do produto. Algumas doenças muito importantes da cultura são aquelas causadas por espécies de oomicetos do complexo *Pythium*. Estes oomicetos habitam e persistem na maioria dos solos agrícolas por longos períodos de tempo, podendo causar tombamento de mudas, podridão de raiz e podridão de folhas baixas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular de isolados do complexo *Pythium* coletados de plantas de alface e avaliar a relação filogenética desses isolados. Os isolados foram obtidos de plantas infectadas coletadas em diversos estados brasileiros. A identificação dos isolados foi realizada por meio da análise filogenética com base nas sequências das regiões ITS e Cox II. Foram identificados três gêneros de oomicetos do complexo *Pythium* em alface: *Pythium*, *Globisporangium* e *Phytophythium*. As espécies identificadas foram *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. graminicola*, *P. catenulatum*, *P. tracheiphilum*, *P. helicoides*, *G. irregulare*, *G. spinosum*, *G. sylvaticum*, *G. acanthophoron*, *G. ultimum* e *G. splendens*. Além disso, não foi possível definir a nível de espécie um subgrupo de isolados *Pythium* e *Globisporangium*. Destaca-se a frequência de *P. tracheiphilum*, que se mostrou a espécie mais prevalente, principalmente em estados como São Paulo, Rio de Janeiro e Distrito Federal. Além disso, foram feitos registros inéditos de *G. ultimum*, *G. splendens*, *G. acanthophoron* e *P. graminicola* em alface, ampliando o conhecimento sobre a diversidade de patógenos que afetam essa cultura. Desta forma, esta pesquisa oferece uma contribuição valiosa para o conhecimento da diversidade de oomicetos em alfaces no Brasil, ressaltando a importância de desenvolver e aplicar estratégias eficazes de controle e prevenção, a fim de minimizar perdas na produção de alface causadas por este grupo de patógenos.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*, patógenos de solo; oomicetos, etiologia.

Abstract

Lettuce (*Lactuca sativa*) is one of the most popular leafy vegetables in Brazil and worldwide. However, during its cultivation, various diseases can compromise both the production and quality of the crop. Among the most important diseases affecting lettuce are those caused by species of oomycetes within the *Pythium* complex. These oomycetes persist in most agricultural soils for long periods, potentially causing seedling damping-off, root rot, and bottom leaf rot. Given this, the objective of this study was to perform the molecular characterization of isolates from the *Pythium* complex collected from lettuce plants and to evaluate the phylogenetic relationships of these isolates. The isolates were obtained from infected plants collected in various Brazilian states. The identification of the isolates was carried out through phylogenetic analysis based on sequences from the ITS and Cox II regions. Three genera of oomycetes from the *Pythium* complex were identified in lettuce: *Pythium*, *Globisporangium*, and *Phytopythium*. The identified species were *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. graminicola*, *P. catenulatum*, *P. tracheiphilum*, *P. helicoides*, *G. irregulare*, *G. spinosum*, *G. sylvaticum*, *G. acanthophoron*, *G. ultimum*, and *G. splendens*. Furthermore, it was not possible to define certain *Pythium* and *Globisporangium* isolates at the species level. Of particular note is the frequency of *P. tracheiphilum*, which proved to be the most prevalent species, especially in states such as São Paulo, Rio de Janeiro, and the Federal District. Additionally, new records of *G. ultimum*, *G. splendens*, *G. acanthophoron*, and *P. graminicola* in lettuce were made, expanding knowledge about the diversity of pathogens affecting this crop. Thus, this research provides a valuable contribution to the understanding of oomycete diversity in lettuce in Brazil, highlighting the importance of developing and implementing effective control and prevention strategies to minimize losses in lettuce production caused by this group of pathogens.

Keywords: *Lactuca sativa*, soil-borne pathogens, oomycetes, etiology.

Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma espécie pertencente à família Asteraceae (Alconero *et al.*, 1988), sendo considerada a hortaliça folhosa mais importante do mundo (Shatilov *et al.*, 2019). No Brasil a alface é a hortaliça folhosa mais plantada e consumida (Embrapa, 2023). Além da sua importância como alimento, há a questão socioeconômica, no que tange a geração de empregos, renda e desenvolvimento de diferentes elos de toda a cadeia produtiva. Os tipos de alface mais consumidos no mercado brasileiro são as crespas, americanas e lisas. As cultivares do tipo roxas e folhas frisadas também são encontradas. Algumas cultivares foram selecionadas para o cultivo no verão e/ou para regiões tropicais (Embrapa, 2023).

Muitas doenças afetam o cultivo da alface, que pode ser infectada por fungos, oomicetos, bactérias, vírus e nematoides. No que diz respeito aos oomicetos, diferentes espécies do complexo *Pythium* também têm sido relatadas como causadoras de importantes doenças em alface. Entre os oomicetos do complexo *Pythium* estão incluídos patógenos de solo que possuem micélio em fase vegetativa, esporângios e zoósporos na fase assexual, e oósporos de origem sexual (Arora *et al.*, 2021). Os esporângios podem produzir tubos hifais ou zoósporos em condições de alta umidade. Na presença de exsudados das raízes, os propágulos germinam rapidamente e penetram nas plantas. As espécies de *Pythium* também sobrevivem de maneira saprofítica como micélio no solo, e em sementes, mudas e plantas jovens, ocasionando a morte dos hospedeiros (Hendrix; Campbell; 1973).

Após análises mais amplas, o gênero *Pythium* foi considerado como sendo polifilético de acordo com dados de morfologia e filogenia de sequências de DNA (Uzuhashi *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2022). Atualmente, o complexo *Pythium* foi subdividido em cinco gêneros, englobando *Elongisporangium*, *Globisporangium*, *Phytopythium*, *Pilasporangium* e *Pythium sensu strictu*. Nesse contexto, o estudo das relações evolutivas entre as espécies do complexo *Pythium* é fundamental para a identificação e classificação precisa desses patógenos.

Doenças da alface induzidas por membros deste complexo têm sido relatadas em diversos países, incluindo Nova Zelândia (*P. acanthicum* e *P. debaryanum*), Austrália (*P. tracheiphillum* e *G. irregulare*), França (*P. tracheiphillum*), México (*P. aphanidermatum* e *P. debaryanum*), China (*P. aphanidermatum*), Itália (*P. tracheiphilum* e *G. sylvaticum*), Estados Unidos (*P. catenulatum* e *P. debaryanum*) e Brasil (*G. ultimum*, *P. oopapillum*, *P. debaryanum* e *P. tracheiphilum*) (Farr & Rossman, 2024; Barboza *et al.*, 2024).

No entanto, no Brasil, ainda há uma escassez de informações sobre a diversidade e a distribuição geográfica de espécies deste complexo. Diante disso, os objetivos do presente

estudo foram: **(1)** realizar a caracterização molecular de isolados do complexo de *Pythium* coletados de plantas de alface em diferentes regiões produtoras do Brasil; e **(2)** estimar as relações filogenéticas deste conjunto de isolados com base em sequências das regiões ITS e Cox II;

Material e métodos

Local dos ensaios

Os experimentos foram realizados nas casas de vegetação e nos Laboratórios de Fitopatologia, Melhoramento Genético Vegetal e Análise Genômica da Embrapa Hortaliças, situada na zona rural de Ponte Alta, em Brasília–DF (coordenadas 15°56'00" de latitude sul, 48°08'00" de longitude oeste) e altitude de 997,6 m.

Obtenção e preservação dos isolados do complexo *Pythium*

Os isolados de *Pythium* foram obtidos de amostras de plantas de alface infectadas obtidas em campo de produção ou recebidas na clínica fitopatológica da Embrapa Hortaliças. As amostras de alface apresentavam diversos sintomas tais como tombamento de mudas, murcha vascular, podridão de colo, podridão de folha e podridão de raiz. O isolamento foi realizado a partir de fragmentos de raiz, folha e caule com sintomas das doenças. Os tecidos próximos à margem da lesão foram desinfestados em álcool a 70% por um minuto e depois em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por dois minutos. Em seguida, foram lavados duas vezes em água destilada e esterilizada, e secos em papel de filtro esterilizado. Após o processo de desinfestação superficial, os fragmentos de aproximadamente 5 mm foram transferidos para placas de Petri contendo meio V8 clarificado (100 mL de suco V8, 9 g de ágar, 1,5 g de CaCO₃, 400 mL de água destilada) (Campbell®), suplementado com antibióticos e fungicidas nas seguintes concentrações: Benomyl (40 mg.L⁻¹) (E. I. duPont De Nemours, Inc. Wilmington, DE), Ampicilina (100 mg.L⁻¹) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), Rifampicina (10 mg.L⁻¹) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Pentacloronitrobenzeno - PCNB (30 mg.L⁻¹) (Uniroyal Chemical Co. Naugatuck, CT) e Nistatina (50 mg.L⁻¹) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), conforme descrito por Masago *et al.* (1977). As placas foram incubadas em BOD a 25°C. Após um a três dias, pontas de hifas foram transferidas para meio V8 clarificado e incubadas em

câmara de crescimento a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas (Mussi-Dias *et al.*, 2011). Os isolados obtidos foram preservados pelo método de Castellani (Castellani, 1939).

Extração de DNA

O micélio de cada isolado de *Pythium* foi produzido através da transferência de discos da cultura para placas de Petri com meio V8. As placas foram mantidas em uma incubadora de crescimento (BOD) a uma temperatura constante de 25 °C, no escuro por três a sete dias. Após isto, em uma câmara de fluxo laminar, uma porção do micélio foi cuidadosamente removida das placas com um bisturi esterilizado e transferida para microtubos autoclavados de 2 mL. Posteriormente, três esferas de inox foram adicionadas a cada tubo contendo o micélio e adicionou-se 750 µL de solução CTAB (Tris 0,5M; pH 8,0; EDTA 0,002M; NaCl 1,4M; CTAB 2%) (Boiteux et al. 1999), suplementado com sulfito de sódio 0,2%. O micélio foi triturado utilizando o equipamento Precellys (Bertin Technologies). Logo em seguida, os tubos foram submetidos a um banho maria (65 °C por 1 minuto). Após o banho maria, os tubos foram deixados em temperatura ambiente para esfriar por 3 minutos. Foi adicionado 750 µL de clorofil (24:1), uma mistura de 24 partes de clorofórmio para uma parte de álcool isoamílico.

Os tubos foram então agitados em vórtex em alta velocidade e, em seguida, submetidos à centrifugação (9.000 x rpm por 5 minutos). Na sequência, transferiu-se cuidadosamente 600 µL do sobrenadante superior (fase aquosa) para tubos autoclavados de 1,5 mL, e posteriormente, foram adicionados 300 µL de isopropanol gelado. Os microtubos foram então agitados por inversão manual e centrifugados (12.000 rpm por 13 minutos). O líquido sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido a lavagem única com álcool 70%. Os pellets aderidos ao fundo dos tubos foram deixados para secar dentro da câmara de fluxo laminar por 30 minutos. Após a secagem, o DNA foi diluído cuidadosamente em 100 µL de TE (Tris 0,01M; EDTA 0,001M; pH 7,0). As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até as próximas etapas do trabalho.

Amplificação e sequenciamento de DNA

Para a utilização na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o DNA extraído foi analisado em gel de agarose após eletroforese, em tampão TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA) a 0,5%, realizada a 100V por 2 horas. Em seguida o gel foi corado em brometo de etídio e registrado em fotodocumentador L-Pix ST (Loccus Biotecnologia). As reações de PCR foram

realizadas em termociclador MyCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc). Para amplificação e sequenciamento da região ITS, foram utilizados os primers universais ITS5 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS4 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') que amplificaram as regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do DNA ribossômico (White *et al.*, 1990). Para o gene *Cox II*, foram utilizados os primers PF34 (5'-GGC AAA TGG GTT TTC AAG ATC C-3') e PF35 (5'-CCA TGA TTA ATA CCA CAA ATT TCA CTA C-3') (Hudspeth *et al.*, 2000). Os produtos da PCR foram purificados utilizando o Kit de Purificação PureLink®.

A amplificação da região *Cox II* ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96 °C por 4 minutos; desnaturação a 96 °C por 30 segundos; anelamento a 50 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, repetidas 35 vezes; extensão final a 72 °C por 4 minutos. Já para a região ITS, o ciclo da PCR foi constituído por uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; desnaturação inicial a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos, e por fim, um ciclo de extensão final a 72 °C por 7 minutos (Barboza, 2020). Após a purificação, os produtos da PCR foram sequenciados no ACTGene Análises Moleculares (Alvorada-RS).

Caracterização molecular e análise filogenética dos isolados

A edição e a obtenção das sequências consensos foi feita por meio do programa Dragon v.1.6.0 (<http://www.dna-dragon.com/>). Posteriormente, as sequências consenso foram comparadas com os dados do NCBI via ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn). Sequências representando ex-tipos e sequências publicadas relacionadas foram recuperadas do GenBank (**Tabela Suplementar 1**). As sequências foram alinhadas usando método de refinamento iterativo G-INS-i no programa online MAFFT v.7 (Katoh & Toh, 2013; Katoh *et al.*, 2019), com parâmetros padrão para abertura e extensão de lacunas e matriz de pontuação de nucleotídeos 200PAM / $\kappa=2$ e ajustada manualmente quando necessário no MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). As relações filogenéticas de cada região e da matriz concatenada foram inferidas utilizando a Máxima Verossimilhança (ML), usando IQ-TREE v2.1.3 (Nguyen *et al.*, 2015). Os modelos de substituição mais adequados foram selecionados pelo ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017; Minh *et al.*, 2020). Os suportes dos ramos foram estimados usando o teste de razão de verossimilhança aproximada com interpretação Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT; Guindon *et al.*, 2010) e o suporte bootstrap ultrarrápido (UFboot) (Minh *et al.*, 2013; Hoang *et al.*, 2017) com 1000 de bootstrap. Os clados foram considerados bem suportados quando o suporte bootstrap ML foi ≥ 95 (UFboot) e ≥ 80 (SH-aLRT). As árvores

filogenéticas foram visualizadas no FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2012) e editadas no software Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems, EUA). A filogenia utilizando as sequências *Cox II* e ITS, foi realizada tanto para as espécies identificadas como pertencentes ao gênero *Pythium* quanto para as espécies inicialmente identificadas como *Globisporangium*, cada uma comparada com isolados referência depositados no NCBI. Por fim, foi realizada a filogenia para as espécies identificadas como *Pythium* e *Globisporangium* a partir da concatenação das sequências amplificadas de *Cox II* e ITS.

Resultados

Foram obtidos setenta e oito isolados de oomicetos, cinquenta e quatro de *Pythium* sp., dois de *Phytophythium* sp. e vinte e dois de *Globisporangium* sp., associados com o cultivo da alface em diferentes regiões geográficas do Brasil (**Tabela 1**). Com base na comparação das sequências de *Cox II* com as disponíveis no NCBI foi possível identificar trinta e cinco isolados de *P. tracheiphilum*, um isolado de *P. graminicola*, quatro de *P. aphanidermatum*, um de *P. oopapillum*, um de *P. myriotylum*, um de *P. catenulatum*, três de *P. deliense*, um de *G. spinosum*, quatro de *G. sylvaticum*, nove de *G. ultimum*, um de *G. acanthophoron*, quatro de *G. splendens* e um de *Phytophythium helicoides*. No entanto, oito isolados (PYT 870, PYT 871, PYT 928, PYT 862, PYT 884, PYT 992, PYT 985 e PYT 1030) não foram identificados ao nível de espécie, sendo designados como *Pythium* sp.. O mesmo ocorreu para dois isolados de *Globisporangium* (PYT 732 e PYT 982) que também não foram identificados ao nível de espécie, sendo designados como *Globisporangium* sp..

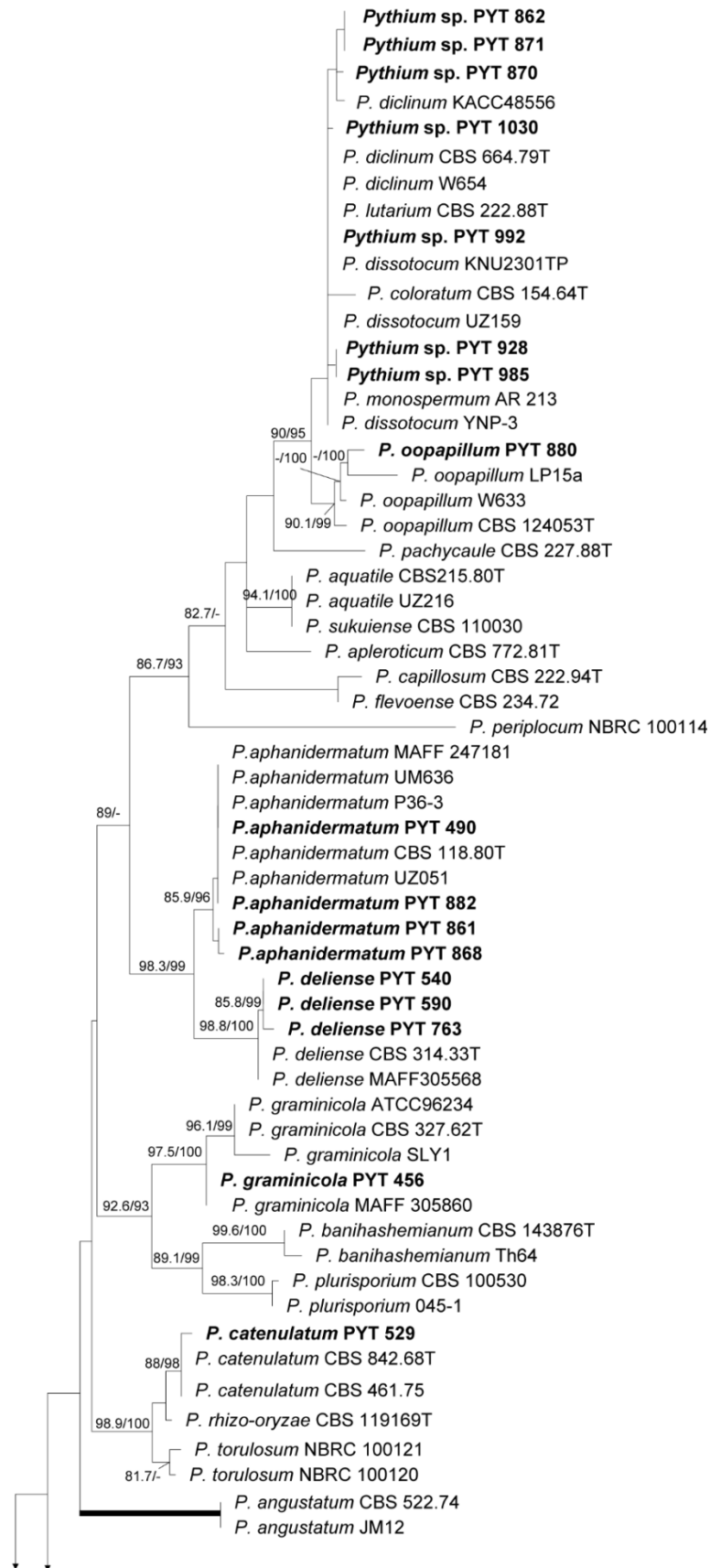
Tabela 1. Setenta e três isolados de oomicetos dos gêneros *Pythium*, *Phytophythium* e *Globisporangium* obtidos de alface em diferentes unidades federativas do Brasil, entre 2012 e 2023, que identificados no presente trabalho com base na região gênica *Cox II*.

Isolado	Local	Espécie	Mês/Ano
PYT 456	Embu Guaçu-SP	<i>P. graminicola</i>	03/2012
PYT 490	Petrolina-PE	<i>P. aphanidermatum</i>	06/2014
PYT 499	Goiânia-GO	<i>G. ultimum</i>	06/2014
PYT 529	Altamira-PA	<i>P. catenulatum</i>	10/2014
PYT 540	Altamira-PA	<i>P. deliense</i>	02/2015
PYT 552	Porto Belo-SC	<i>G. spinosum</i>	02/2015
PYT 590	São Sebastião-DF	<i>P. deliense</i>	10/2016
PYT 729	Brazlândia-DF	<i>G. ultimum</i>	02/ 2019
PYT 731	Brazlândia-DF	<i>G. sylvaticum</i>	02/ 2019
PYT 732	Brazlândia-DF	<i>Globisporangium</i> sp.	02/ 2019

PYT 734	Estrutural–DF	<i>G. ultimum</i>	02/ 2019
PYT 740	Estrutural–DF	<i>G. ultimum</i>	02/ 2019
PYT 743	Estrutural–DF	<i>G. ultimum</i>	02/ 2019
PYT 753	Vargem Bonita–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	03/2019
PYT 754	Vargem Bonita–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	03/2019
PYT 758	Brazlândia–DF	<i>G. acanthophoron</i>	03/2019
PYT 759	Samambaia–DF	<i>G. ultimum</i>	03/2019
PYT 763	Samambaia–DF	<i>P. deliense</i>	03/2019
PYT 779	Ceilândia–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	03/2019
PYT 810	Vargem Bonita–DF	<i>G. ultimum</i>	09/2019
PYT 845	Mogi das Cruzes–SP	<i>G. splendens</i>	06/2021
PYT 849	Nova Friburgo–RJ	<i>G. splendens</i>	06/2021
PYT 851	Nova Friburgo–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2021
PYT 853	Nova Friburgo–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2021
PYT 854	Nova Friburgo–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2021
PYT 855	Nova Friburgo–RJ	<i>G. sylvaticum</i>	06/2021
PYT 856	Teresópolis–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2021
PYT 857	Teresópolis–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2021
PYT 858	Teresópolis–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2021
PYT 859	Teresópolis–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2021
PYT 861	Teresópolis–RJ	<i>P. aphanidermatum</i>	06/2021
PYT 862	Nova Friburgo–RJ	<i>Pythium</i> sp.	06/2021
PYT 865	Teresópolis–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2021
PYT 868	Loveira–SP	<i>P. aphanidermatum</i>	06/2021
PYT 870	Loveira–SP	<i>Pythium</i> sp.	06/2021
PYT 871	Loveira–SP	<i>Pythium</i> sp.	06/2021
PYT 875	Marechal Floriano–ES	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2021
PYT 880	Vargem Bonita–DF	<i>P. oopapillum</i>	07/2021
PYT 882	Teresópolis–RJ	<i>P. aphanidermatum</i>	07/2021
PYT 884	Cidade Estrutural–DF	<i>Pythium</i> sp.	12/2021
PYT 896	Antônio Carlos–SC	<i>G. ultimum</i>	12/2021
PYT 897	Cidade Estrutural–DF	<i>G. ultimum</i>	12/2021
PYT 898	Cidade Estrutural–DF	<i>G. sylvaticum</i>	12/2021
PYT 899	São Leopoldo–RS	<i>G. sylvaticum</i>	12/2021
PYT 928	Biritiba Mirim–SP	<i>Pythium</i> sp.	04/2022
PYT 930	Teresópolis–RJ	<i>Phytophythium helicoides</i>	04/2022
PYT 931	Sumidouro–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	04/2022
PYT 932	Sumidouro–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	04/2022
PYT 934	Biritiba Mirim–SP	<i>P. tracheiphilum</i>	04/2022
PYT 947	Nova Friburgo–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	04/2022
PYT 948	Nova Friburgo–RJ	<i>Phytophythium helicoides</i>	04/2022
PYT 949	Nova Friburgo–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	04/2022
PYT 950	Piedade–SP	<i>P. myriotylum</i>	04/2022
PYT 981	Conchal–SP	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2022
PYT 982	Conchal – SP	<i>Globisporangium</i> sp.	06/2022
PYT 983	Conchal–SP	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2022
PYT 984	Conchal–SP	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2022

PYT 985	Padre Bernardo–GO	<i>Pythium</i> sp.	06/2022
PYT 992	Sete Lagoa–MG	<i>Pythium</i> sp.	08/2022
PYT 1000	Vitória de Santo Antão–PE	<i>G. splendens</i>	12/2022
PYT 1001	Vitória de Santo Antão–PE	<i>G. splendens</i>	12/2022
PYT 1009	Domingos Martins–ES	<i>P. tracheiphilum</i>	02/2023
PYT 1013	Mogi das Cruzes–SP	<i>P. tracheiphilum</i>	03/2023
PYT 1015	Piedade–SP	<i>P. tracheiphilum</i>	03/2023
PYT 1016	Piedade–SP	<i>P. tracheiphilum</i>	03/2023
PYT 1017	Americana–SP	<i>P. tracheiphilum</i>	03/2023
PYT 1024	Samambaia–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	05/2023
PYT 1025	Samambaia–DF	<i>G. ultimum</i>	06/2023
PYT 1026	Gama–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2023
PYT 1027	Gama–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2023
PYT 1028	Gama–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2023
PYT 1029	Teresópolis–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2023
PYT 1030	Piedade–SP	<i>Pythium</i> sp.	06/2023
PYT 1031	Teresópolis–RJ	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2023
PYT 1032	Recanto das Emas–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2023
PYT 1038	Vargem Bonita–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2023
PYT 1039	Vargem Bonita–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2023
PYT 1040	Vargem Bonita–DF	<i>P. tracheiphilum</i>	06/2023

Na árvore filogenética das espécies de *Pythium* em alface baseada na informação de *Cox* II (**Figura 1**), cinco isolados (PYT 870, PYT 871, PYT 928, PYT 985 e PYT 1030) identificados como *Pythium* sp. pelo BLAST, sendo agrupados em um clado inespecífico com os isolados referência de *P. dissotocum*, *P. lutarium*, *P. coloratum* e *P. monospermum* (SH-aLRT = 90 e bootstrap = 95).). O isolado PYT 880 foi agrupado no clado de *P. oopaplum* (SH-aLRT = 90,1 e bootstrap = 99), enquanto o isolado PYT 950 agrupou no clado de *P. myriotylum* com SH de 97,3 e bootstrap de 100. Três isolados, identificados como *P. deliense* (PYT 540, PYT 590, PYT 763), foram agrupados com os isolados de referência desta espécie (SH-aLRT = 98,8 e bootstrap = 100). Três isolados (PYT 490, PYT 861 e PYT 868) agruparam num clado com referências da espécie *P. aphanidermatum* (SH-aLRT = 85,9 e bootstrap = 96). Os isolados de *P. graminicola* (PYT 456) e de *P. catenulatum* (PYT 529) também foram agrupados junto aos isolados de referência destas espécies (SH-aLRT = 97,5 e 88, e bootstrap = 100 e 98, respectivamente). Além disso, destacou-se um grande clado, que agrupou a maioria dos isolados obtidos de alface (35 isolados) com isolados referência de *P. tracheiphilum* (SH-aLRT = 99,5 e bootstrap = 100).



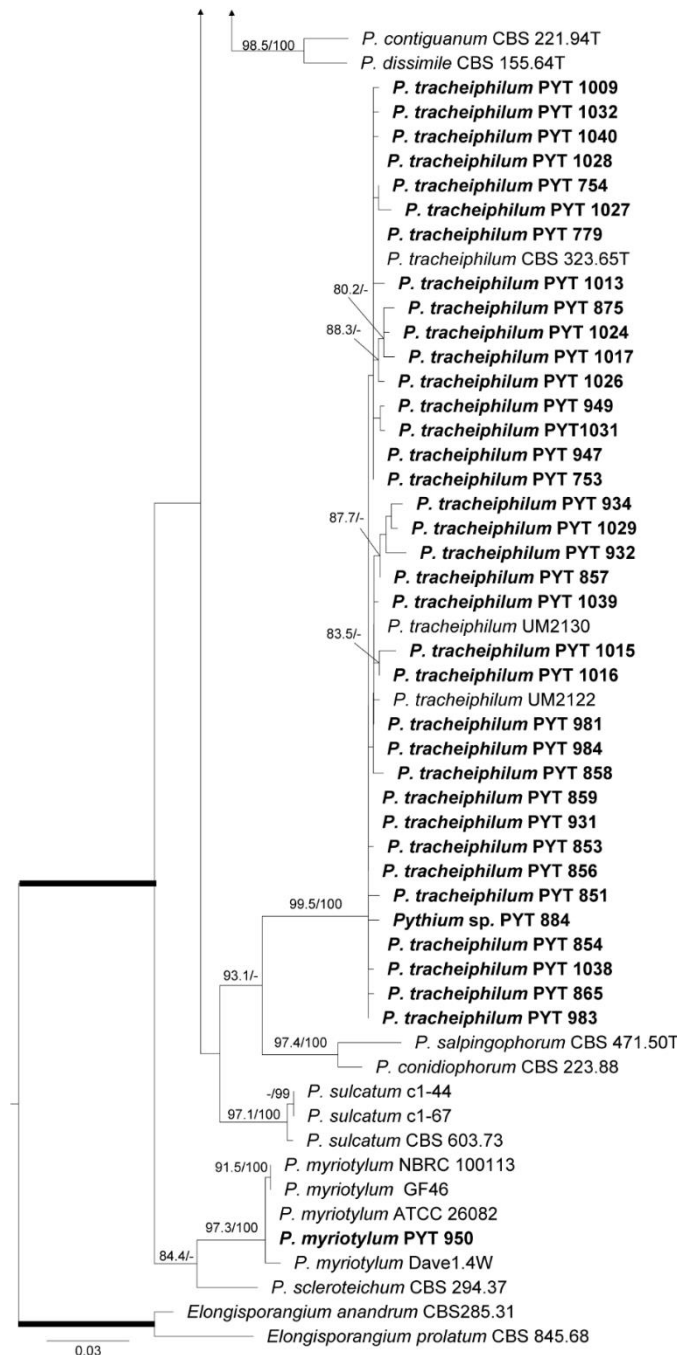


Figura 1. Árvore filogenética baseada na informação da sequência *Cox II* de isolados de espécies de *Pythium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

A árvore filogenética das espécies de *Phytopythium* em alface, baseada em *Cox II* (**Figura 2**), agrupou o isolado PYT 948 junto aos isolados de referência de *P. helicoides* (SH-aLRT = 90,4 e bootstrap = 97).

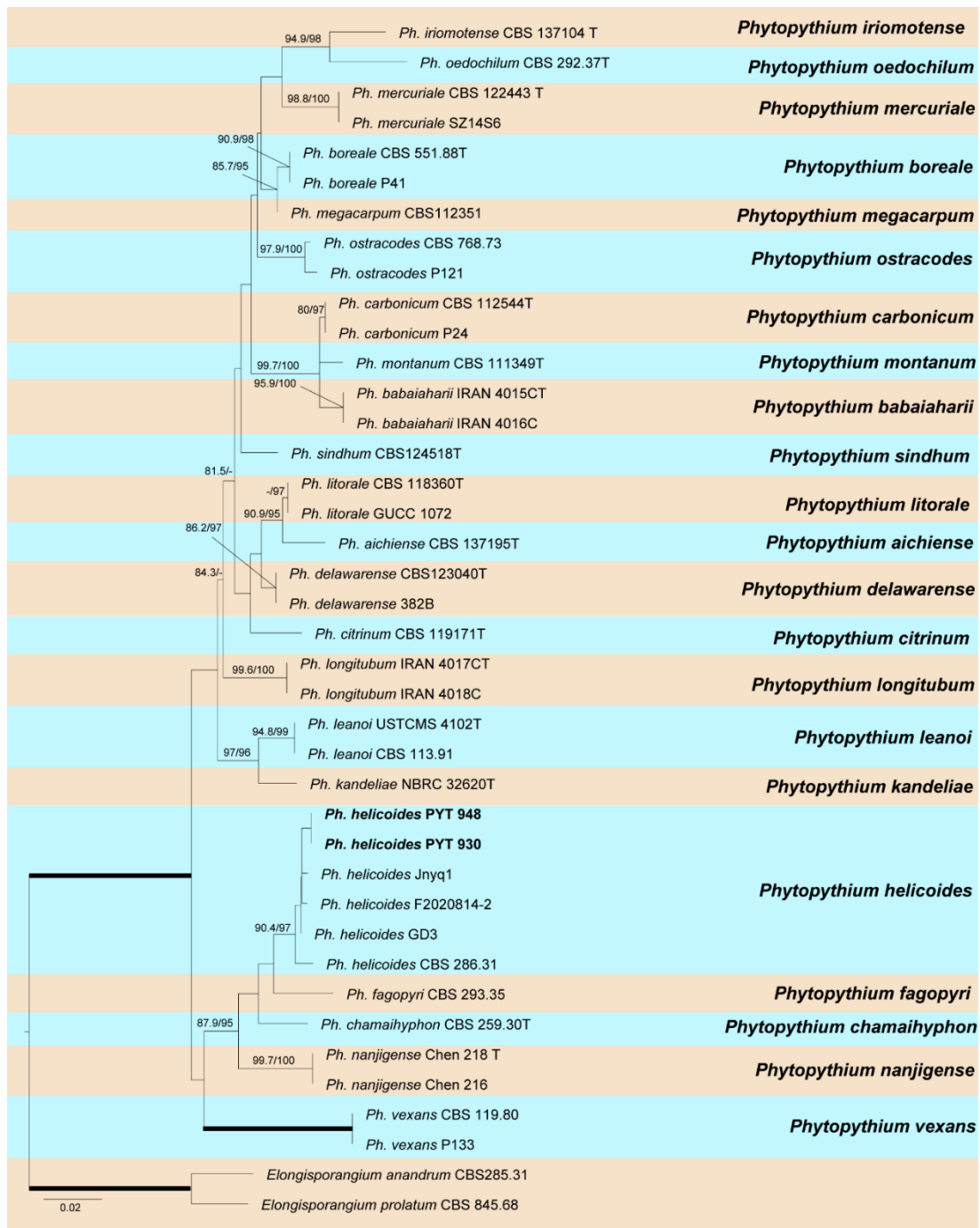
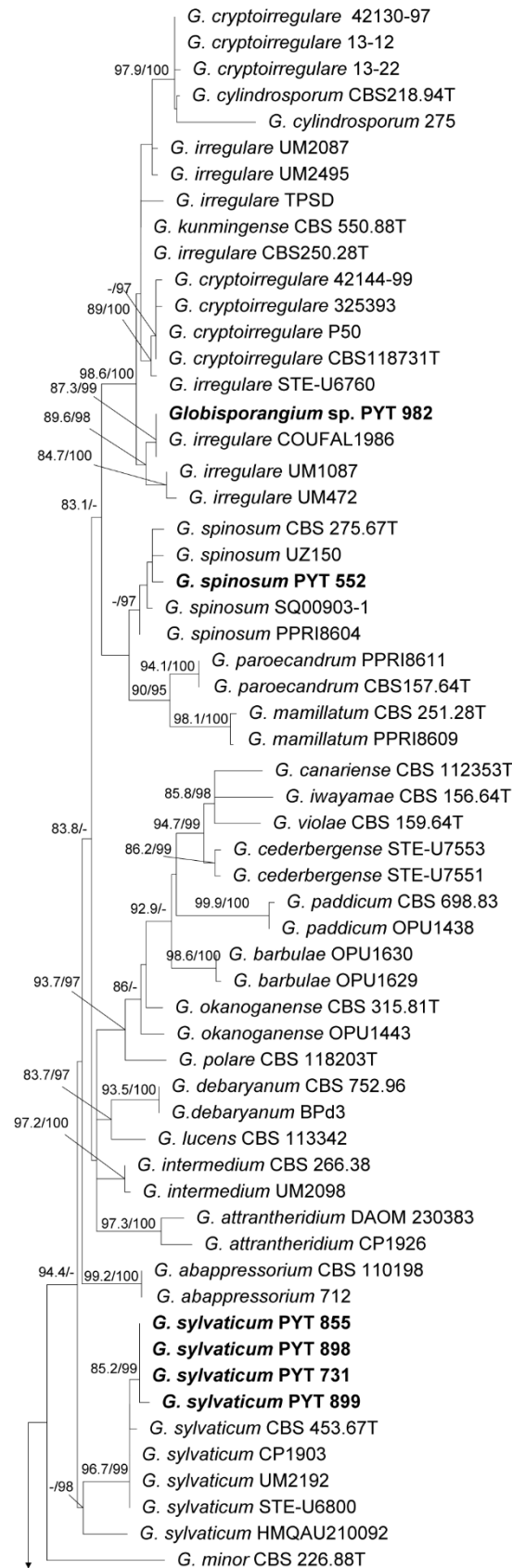


Figura 2. Árvore filogenética baseada na informação da sequência Cox II de isolados de espécies de *Phytophthora* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

A árvore de *Globisporangium* em alface, baseada na região *Cox II* (Figura 3), agrupou o isolado PYT 982 no mesmo clado das espécies de referência de *G. irregulare* (SH-aLRT = 85,6 e bootstrap = 99). Já o isolado PYT 732 (classificado como *Globisporangium* sp., pelo BLAST) foi agrupado com o isolado de referência de *G. solare*. O isolado identificado como *G. spinosum* (PYT 552) foi agrupado com isolados de referência da mesma espécie, bem como *G. acanthophoron* (PYT 758) (bootstraps = 97 e 100, respectivamente). Os isolados de *G. sylvaticum* (PYT 855, PYT 898, PYT 731 e PYT 899) também foram classificados no mesmo clado de outras espécies de *G. sylvaticum* (SH-aLRT = 96,7 e bootstrap = 99). Os isolados classificados como *G. ultimum* formam um grande clado junto com isolados de referência da mesma espécie (SH-aLRT = 99,3 e bootstrap = 99). Por fim, os isolados identificados como *G. splendens* (PYT 1000, PYT 1001, PYT 845 e PYT 849) estão reunidos com isolados de referência da mesma espécie (bootstrap = 97).



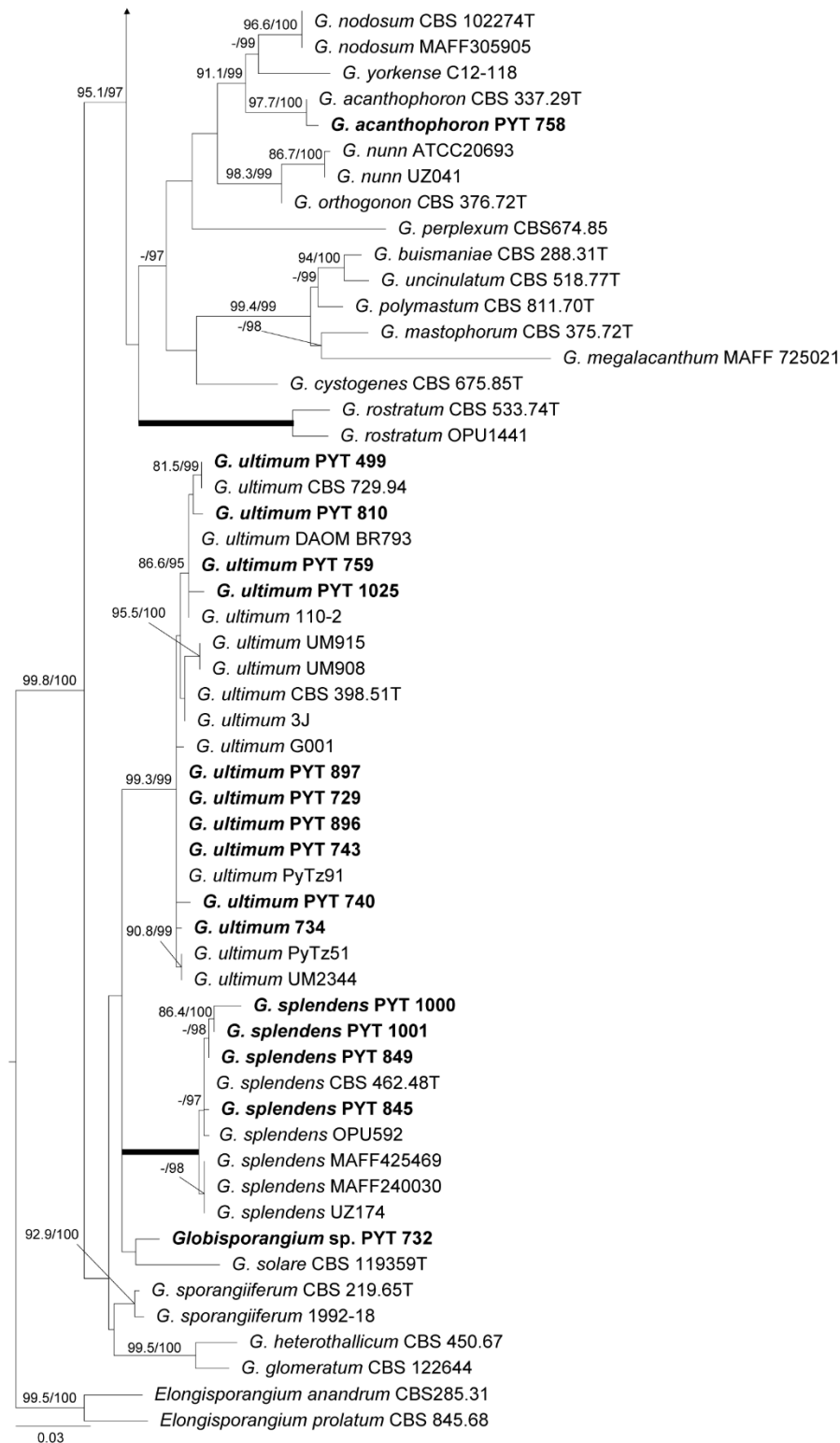
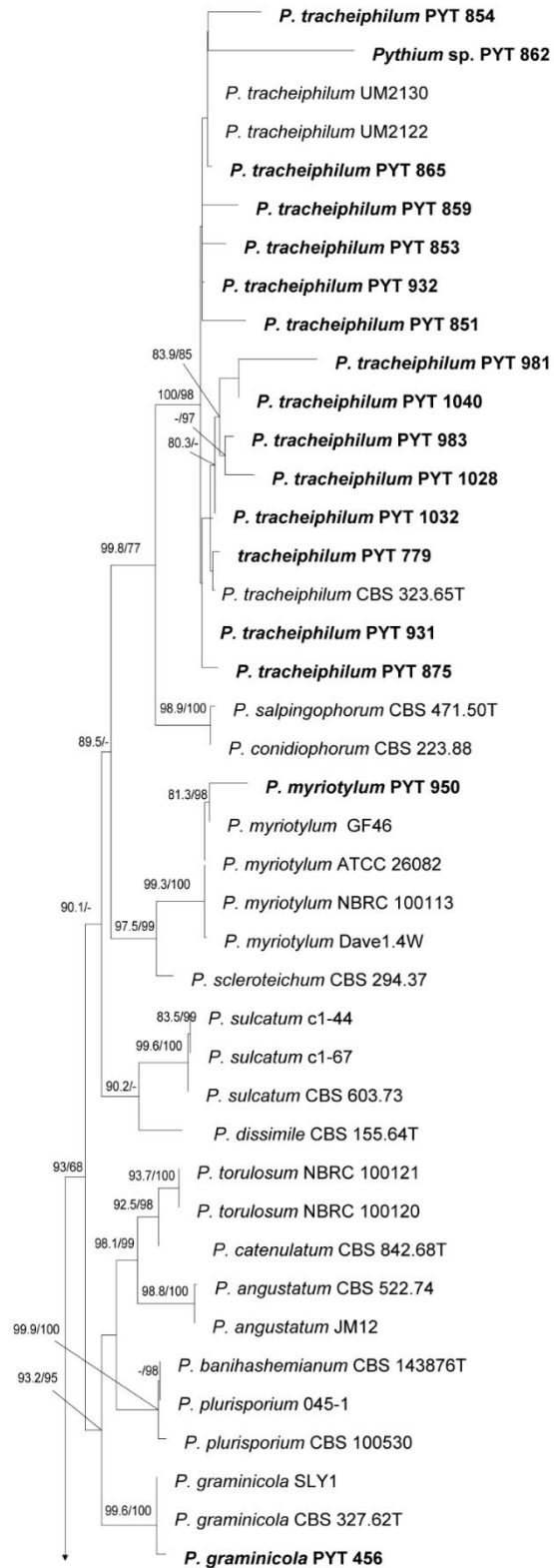


Figura 3. Árvore filogenética baseada na informação da sequência Cox II de isolados de espécies de *Globisporangium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

Para a construção da árvore filogenética das espécies de *Pythium* em alface baseada na região ITS (**Figura 4**), foram escolhidos alguns representantes dentro de cada clado da árvore de *Pythium* em alface baseada na região *Cox II*. Os isolados PYT 854, PYT 862, PYT 865, PYT 859, PYT 853, PYT 932, PYT 851, PYT 981, PYT 1040, PYT 983, PYT 1028, PYT 1032, PYT 779, PYT 931, PYT 875 foram agrupados em um grande clado formado por isolados de referência de *P. tracheiphilum* (SH-aLRT = 100 e bootstrap = 98) da mesma forma que em *Cox II*. O isolado PYT 950 agrupou no clado de *P. myriotylum* (SH-aLRT = 81,3 e bootstrap = 100). O isolado PYT 456 continuou agrupando no clado de *P. graminicola* (SH-aLRT = 99,6 e bootstrap = 100). O isolado PYT 871 foi agrupado no mesmo clado que *P. dissotocum*, *P. diclinum*, *P. coloratum* e *P. lutarium* (SH-aLRT = 99,3 e bootstrap = 100), enquanto PYT 884 foi agrupado com *P. oopapillum*. O isolado PYT 880 ficou no clado de *P. oopapillum* (SH-aLRT = 97,7 e bootstrap = 99). Os isolados PYT 490 e PYT 861 foram agrupados no clado de *P. aphanidermatum*. E o isolado PYT 540 foi agrupado no clado de *P. deliense* (SH-aLRT = 86,5 e bootstrap = 96).



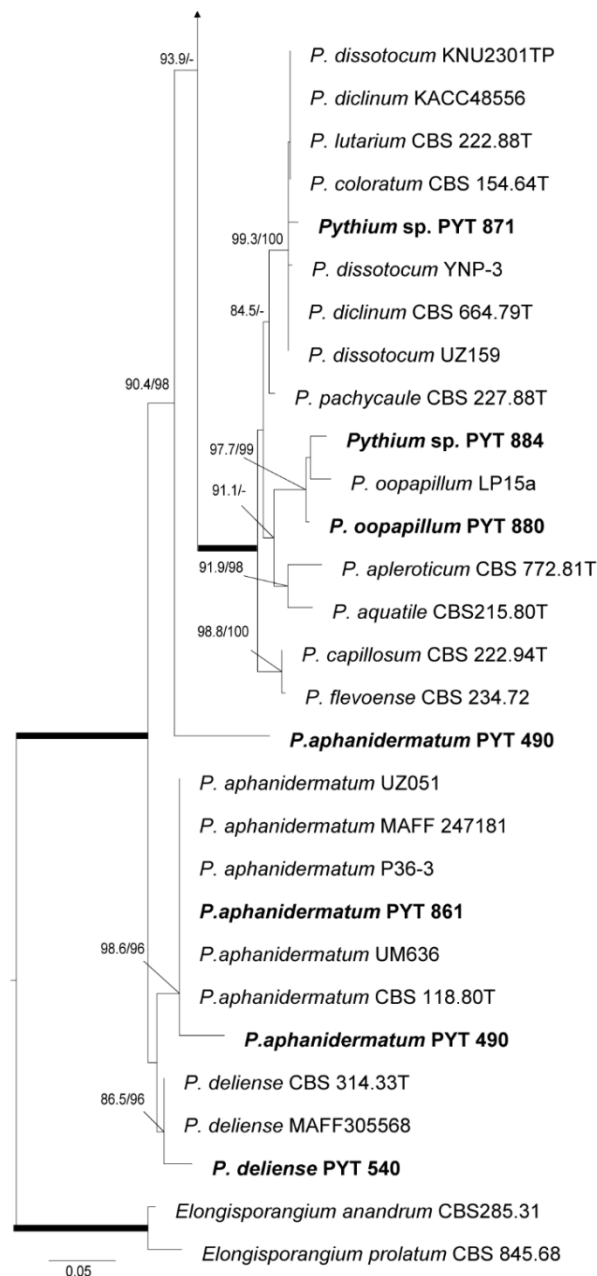
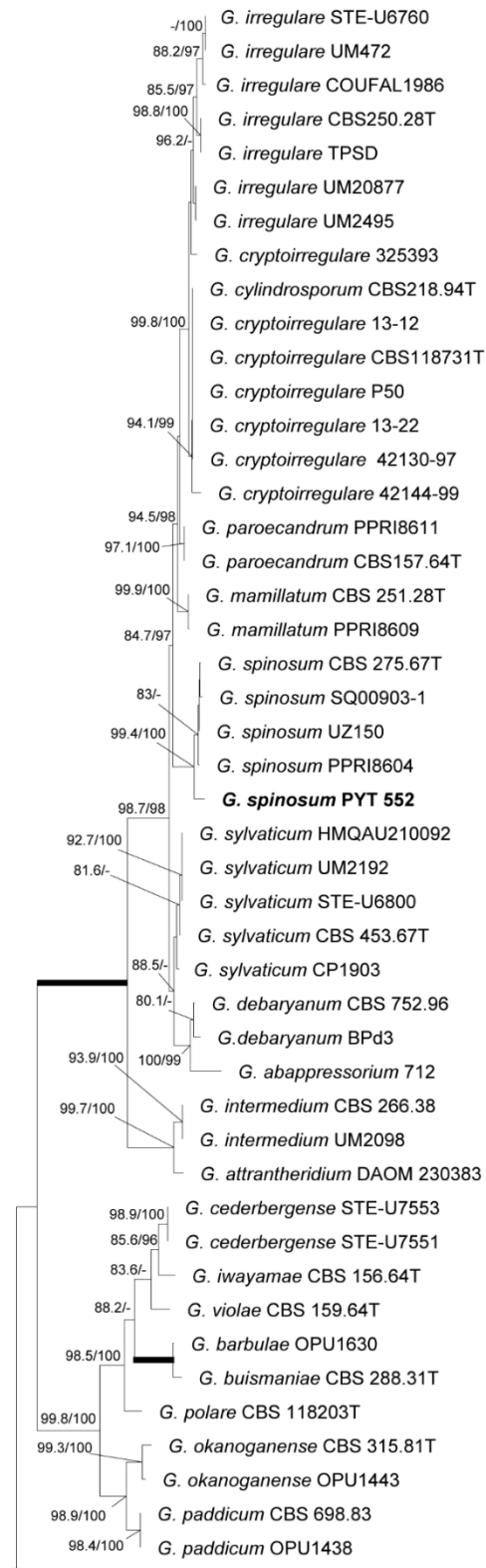


Figura 4. Árvore filogenética baseada na informação de sequência da região ITS de isolados de espécies de *Pythium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

Os isolados de *Globisporangium*, que foram sequenciados para a região ITS, foram o PYT 552 que agrupou no clado de *G. spinosum* com 99,4 de SH e 100 de bootstrap, e o isolado PYT 499 que agrupou no clado de *G. ultimum* com 98,9 de SH e 100 de bootstrap (**Figura 5**).



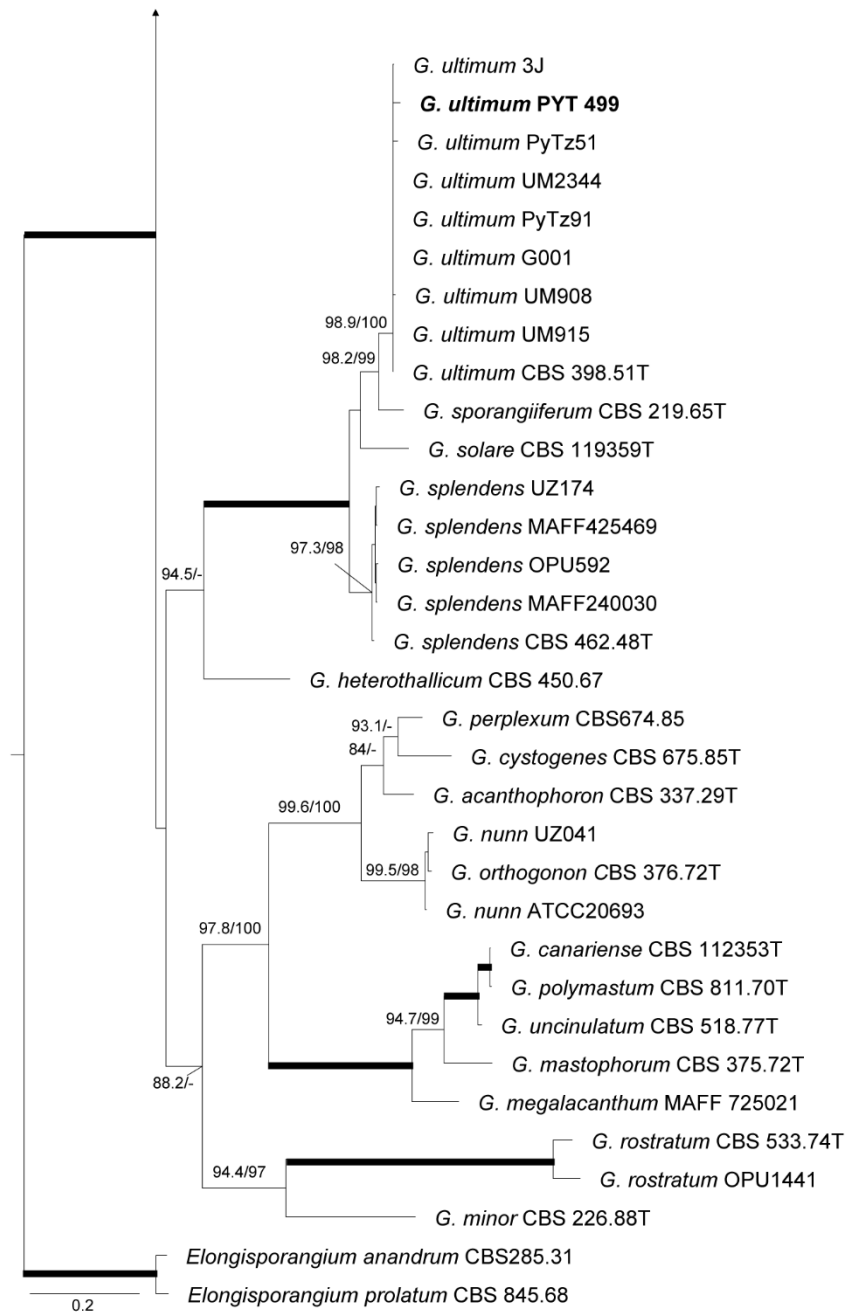
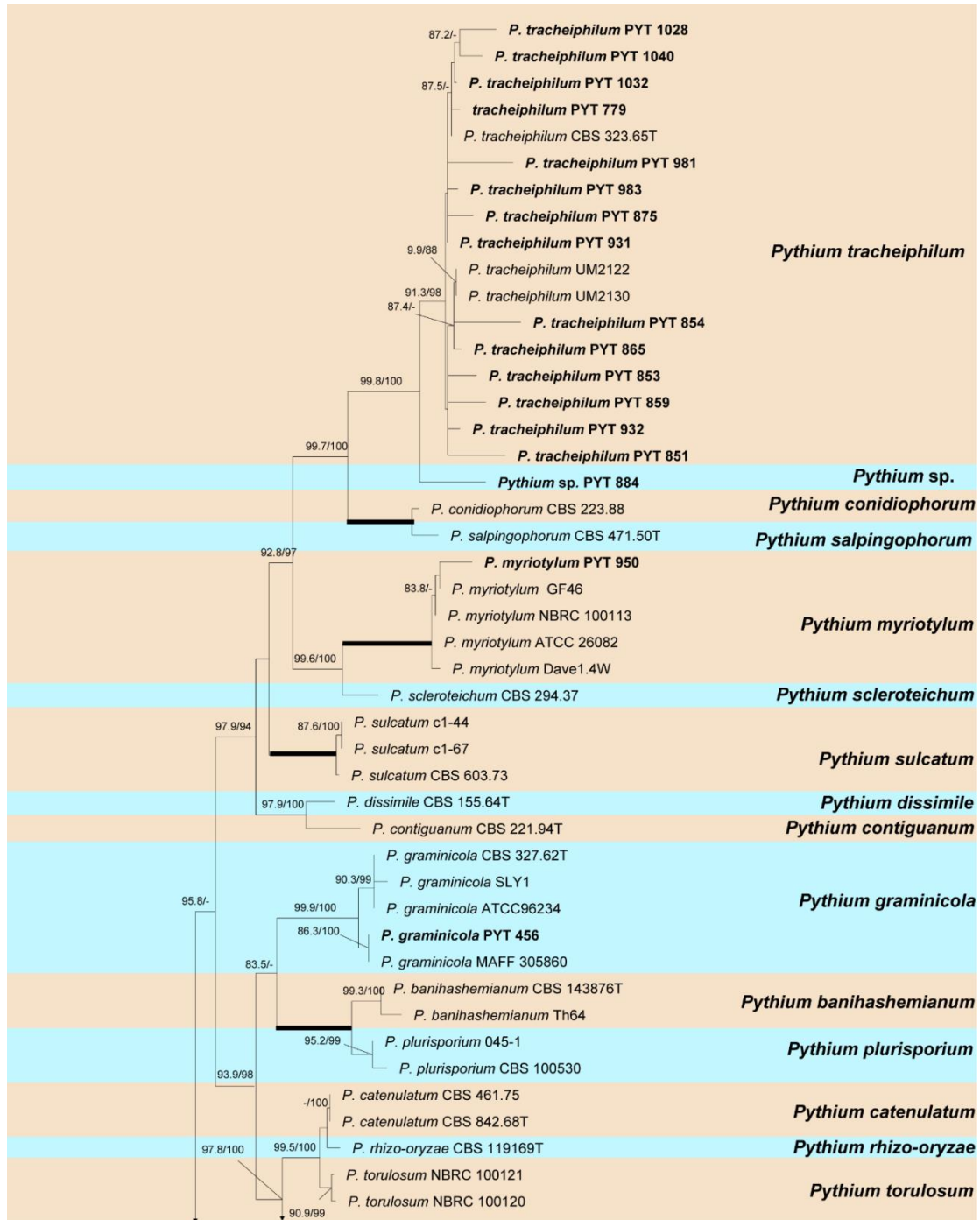


Figura 5. Árvore filogenética baseada na informação de sequência da região ITS de isolados de espécies de *Globisporangium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

A árvore filogenética concatenada das espécies de *Pythium* em alface baseada nas regiões ITS e Cox II (**Figura 6**), confirmou PYT 540 e PYT 590 como *P. deliense*, PYT 490 e PYT 861 como *P. aphanidermatum*, PYT 880 como *P. oopapillum*, PYT 456 como *P.*

graminicola, PYT 950 como *P. myriotylum*, e PYT 851, PYT 932, PYT 859, PYT 853, PYT 865, PYT 854, PYT 931, PYT 875, PYT 983, PYT 981, PYT 779, PYT 1032, PYT 1028 e PYT 1040, como *P. tracheiphilum*.



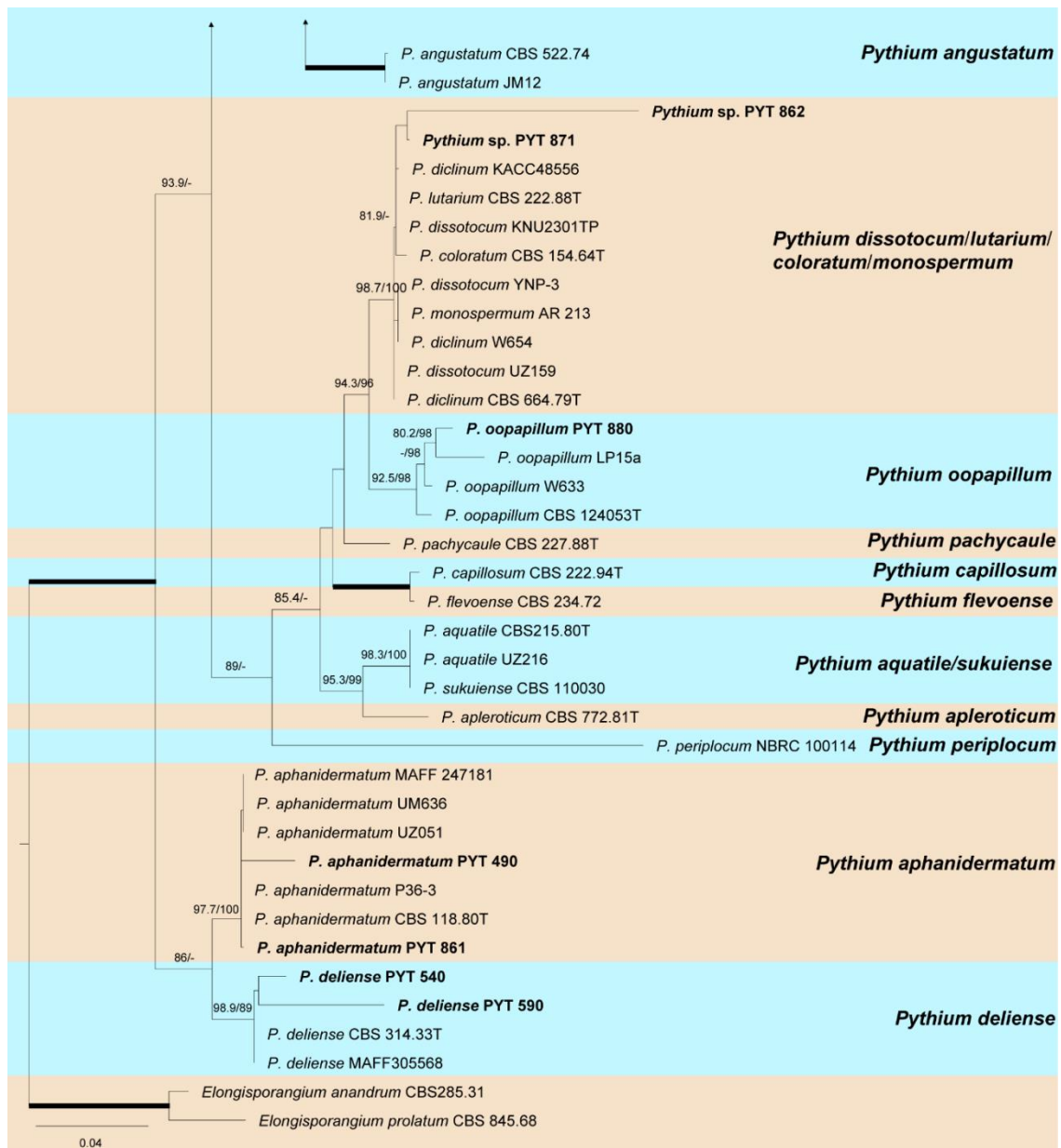
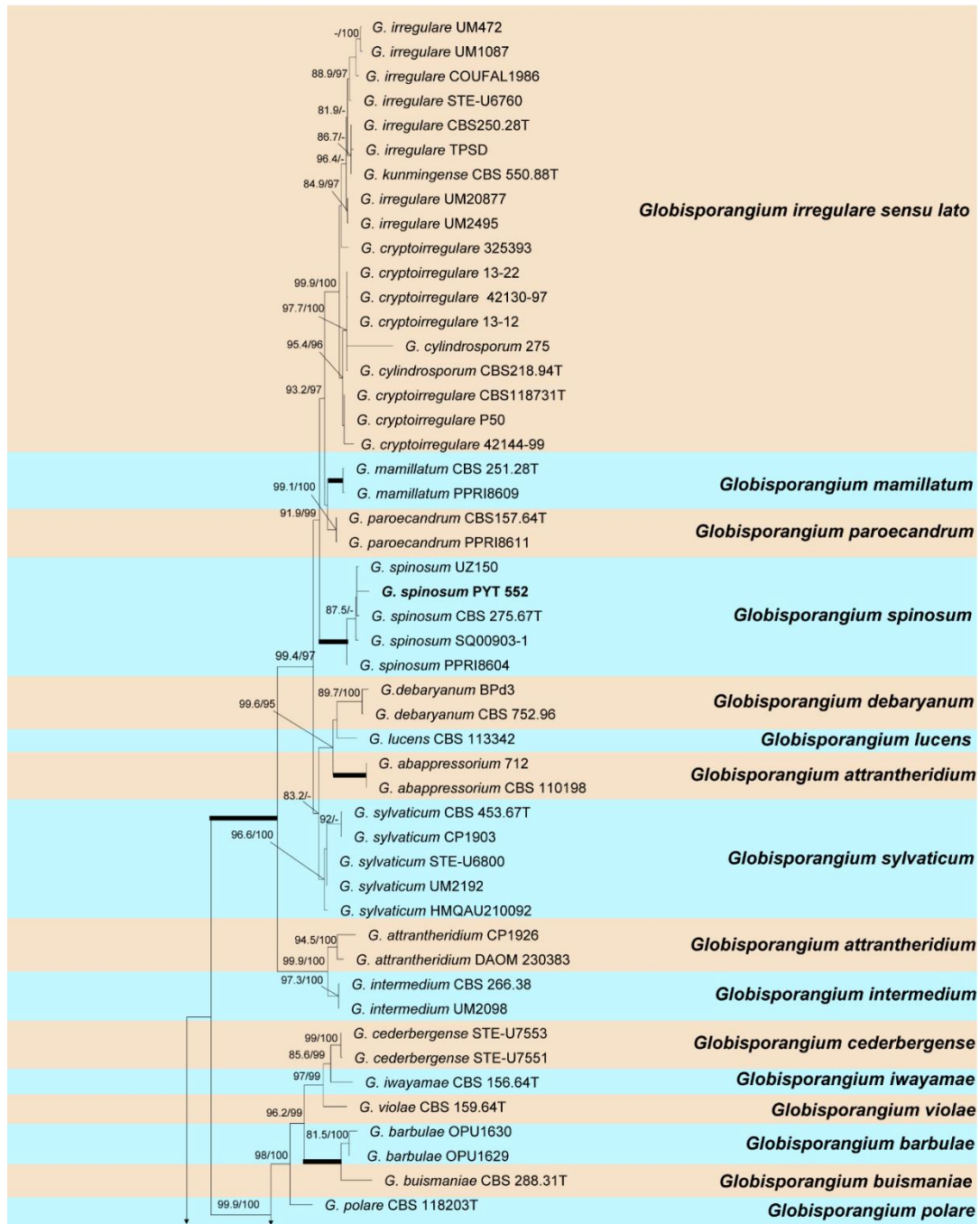


Figura 6. Árvore filogenética baseada na informação de sequências concatenadas de Cox II e da região ITS de isolados de espécies de *Pythium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

A árvore filogenética concatenada das espécies de *Globisporangium* em alface baseada nas informações de sequência de ITS e Cox II (**Figura 7**), confirmou PYT 499 como *G. ultimum* e PYT 552 como *G. spinosum*.



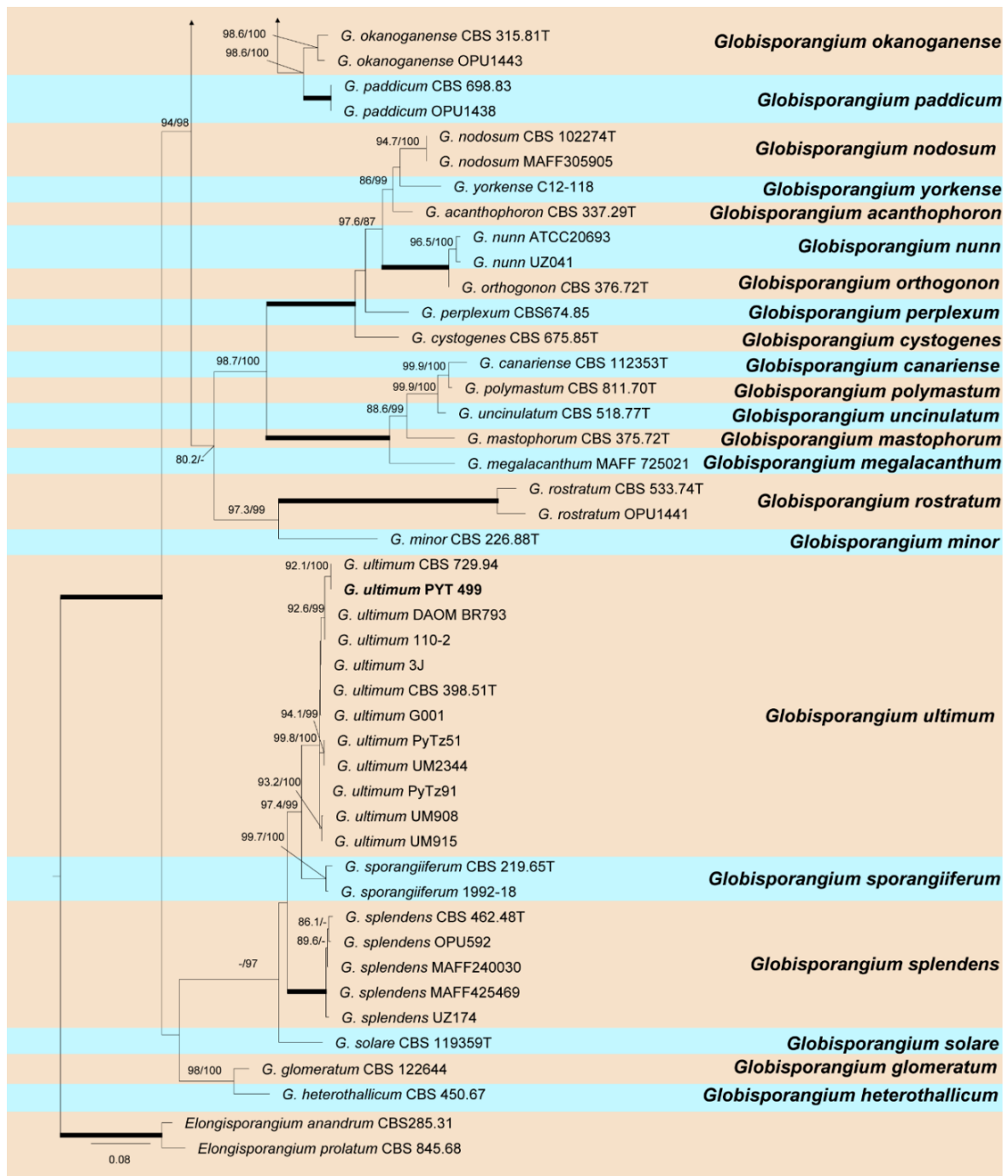


Figura 7. Árvore filogenética concatenada baseada na informação de sequência das regiões Cox II e ITS de isolados de espécies de *Globisporangium* obtidos em associação com cultivo da alface no Brasil. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

Discussão

A presente análise filogenética, empregando informações de sequências Cox II e ITS de uma ampla coleção de isolados, permitiu identificar isolados de espécies de três gêneros de oomicetos do complexo *Pythium* em alface: *Pythium*, *Globisporangium* e *Phytophythium*. As espécies identificadas foram *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. graminicola*, *P. catenulatum*, *P. tracheiphilum*, *Ph. helicoides*, *G. irregulare*, *G. spinosum*, *G. sylvaticum*, *G. acanthophoron*, *G. ultimum* e *G. splendens*. Além disso, não foi possível definir a nível de espécie um subgrupo de isolados *Pythium* e *Globisporangium*.

Cinco isolados foram identificados como *Pythium* sp. porque agruparam em um clado inespecífico com os isolados referência de *P. dissotocum*, *P. lutarium*, *P. coloratum* e *P. monospermum* (SH-aLRT = 90 e bootstrap = 95). Este fenômeno de agrupamento de isolados coletados de hortaliças folhosas em um mesmo clado com referências destas espécies já foi observado anteriormente no Brasil (Gonçalves et al., 201; Barboza, 2020). Provavelmente, trata-se de uma única espécie e estas deveriam ser sinonimizadas com a espécie mais antiga (*P. monospermum*). Três isolados de *Globisporangium* agruparam próximos a isolados referência de *G. solare* (Pyt 732) e *G. irregulare* (Pyt 982 e Pyt 984), mas não puderam ser identificados nessas espécies pelo baixo suporte. Estes isolados não foram incluídos na árvore de ITS por causa da baixa qualidade das sequências. Portanto, estes isolados terão que ser sequenciados para a região COX II e talvez outras regiões genômicas para confirmar sua identidade com alguma espécie conhecida ou se constituem espécies novas.

Destaca-se a frequência de *P. tracheiphilum*, que se mostrou a espécie mais prevalente, principalmente em estados como São Paulo, Rio de Janeiro e Distrito Federal. Além disso, foram feitos registros inéditos de *G. ultimum*, *G. splendens*, *G. acanthophoron* e *P. graminicola* em alface, ampliando o conhecimento sobre a diversidade de patógenos que afetam essa cultura. Portanto, observa-se uma enorme diversidade de espécies de oomicetos atacando a alface no Brasil. Assim também, uma grande quantidade de espécies de oomicetos tem sido relatada infectando alface em diferentes países e ambientes (USDA, 2024).

A espécie mais frequente dentre os isolados foi *P. tracheiphilum*, com 35 registros, sendo predominante em estados como SP, RJ e DF. O primeiro registro dessa espécie no mundo ocorreu em 1965 em alface, causando podridão do caule e necrose vascular em alfaces na Itália (Matta, 1965). Posteriormente, na Holanda, esta espécie foi identificada como altamente patogênica para alface, destacando-se por sua capacidade de causar severos danos à cultura (Blok & Van Der Plaats-Niterink, 1978). A espécie *P. tracheiphilum* foi detectada recentemente

no Brasil, no Distrito Federal, causando podridão de raiz e folhas baixas em alface, sendo assim considerada uma das espécies mais importantes para a cultura da alface no Brasil (Barboza, 2020; Barboza *et al.*, 2024), podendo causar perdas superiores a 50% na produção (Van Der Heyden *et al.*, 2019; Barboza, 2020; Lopes, 2020). As plantas infectadas apresentam menor desenvolvimento, com folhas amarelas e murchas, e com raízes deformadas, descoloridas e sem radículas secundárias (Blancard *et al.*, 2003; Van Der Heyden *et al.*, 2019).

Pythium debaryanum e *Pythium ultimum* já foram relatados afetando a produção de alface no Brasil (Mendes *et al.* 1998). Particularmente em sistemas hidropônicos, *P. aphanidermatum* é uma das principais causas de podridão radicular em alface, com todas as cultivares testadas sendo suscetíveis (Pinto *et al.*, 2011). Um levantamento em sistemas hidropônicos na região metropolitana de São Paulo revelou a presença de *Pythium oopapillum* e diversas espécies de *Phytophythium* causando podridão de raízes em alfaces (Gonçalves *et al.*, 2016). Estudos *in vitro* demonstraram que *P. dissotocum* é mais agressivo para mudas de alface do que *P. middletonii*, particularmente em temperaturas mais altas. A cultivar ‘Mimosa’ mostrou menos suscetibilidade a *P. dissotocum* em comparação com outras cultivares (Baptista *et al.*, 2011).

Outra espécie de destaque no estudo foi *G. ultimum*, com nove isolados identificados, sendo a maioria coletada no Distrito Federal. Este oomiceto é um dos patógenos de plantas mais comuns encontrado globalmente no solo e afeta mais de 300 culturas vegetais (Kamoun *et al.*, 2015, USDA, 2024). As demais espécies ocorreram em menor frequência, mas indicam a diversidade de espécies dos gêneros *Pythium*, *Phytophythium* e *Globisporangium* infectando a cultura da alface. Esse também é o primeiro registro de *G. splendens*, *G. acanthophoron*, *P. graminicola* em alface no Brasil.

Diante disso, *P. tracheiphilum* e *G. ultimum* são particularmente preocupantes, dadas suas frequências e os danos que podem causar em alface mundialmente. Portanto ressalta-se a necessidade urgente de estratégias de manejo e controle eficazes para mitigar seus impactos.

Conclusões

A análise realizada neste trabalho revela uma significativa diversidade de oomicetos associados à cultura da alface, destacando a presença de três gêneros: *Pythium*, *Globisporangium*, *Phytophythium*. A identificação de 14 espécies do complexo *Pythium*,

incluindo *P. tracheiphilum* — a mais frequente, com 35 registros —, destaca a relevância do complexo *Pythium* como um conjunto de patógenos de grande impacto na alface no Brasil, responsáveis por danos severos e perdas expressivas na sua produção.

O registro inédito de *G. ultimum*, *G. splendens*, *G. acanthophoron* e *P. graminicola* enfatiza a diversidade dos patógenos do complexo *Pythium* em alface e a importância de estudos contínuos para compreender melhor a ecologia desses organismos e suas interações com a cultura da alface. Em suma, a pesquisa contribui significativamente para o conhecimento sobre a diversidade de oomicetos infectando alface no Brasil e reforça a importância de desenvolver e implementar estratégias de controle e prevenção para proteger a produção agrícola de perdas associadas a esses patógenos.

Referências bibliográficas

- ALCONERO, R. Lettuce (*Lactuca sativa* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (eds) **Crops II. Biotechnology in Agriculture and Forestry**, vol 6. 1988. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-73520-2_17
- ARORA, H.; SHARMA, A.; SHARMA, S.; HARON, F. F.; GAFUR, A.; SAYYED, R. Z.; DATTA, R. *Pythium* damping-off and root rot of *Capsicum annuum* L.: Impacts, diagnosis, and management. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 823, 2021.
- BAPTISTA, F. R.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L.; TEIXEIRA, L. D.; JÚNIOR, N. A. Avaliação patogênica in vitro de *Pythium middletonii* Sparrow e *Pythium dissotocum* Drechsler em alface. **Summa Phytopathologica**, v. 37, p. 52-58, 2011.
- BARBOZA, E. A. **Diversidade de *Pythium* e *Phytophythium* associados a hortaliças e plantas invasoras no Brasil, sensibilidade de isolados a mefenoxam e gama de hospedeiras**. 2020. 116 f., il. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília-DF, Brasília, 2020.
- BARBOZA, E. A.; LOPES, L. H. R.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; CABRAL, C. S.; VIEIRA, W. A.S.; ROSSATO, M.; RIBEIRO, F. H. S.; REIS, A.. *Pythium tracheiphilum* causing leaf rot and wilting in lettuce in Brasília-DF, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 172, n. 3, e13334, 2024.
- BLANCARD, D; LOT, H; MAISONNEUVE, B. Diseases of lettuces: Identification, detection and control. INRA Editions, Paris, 2003.
- BLOK, I., VAN DER PLAATS-NITERINK, A. J. *Pythium uncinulatum* sp. nov. and *P. tracheiphilum* pathogenic to lettuce. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, 84:135-147, 1978.
- BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; SIMON, P. W. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 124, p. 32-38, 1999.

- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J. trop. Med. Hyg.** 42:225-6, 1939.
- EMBRAPA. **Brasil em 50 alimentos**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2023. 359 p.
- USDA. USDA Fungal Databases. Available online: <https://fungi.ars.usda.gov/>. Acessado em 21 de maio de 2024.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol.** 59(3):307–321, 2010.
- HENDRIX, F. F.; CAMPBELL, W. A. Pythiums as Plant Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 1973.
- HOANG, D.T.; CHERNOMOR, O.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q.; VINH, L.S. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. **Mol. Biol. Evol.** 35:518–22, 2017.
- HUDSPETH, D. S. S.; NADLER, S. A.; HUDSPETH, M. E. S. A. Cox 2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. **Mycologia**, 92(4), p. 674–684, 2000. doi: 10.2307/3761425
- KALYAANAMOORTHY, S., MINH, B. Q., WONG, T. K., VON HAESELER, A. JERMIIN, L. S. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nat. Methods** 14:587–9, 2017.
- KAMOUN, S.; FURZER, O.; JONES, J.D.; JUDELSON, H.S.; ALI, G.S.; DALIO, R.J.; ROY, S.G.; SCHENA, L.; ZAMBOUNIS, A.; PANABIÈRES, F.; et al. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. **Mol. Plant. Pathol.** 16, p. 413–434, 2015.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, 20, 1160–1166, 2019
- KATOH, K; TOH, H. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution** 30:772-780, 2013.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, Volume 33, Issue 7, p. 1870–1874, 2016. doi: 10.1093/molbev/msw054
- LÉVESQUE, C. A.; COCK, A. W. A. M de. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research** 108: 1363–1383, 2004.
- LOPES, L. H. **Etiologia e prevalência da podridão de saia em alface no Distrito Federal**. 2020. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- MASAGO, H.; YOSHIKAWA, M.; FUKADA, M. & NAKANISHI, N. Selective inhibition of *Pythium* spp. from soils and plants. **Phytopathology** 67:425-428, 1977.
- MATTA, A. Una malattia della lattuga prodotta da una nuova specie di *Pythium*. **Phytopatologia Mediterranea**, v. 4, p. 48–53, 1965.
- MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L. da; DIANESE, J. C.; et al. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. 555 p.
- MINH, B.Q; NGUYEN, M.A.T; VON HAESELER, A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. **Mol Biol Evol.** 305:1188–1195, 2013. doi:10.1093/molbev/mst024

MINH, B. Q.; SCHMIDT, H. A.; CHERNOMOR, O.; SCHREMPF, D.; WOODHAMS, M. D.; VON HAESELER, A.; LANFEAR, R. IQ- TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. **Mol Biol Evol.** 37 (5):1530–1534, 2020. doi:10.1093/molbev/msaa015.

MUSSI-DIAS, V. **Fitopatologia no estado do Rio de Janeiro: histórico, índice de doenças de plantas e 15 anos de atividades da Clínica Fitossanitária da UENF.** 2011. 283f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

NGUYEN, L. T.; SCHMIDT, H. A.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Mol. Biol. Evol.** 32:268–74, 2015.

NGUYEN, H. D. T.; DODGE, A.; DADEJ, K.; RINTOUL, T. L.; PONOMAREVA, E.; MARTIN, F. N.; DE COCK, A. W. A. M.; LÉVESQUE, C. A.; REDHEAD, S. A.; SPIES, C. F. J. Whole genome sequencing and phylogenomic analysis show support for the splitting of genus *Pythium*. **Mycologia**, v. 114, n. 3, p. 501–515, 2022.

PINTO, Z. V.; CIPRIANO, M.; GALVÃO, J. A.; BETTIOL, W.; PATRÍCIO, F. R.; SANTOS, A. S. Podridão de raízes causada por *Pythium aphanidermatum*, em cultivares de alface produzidas em sistema hidropônico. **Summa Phytopathologica**, v. 37, p. 180-186, 2011.

RAI, M.; ABD-ELSALAM, K. A.; INGLE, A. P. (Eds.). ***Pythium: Diagnosis, Diseases and Management.*** CRC Press, 2020.

RAMBAUT, A. FigTree v1.4.0: Tree Figure Drawing Tool. 2012. Available: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>>.

SCHROEDER, K.; MARTIN, F.; COCK, A.; LÉVESQUE, C.; SPIES, C.; OKUBARA, P.; PAULITZ, T. Molecular Detection and Quantification of *Pythium* Species: Evolving Taxonomy, New Tools, and Challenges. **Plant disease**, 97 1, 4-20, 2013. doi: 10.1094/PDIS-03-12-0243-FE.

SHATILOV, M. V., RAZIN, A. F., IVANOVA, M. I. **Analysis of the world lettuce market.** In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, Vol. 395, No. 1, p. 012053). IOP Publishing, 2019.

UZUHASHI, S.; KAKISHIMA, M.; TOJO, M. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. **Mycoscience**, v. 51, n. 5, p. 337-365, 2010.

VAN DER HEYDEN, H.; WALLON, C. T; LÉVESQUE, A; CARISSE, O. Detection and quantification of *Pythium tracheiphilum* in soil by multiplex real-time qPCR. **Plant Disease**, v. 103, n. 3, p. 475-483, 2019. doi: 10.1094/PDIS-03-18-0419-RE

CAPÍTULO III

Diversidade de espécies de *Pythium* e *Globisporangium* associados ao coentro no Brasil

Diversidade de espécies de *Pythium* e *Globisporangium* associados ao coentro no Brasil

Éllen Junia Canedo¹, Leonardo Silva Boiteux^{1,2}, Maria Esther de Noronha Fonseca², Josiene Silva Veloso¹, Fabiana Helena Silva Ribeiro Martins², Ailton Reis^{1,2}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fitopatologia, 52.171-900, Recife-PE, Brasil;

²Embrapa Hortaliças, 70.275-970, Brasília-DF, Brasil.

Resumo

O coentro (*Coriandrum sativum*) é uma planta herbácea da família Apiaceae, originária da região Mediterrânea e amplamente cultivada em todos os continentes. No Brasil, é predominantemente cultivado em pequenas propriedades, por agricultores familiares. O coentro é suscetível a várias doenças que podem comprometer seu desenvolvimento. Entre elas, os patógenos de solo do complexo *Pythium* são altamente limitantes, causando sérios prejuízos ao cultivo. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular de isolados do complexo *Pythium* coletados em plantas de coentro em diversas regiões produtoras do Brasil, visando catalogar a diversidade de espécies associadas com essa cultura. Isolados do complexo *Pythium* foram obtidos de plantas com sintomas de tombamento ou podridão de raiz. Os isolamentos foram realizados a partir de fragmentos de raízes e caules, desinfestados e cultivados em meio de cultura. O DNA total dos fungos foi extraído a partir de micélio cultivado em meio de cultura V8. As relações filogenéticas dos isolados foram determinadas a partir do sequenciamento de amplicons correspondendo às regiões ITS (internal transcribed spacer) e Cox II (subunidade 2 da citocromo c oxidase). As sequências consenso foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do NCBI, incluindo sequências dos isolados de referência. Foram caracterizados 19 isolados do complexo *Pythium* infectando coentro, incluindo uma linhagem ainda não identificada de *Pythium* (dez isolados), *P. oopapillum* (dois isolados), *P. aphanidermatum* (dois isolados), *P. sulcatum* (um isolado) e *Globisporangium ultimum* (quatro isolados). A ampla distribuição geográfica desses patógenos, em diferentes estados brasileiros e em diferentes condições de cultivo, destaca a necessidade de planejamento de estratégias que sejam eficazes para o manejo deste complexo de patógenos.

Palavras-chave: Apiaceae, *Coriandrum sativum*, patógenos de solo, Podridão de raiz, Tombamento.

Abstract

Coriander (*Coriandrum sativum*) is an herbaceous species of the Apiaceae family, native to the Mediterranean region and widely cultivated on all continents. In Brazil, it is predominantly cultivated on family-based small farms. Coriander is susceptible to several diseases that can compromise its development. Among them, soil pathogens of the *Pythium* complex are highly limiting, causing serious losses to the crop. The objective of the present study was to perform the molecular characterization of isolates of the *Pythium* complex collected from coriander plants in several producing regions of Brazil, aiming to catalog the diversity of species associated with this crop. Isolates of the *Pythium* complex were obtained from plants with symptoms of damping off or root rot. Isolations were performed from fragments of roots and stems, disinfected, and incubated in culture medium. Total DNA was extracted from mycelium grown in V8 medium. The phylogenetic relationships of the isolates were determined by sequencing the amplicons corresponding to the ITS (internal transcribed spacer) and Cox II (cytochrome c oxidase subunit 2). The consensus sequences were compared with those available in the NCBI database, including sequences of the reference isolates. Nineteen isolates of the *Pythium* complex infecting coriander were characterized, including an unidentified *Pythium* lineage (ten isolates), *P. oopapillum* (two isolates), *P. aphanidermatum* (two isolates), *P. sulcatum* (one isolate) and *Globisporangium ultimum* (four isolates). The wide geographic distribution of these oomycetes, in different Brazilian states and under different cultivation conditions, highlights the need to plan effective strategies for the management of this soil-borne disease complex.

Keywords: Apiaceae, *Coriandrum sativum*, damping-off, Root rot, Soil-borne pathogens.

Introdução

O coentro (*Coriandrum sativum* L.) é uma hortaliça pertencente à família Apiaceae, originária da região Mediterrânea mais especificamente no oriente próximo, com algumas subespécies distribuídas e domesticadas no sul da Europa, Egito, Índia e Paquistão (Diederichsen & Hammer, 2003). Trata-se de uma planta aromática de hábito herbáceo, amplamente utilizada na culinária e na indústria farmacêutica (Gantait *et al.*, 2022), sendo cultivado desde a antiguidade para extração de óleos essenciais, que possuem propriedades antissépticas, bactericidas, fungicidas e relaxante muscular (Singh *et al.*, 2007; Laribi *et al.*, 2015). Devido às suas características de sabor e seus inúmeros benefícios à saúde, o coentro é uma especiaria muito consumida em todo o mundo (Prachayasittikul *et al.*, 2018).

No Brasil, o cultivo de coentro ocorre majoritariamente em pequenas propriedades rurais (Reis & Lopes, 2016). Dados de 2017 indicaram que o coentro foi produzido em 65.491 estabelecimentos agropecuários, resultando em uma produção de 120.583 toneladas (IBGE, 2017).

A produtividade do coentro pode ser significativamente afetada pela incidência de doenças (Reis & Lopes, 2016). Dentre os fitopatógenos relatados em coentro estão: *Alternaria dauci*, *Rhizoctonia solani* (Ferreira, 2013), *Scletotinia* spp., *Fusarium* spp., *Cercospora* spp. (Noronha & Assunção, 2015), *Cladosporium tenuissimum* (Zhou *et al.*, 2022), *Protomyces macrosporum* (Leharwan; Gupta, 2019), oídio (*Oidiopsis haplophylli*) (Reis *et al.*, 2004), bem como nematoides do gênero *Meloidogyne* (*M. incognita* e *M. javanica*) e *Rotylenchulus reniformis* (Lima *et al.*, 1999).

O complexo *Pythium* inclui várias espécies fitopatogênicas que causam danos significativos em diversas culturas. As principais doenças associadas a espécies de *Pythium* incluem tombamento de mudas, podridão de raízes, podridão do colo, e podridão do caule (Arora *et al.*, 2021). Espécies de *Pythium* também têm sido detectadas causando danos ao cultivo do coentro em diferentes regiões produtoras do Brasil (Ferreira, 2013; Noronha & Assunção, 2015; Silva *et al.*, 2024). No entanto, ainda são escassos os estudos aprofundados sobre a diversidade de espécies do complexo *Pythium* na cultura do coentro. Até o momento, no Brasil, há registros formais das espécies *P. acanthophoron*, *P. ultimum* var. *ultimum* e *P. aphanidermatum* causando tombamento e podridão do colo em coentro (Barboza, 2020; Silva *et al.*, 2024).

Os modernos estudos da diversidade e de relações filogenéticas entre espécies de *Pythium* combinam análises morfológicas com dados moleculares obtidos por meio de marcadores moleculares específicos (Levesque & Cock, 2004; Nguyen *et al.*, 2022). A catalogação da diversidade deste grupo de patógeno no coentro é essencial para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos precisos. A elucidação dos padrões de virulência e gama de plantas hospedeiras desses patógenos são informações necessárias para planejamento de estratégias eficientes de manejo, incluindo o desenvolvimento de cultivares resistentes.

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização molecular de isolados do complexo *Pythium* coletados em plantas de coentro, catalogar a diversidade de espécies isoladas e determinar as relações filogenéticas dos isolados a partir das sequências das regiões ITS (espaçador interno transcrito) e Cox II (codificador da subunidade 2 da citocromo c oxidase).

Material e métodos

Local dos ensaios

Os experimentos foram realizados nas casas de vegetação e nos Laboratórios de

Fitopatologia, Melhoramento Genético Vegetal e Análise Genômica da Embrapa Hortaliças, situada na zona rural de Ponte Alta, em Brasília–DF (coordenadas 15°56'00" de latitude sul, 48°08'00" de longitude oeste) e altitude de 997,6 m.

Obtenção e preservação dos isolados do complexo *Pythium*

Os isolados foram obtidos a partir de amostras de plantas de coentro com sintomas de tombamento, podridão de raiz ou colo, coletadas em campos de produção e em cultivos hidropônicos, em diferentes regiões produtoras do Brasil ou recebidas no laboratório de fitopatologia da Embrapa Hortaliças. Os isolamentos foram realizados utilizando fragmentos sintomáticos de raiz e caule. Os tecidos próximos à margem da lesão foram desinfestados em álcool a 70% por um minuto e depois em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por dois minutos. Em seguida, foram lavados duas vezes em água destilada e esterilizada, e secos em papel de filtro esterilizado. Após o processo de desinfestação superficial, os fragmentos de aproximadamente 5 mm foram transferidos para placas de Petri contendo meio V8 clarificado (100 mL de suco V8, 9 g de ágar, 1,5 g de CaCO_3 , 400 mL de água destilada) (Campbell®), suplementado com antibióticos e fungicidas nas seguintes concentrações: Benomyl (40 mg.L⁻¹) (E. I. duPont De Nemours, Inc. Wilmington, DE), Ampicilina (100 mg.L⁻¹) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), Rifampicina (10 mg.L⁻¹) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Pentacloronitrobenzeno - PCNB (30 mg.L⁻¹) (Uniroyal Chemical Co. Naugatuck, CT) e Nistatina (50 mg.L⁻¹) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), conforme descrito por Masago *et al.* (1977). As placas foram incubadas em BOD a 25 °C. Após um a três dias, pontas de hifas foram transferidas para o meio V8 clarificado e incubadas em câmara de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 12 horas (Mussi-Dias *et al.*, 2011). Os isolados obtidos foram preservados pelo método de Castellani (Castellani, 1939).

Amplificação de duas regiões genômicas dos isolados do complexo *Pythium*

A identificação dos isolados foi realizada através de filogenia de sequências das regiões ITS e Cox II. Para isso, o DNA total dos isolados foi extraído utilizando o método CTAB 2X modificado (pH = 8,0) e o protocolo de clorofórmio/álcool isoamílico (Boiteux *et al.*, 1999). O DNA purificado foi armazenado em microtubos com tampão Tris-EDTA (10 mM Tris e 0,5 mM EDTA) a -20 °C. A concentração de DNA foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop (NanoDrop Lite, Thermo Scientific®, EUA), e a integridade do DNA foi verificada

por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para os ensaios de PCR, foram utilizados os primers derivados do gene *Cox II*, PF34 (5'-GGC AAA TGG GTT TTC AAG ATC C-3') e PF35 (5'-CCA TGA TTA ATA CCA CAA ATT TCA CTA-3'), além dos primers ITS4 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') e ITS5 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') desenhados para anelar em sequências conservadas da região ITS (Hudspeth *et al.*, 2000). Os amplicons foram purificados do gel de agarose empregando o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram enviados à ACTGene-Análises moleculares LTDA (Alvorada-RS) para sequenciamento.

Caracterização molecular e análise filogenética dos isolados

A edição e a obtenção das sequências consensos foi feita por meio do programa Dragon v.1.6.0 (<http://www.dna-dragon.com/>). Posteriormente, as sequências consenso foram comparadas com os dados do NCBI via ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn). Sequências representando ex-tipos e sequências publicadas relacionadas foram recuperadas do GenBank (**Tabela Suplementar 1**). As sequências foram alinhadas usando método de refinamento iterativo G-INS-i no programa online MAFFT v.7 (Katoh & Toh, 2013, Katoh *et al.*, 2019), com parâmetros padrão para abertura e extensão de lacunas e matriz de pontuação de nucleotídeos 200PAM / $\kappa=2$ e ajustada manualmente quando necessário no MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). As relações filogenéticas de cada região e da matriz concatenada foram inferidas utilizando a Máxima Verossimilhança (ML), usando IQ-TREE v2.1.3 (Nguyen *et al.*, 2015). Os modelos de substituição mais adequados foram selecionados pelo ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017; Minh *et al.*, 2020). Os suportes dos ramos foram estimados usando o teste de razão de verossimilhança aproximada com interpretação Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT; Guindon *et al.*, 2010) e o suporte bootstrap ultrarrápido (UFboot) (Minh *et al.*, 2013; Hoang *et al.*, 2017) com 1000 de bootstrap. Os clados foram considerados bem suportados quando o suporte bootstrap ML foi ≥ 95 (UFboot) e ≥ 80 (SH-aLRT). As árvores filogenéticas foram visualizadas no FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2012) e editadas no software Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems, EUA). A filogenia, baseada na informação das sequências *Cox II* e ITS, foi realizada tanto para as espécies identificadas como pertencentes ao gênero *Pythium* quanto para as espécies inicialmente identificadas como *Globisporangium*, cada uma comparada com isolados referência depositados no NCBI. Por fim, foi realizada a

filogenia para as espécies identificadas como *Pythium* e *Globisporangium* a partir da concatenação das sequências amplificadas de *Cox II* e ITS.

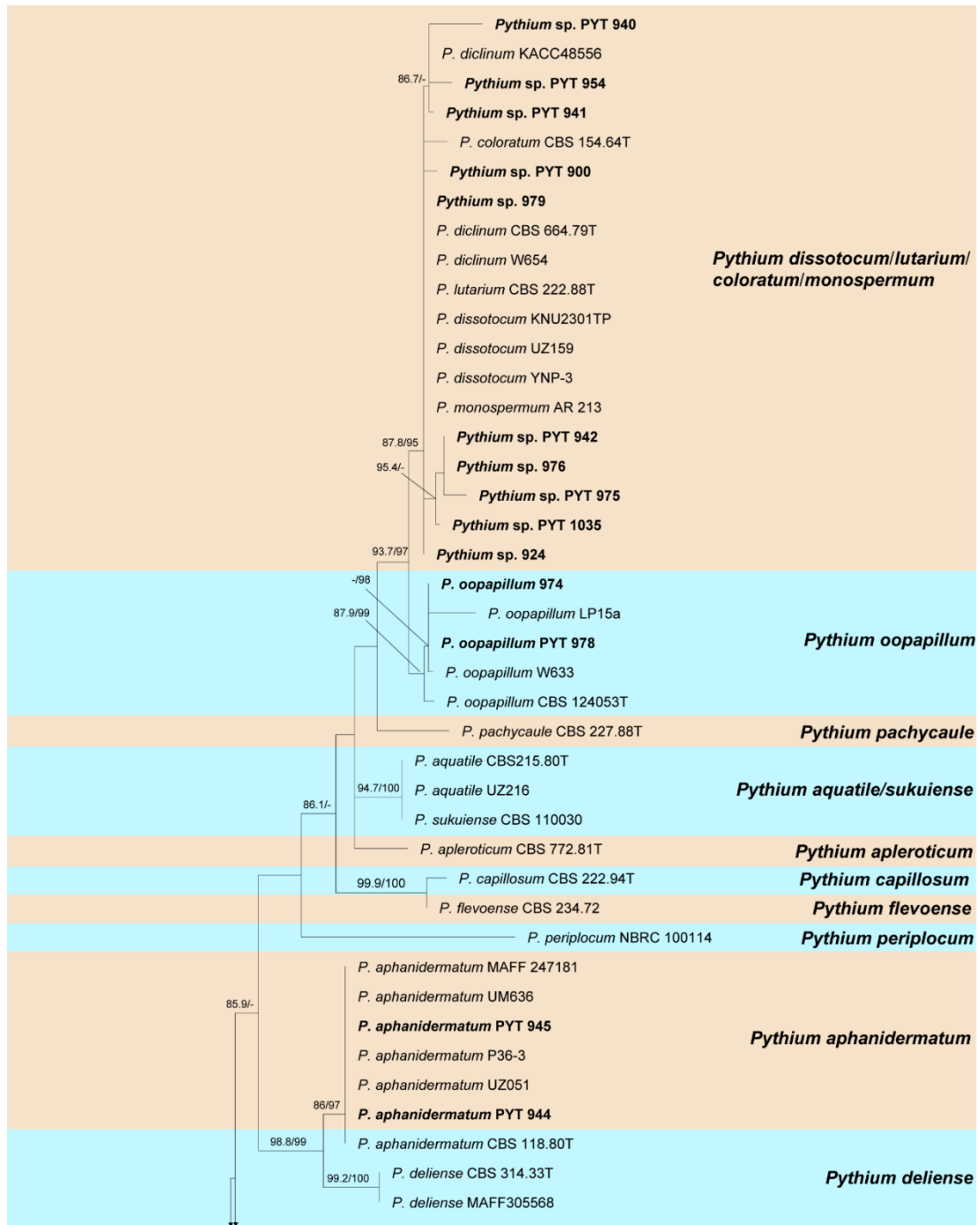
Resultados

Foram obtidos dezenove isolados de oomicetos do complexo *Pythium* em coentro, em diferentes regiões geográficas do Brasil (**Tabela 1**). Com base na comparação das sequências amplificadas para a região *Cox II* com os dados depositados no NCBI, dez isolados não foram identificados ao nível de espécie e foram designados como *Pythium* sp. (PYT 900, PYT 924, PYT 940, PYT 941, PYT 942, PYT 954, PYT 975, PYT 976, PYT 979 e PYT 1035), dois isolados foram identificados como *P. aphanidermatum* (PYT 944 e PYT 945), dois isolados como *P. oopapillum* (PYT 974 e PYT 978), um isolado como *P. sulcatum* (PYT 953) e quatro isolados como *Globisporangium ultimum* (PYT 901, PYT 902, PYT 955 e PYT 989) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Isolados do complexo *Pythium*, obtidos de coentro em diferentes sistemas de cultivo, em quatro estados do Brasil, entre 2021 e 2023 e identificados com base na região gênica *Cox II*.

Isolado	Local	Ambiente	Espécie	Mês/Ano
PYT 900	Sumidouro–RJ	Campo	<i>Pythium</i> sp.	Dezembro/2021
PYT 901	Teresópolis–RJ	Campo	<i>Globisporangium ultimum</i>	Dezembro/2021
PYT 902	Teresópolis–RJ	Campo	<i>Globisporangium ultimum</i>	Dezembro/2021
PYT 924	Teresópolis–RJ	Hidroponia	<i>Pythium</i> sp.	Março/2022
PYT 940	Ibiuna–SP	Campo	<i>Pythium</i> sp.	Abril/2022
PYT 941	Ibiuna–SP	Campo	<i>Pythium</i> sp.	Abril/2022
PYT 942	Ibiuna–SP	Campo	<i>Pythium</i> sp.	Abril/2022
PYT 944	Antônio Carlos–SC	Campo	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Abril/2022
PYT 945	Antônio Carlos–SC	Campo	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Abril/2022
PYT 953	Ibiuna–SP	Campo	<i>Pythium sulcatum</i>	Abril/2022
PYT 954	Ibiuna–SP	Campo	<i>Pythium</i> sp.	Abril/2022
PYT 955	Ibiuna–SP	Campo	<i>Globisporangium ultimum</i>	Abril/2022
PYT 974	Conchal–SP	Campo	<i>Pythium oopapillum</i>	Junho/2022
PYT 975	Conchal–SP	Campo	<i>Pythium</i> sp.	Junho/2022
PYT 976	Conchal–SP	Campo	<i>Pythium</i> sp.	Junho/2022
PYT 978	Conchal–SP	Campo	<i>Pythium oopapillum</i>	Junho/2022
PYT 979	Conchal–SP	Campo	<i>Pythium</i> sp.	Junho/2022
PYT 989	Sarzedo–MG	Campo	<i>Globisporangium ultimum</i>	Setembro/2022
PYT 1035	Piedade–SP	Hidroponia	<i>Pythium</i> sp.	Março/2023

A árvore filogenética das espécies de *Pythium* em coentro baseada na região Cox II (**Figura 1**) agrupou dez isolados (PYT 900, PYT 924, PYT 940, PYT 941, PYT 942, PYT 954, PYT 976, PYY 975, PYT 979 e PYT 1035) próximo às espécies *P. dissotocum*, *P. lutarium*, *P. coloratum* e *P. monospermum*) com o valor de SH-aLRT de 87,8 e *bootstrap* de 95. Por isso, estes isolados não puderam ser identificados ao nível de espécie, sendo denominados como *Pythium* sp. Talvez seja necessário sinonimizar estas espécies em *P. monospermum*, que é a mais antiga. Dois isolados (PYT 974 e PYT 978) foram agrupados (SH-aLRT = 87,9 e *bootstrap* = 99), junto com isolados representativos da espécie *P. oopapillum*. Dois isolados (PYT 944 e PYT 945) foram identificados como *P. aphanidermatum*, agrupando em um clado com isolados representativos desta espécie (SH-aLRT de 86 e *bootstrap* de 97). O isolado PYT 953 agrupou em um clado junto com os isolados de referência da espécie *P. sulcatum* (valor de *bootstrap* = 98).



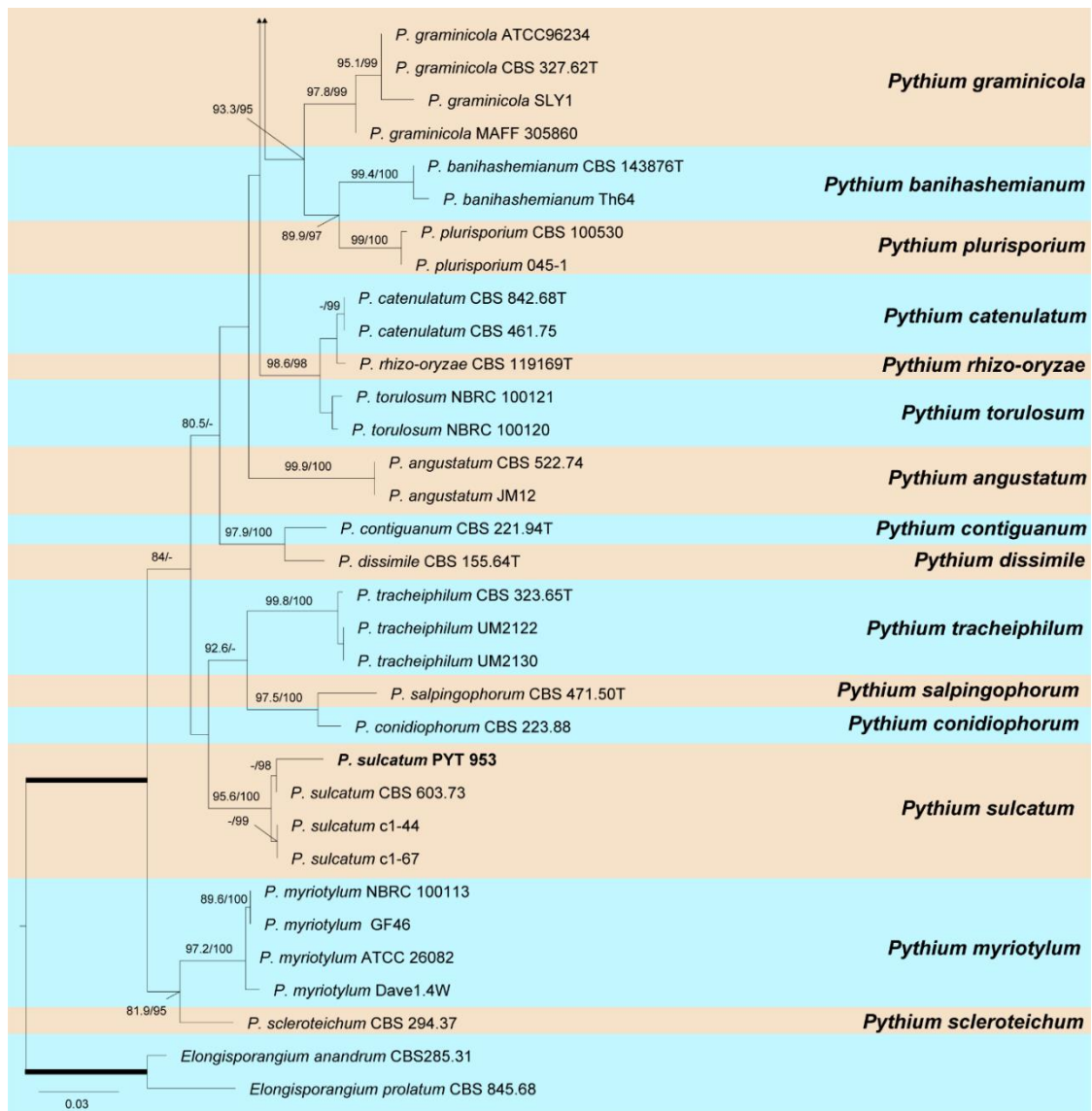
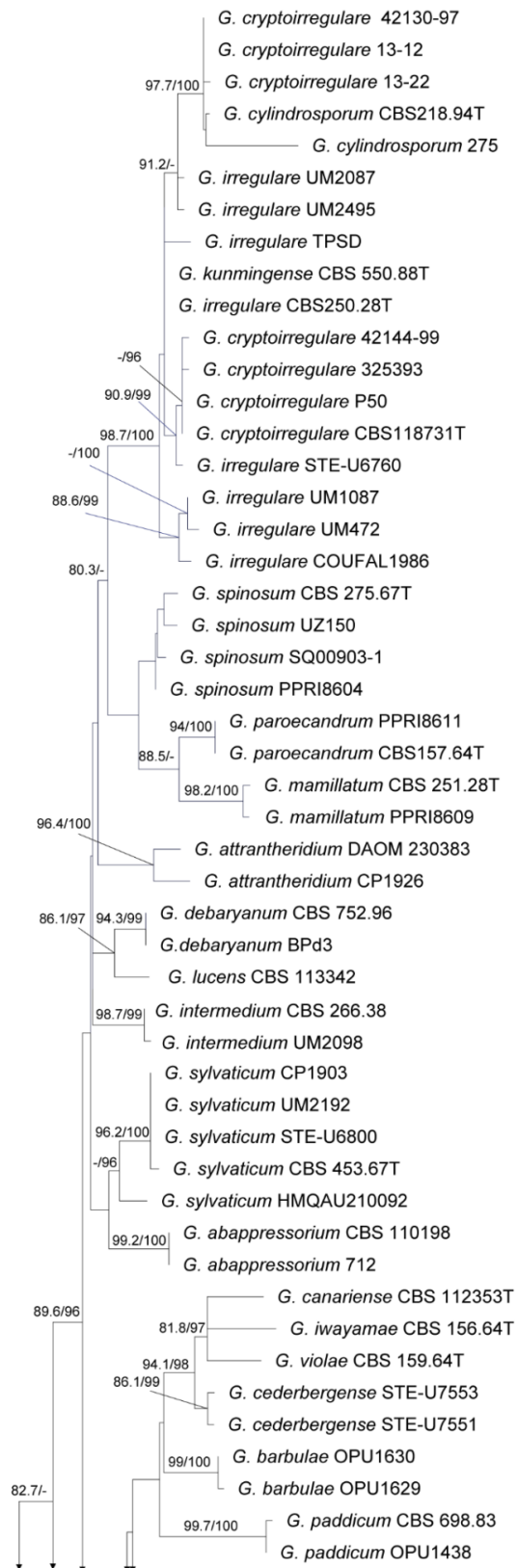


Figura 1. Árvore filogenética das espécies de *Pythium* em coentro baseada em Cox II. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

A árvore filogenética das espécies de *Globisporangium* em coentro baseada exclusivamente em Cox II (**Figura 2**) agrupou os quatro isolados (PYT 901, PYT 902, PYT 955 e PYT 989) em um clado com isolados representativos da espécie *G. ultimum* (SH-aLRT = 95.8 e *bootstrap* = 98).



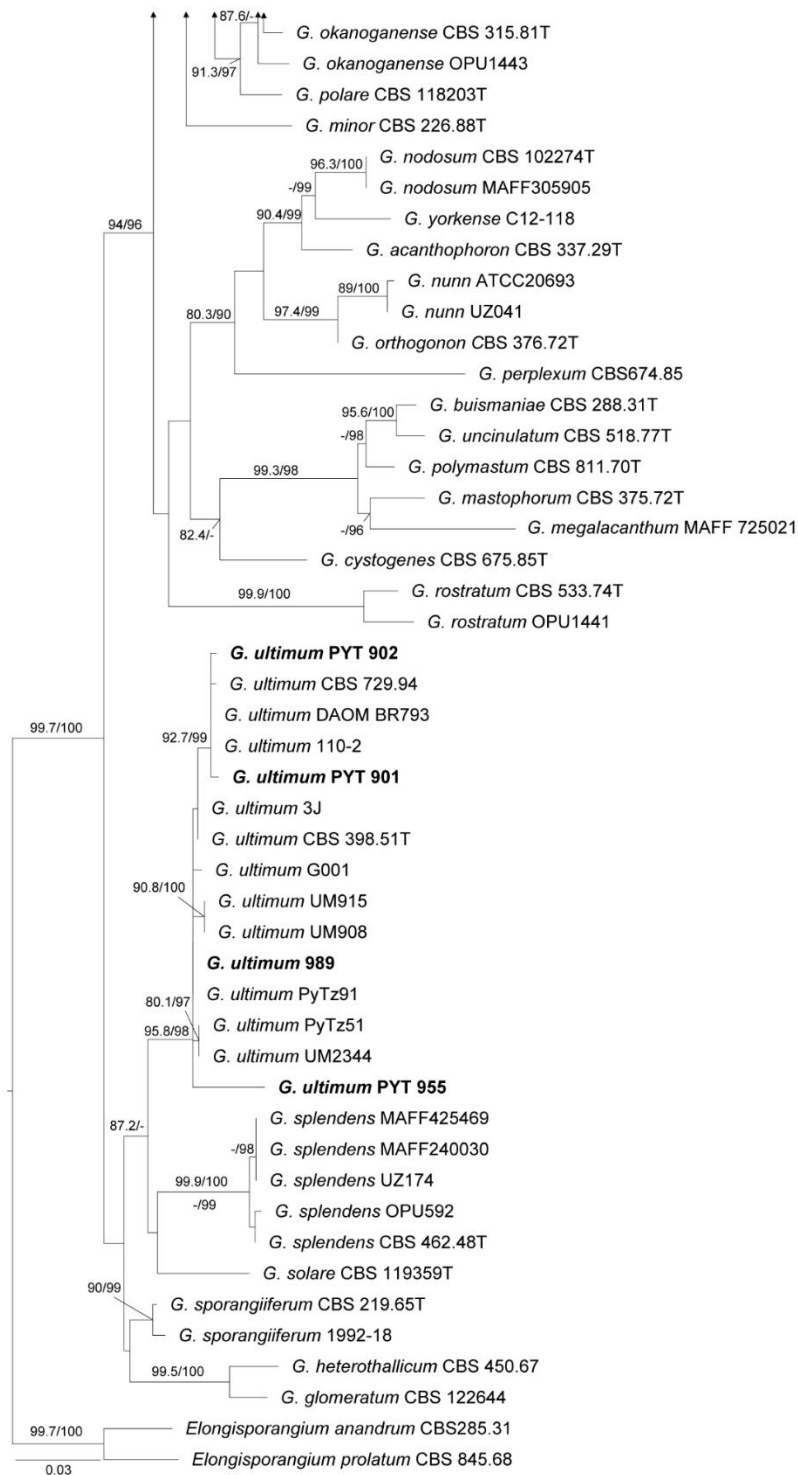
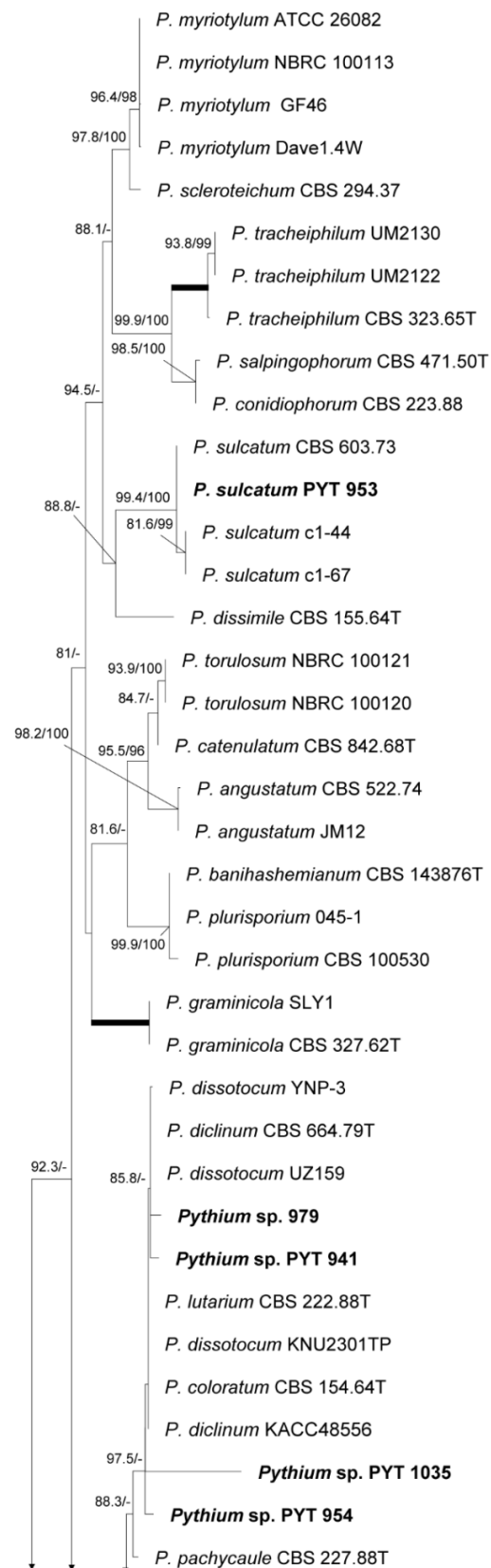


Figura 2. Árvore de máxima verossimilhança das espécies de *Globisporangium* associadas com o coentro baseada no gene mitocondrial *Cox II*. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

Para a construção da árvore filogenética das espécies de *Pythium* em coentro baseada na região ITS (**Figura 3**), foi selecionado um subgrupo de isolados de diferentes clados caracterizados previamente na árvore filogenética baseada na informação da sequência Cox II. O isolado PYT 953 (SH-aLRT = 99,4 e bootstrap = 100) foi agrupado no mesmo clado da espécie *P. sulcatum*. Enquanto o isolado PYT 945 foi agrupado junto aos isolados de *P. aphanidermatum* (SH-aLRT = 96,1 e bootstrap = 95). Por sua vez, os isolados PYT 941, PYT 954, PYT 979 e PYT 1035 foram agrupados próximos às espécies *P. diclinum*, *P. dissotocum*, *P. lutarium* e *P. coloratum* (SH-aLRT = 97,5) e foram identificados como *Pythium* sp. Por fim, o isolado PYT 978 foi agrupado junto aos isolados da espécie *P. oopapillum* (SH-aLRT = 99,8 e bootstrap = 99).



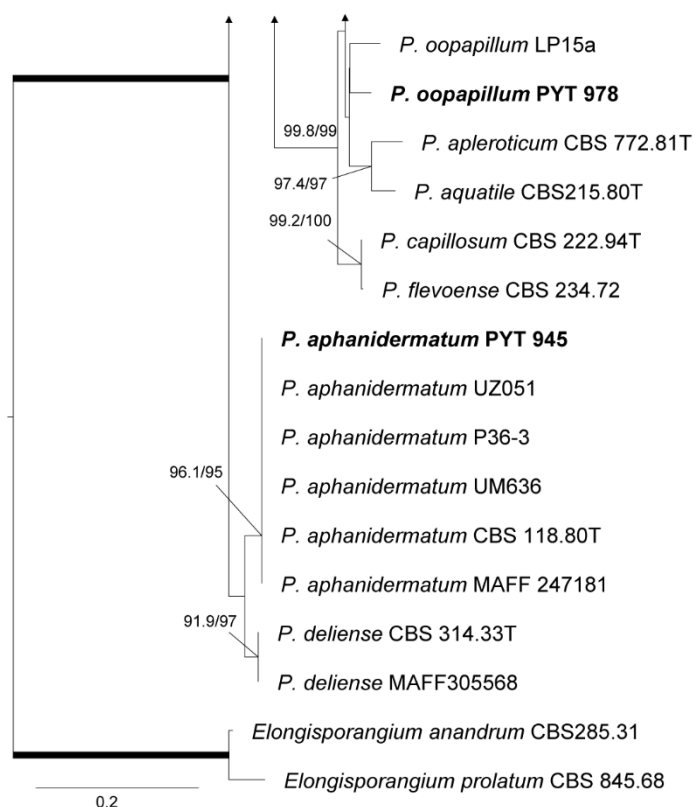
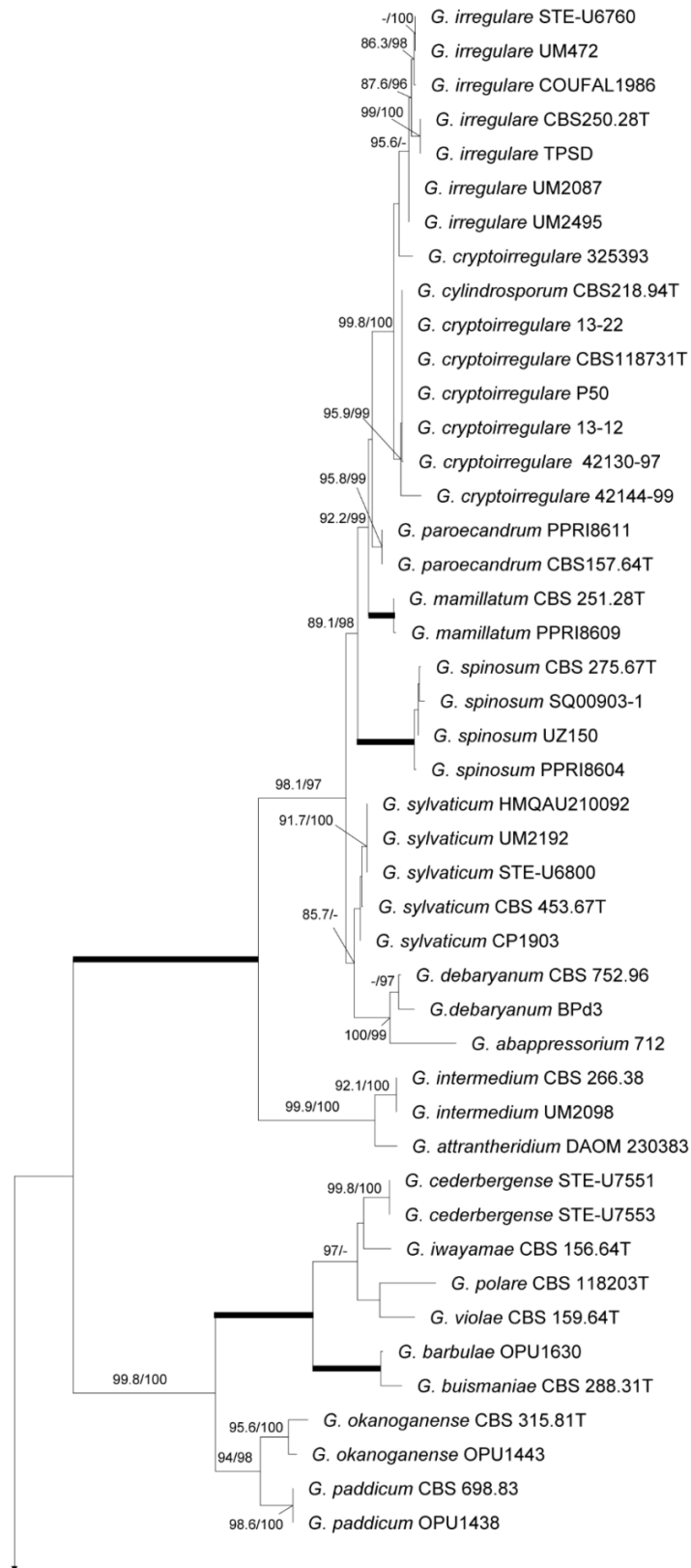


Figura 3. Árvore filogenética das espécies de *Pythium* associadas com a cultura do coentro baseada na região ITS. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

A árvore filogenética das espécies de *Globisporangium* em coentro baseada na região ITS (**Figura 4**) apresentou apenas dois isolados. A árvore mostra os dois isolados (PYT 901 e PYT 902) e foram identificados como *G. ultimatum* agrupados junto com isolados representativos da mesma espécie (SH-aLRT = 98,9 e *bootstrap* = 100).



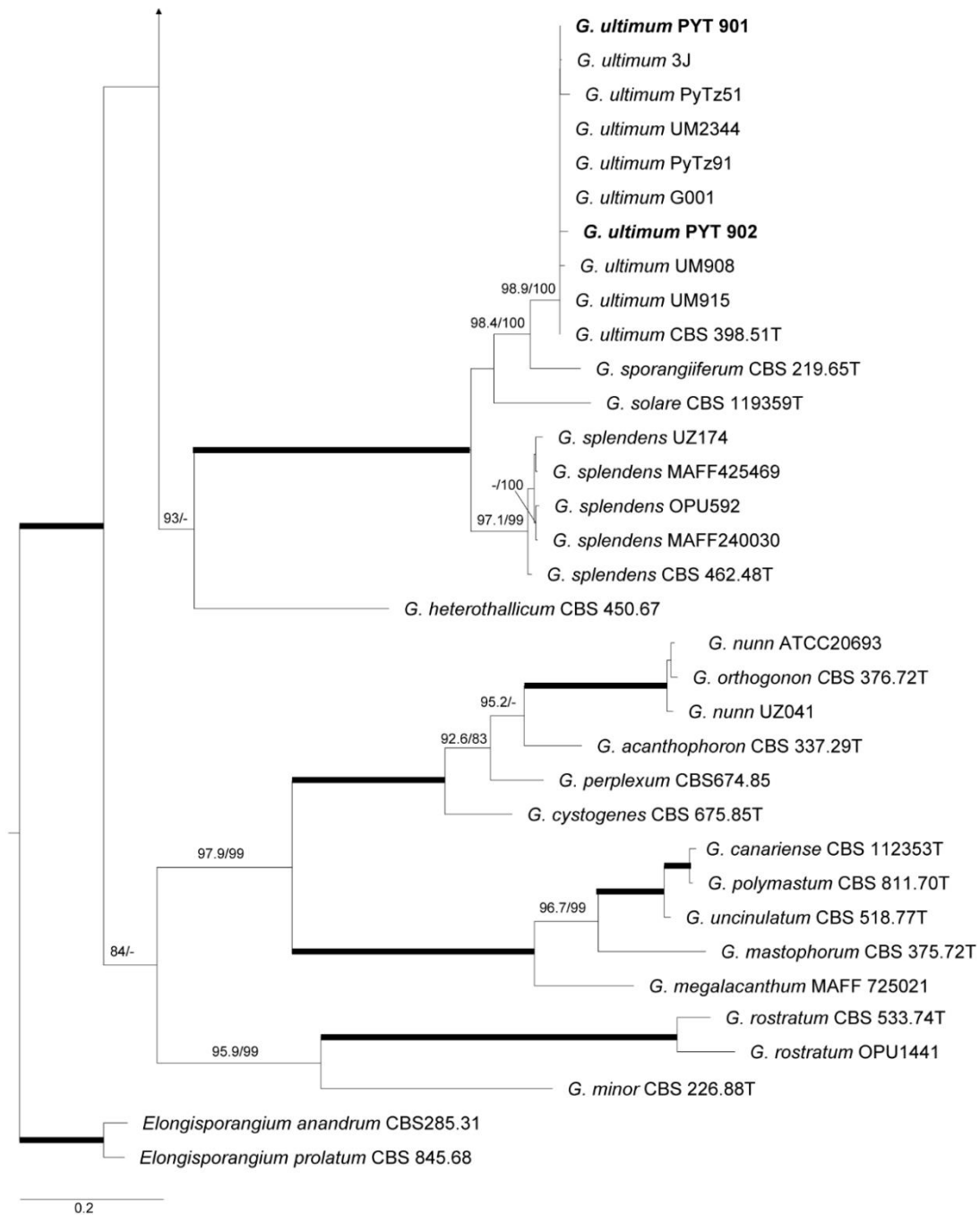
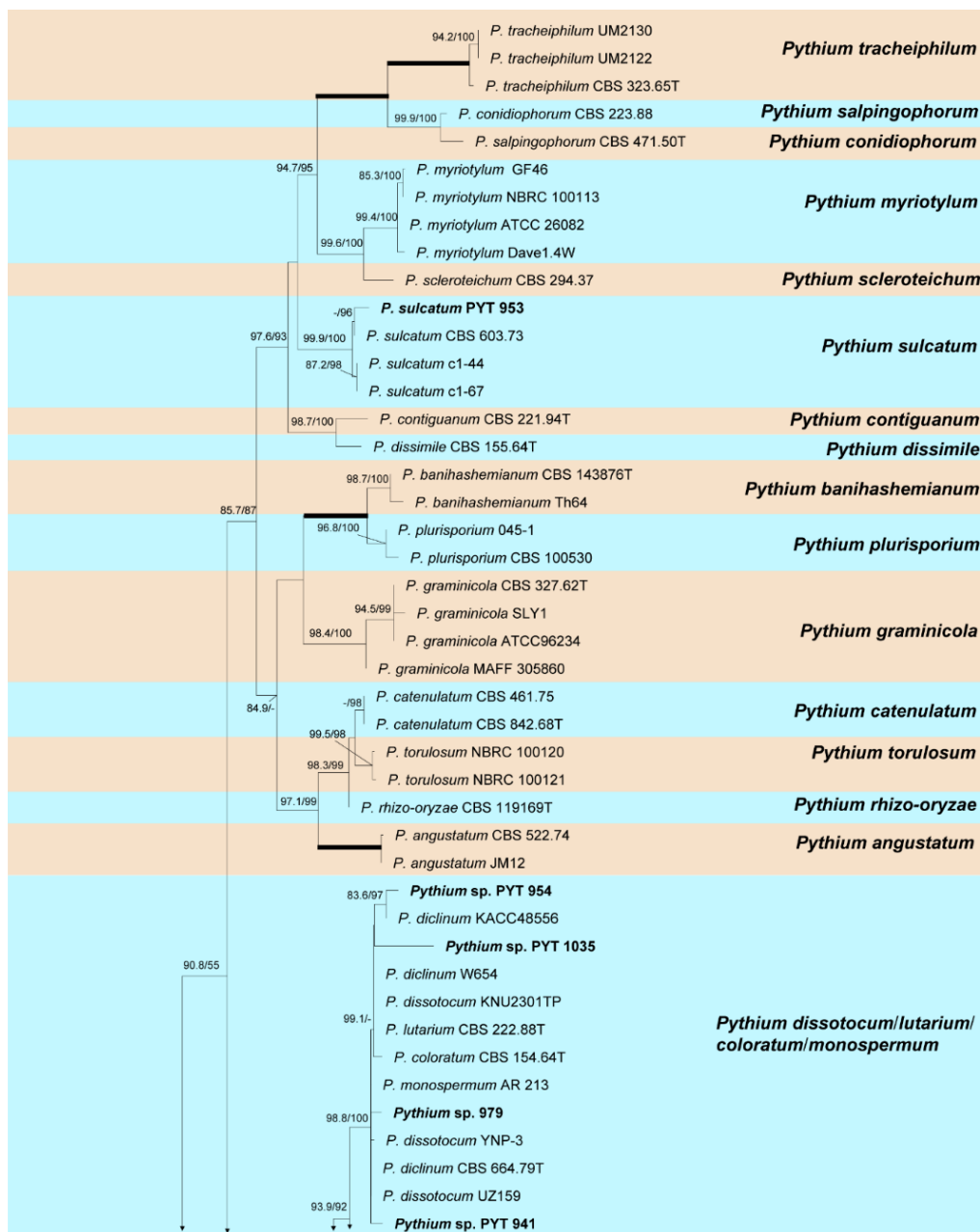


Figura 4. Árvore filogenética das espécies de *Globisporangium* associadas com o cultivo do coentro baseada na região ITS. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

A árvore filogenética, baseada em sequências concatenadas das regiões *Cox II* e ITS, das espécies de *Pythium* em coentro (**Figura 5**) mostra que o isolado PYT 953 agrupou junto aos

isolados representativos de *P. sulcatum* com 96% de bootstrap. Os isolados PYT 954, PYT 1035, PYT 979 e PYT 941 agruparam com isolados representativos de *P. dissotocum*, *P. lutarium*, *P. coloratum* e *P. monospermum* com 98,8 % de SH-aLRT e 100% de bootstrap, o isolado PYT 978 junto aos isolados de referência de *P. oopapillum* com 90,8 de SH-aLRT e 96% de bootstrap, e o isolado PYT 945 no mesmo clado da espécie *P. aphanidermatum* com 96,9 de SH-aLRT e 100% de bootstrap



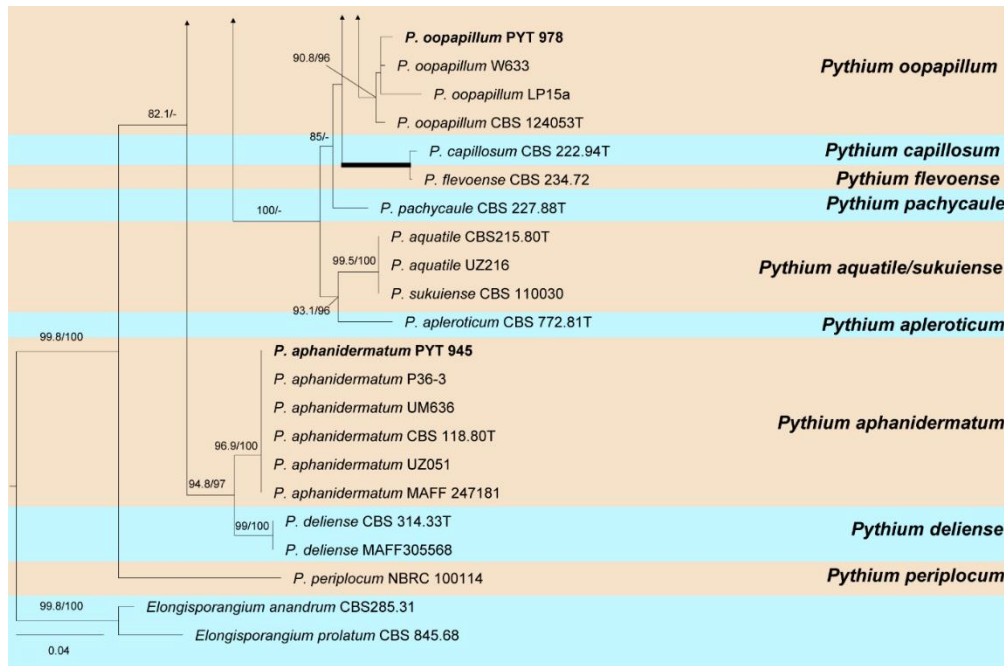
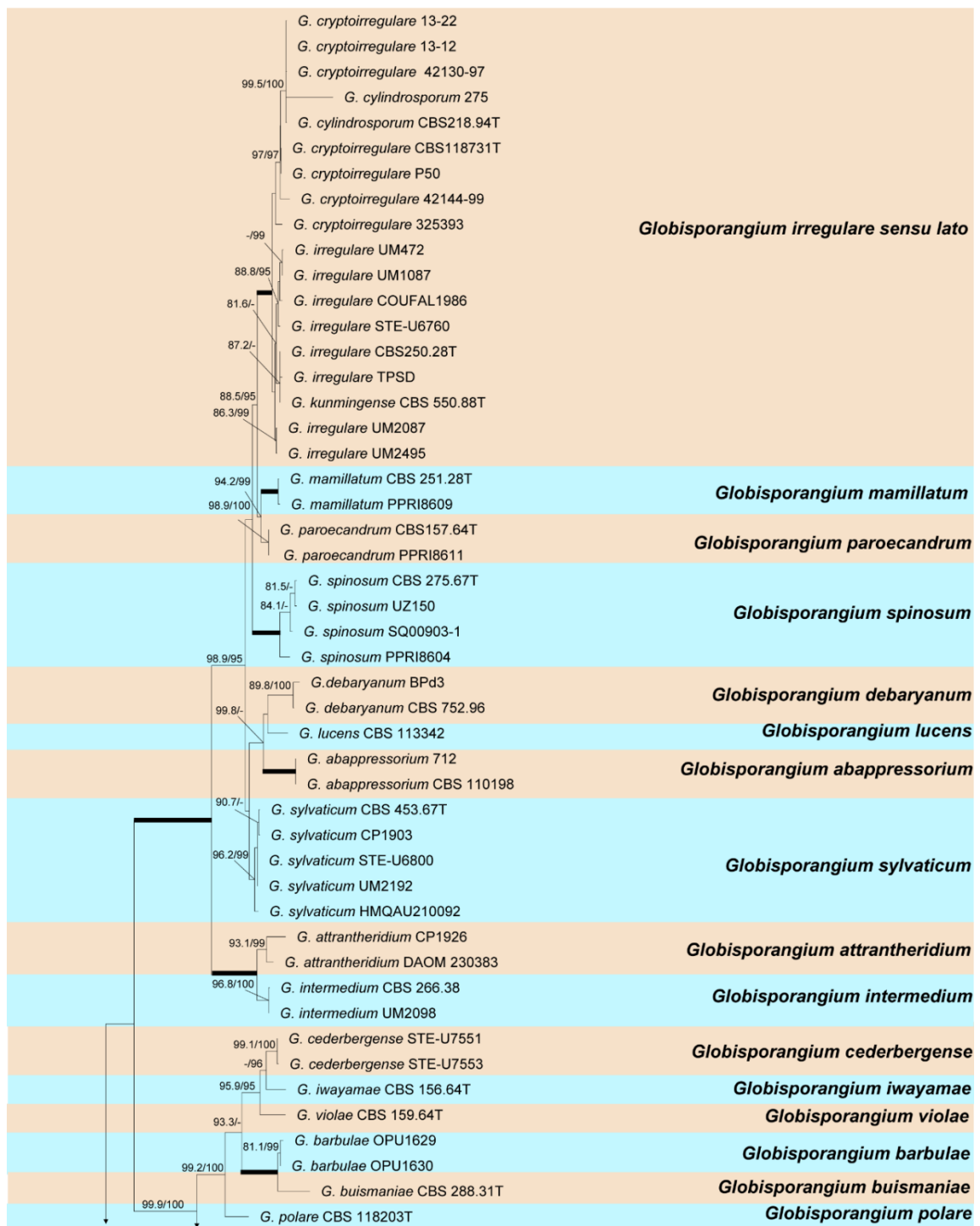


Figura 5. Árvore filogenética concatenada das espécies de *Pythium* associadas com o cultivo do coentro baseada nas regiões *Cox II* e *ITS*. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

A árvore filogenética, baseada em sequências concatenadas das regiões *Cox II* e *ITS*, das espécies de *Globisporangium* em coentro (**Figura 6**) apontou que os isolados PYT 901 e PYT 902 pertencem ao clado junto com isolados representativos de *G. ultimum* (SH-aLRT = 99,5 e *bootstrap* = 100).



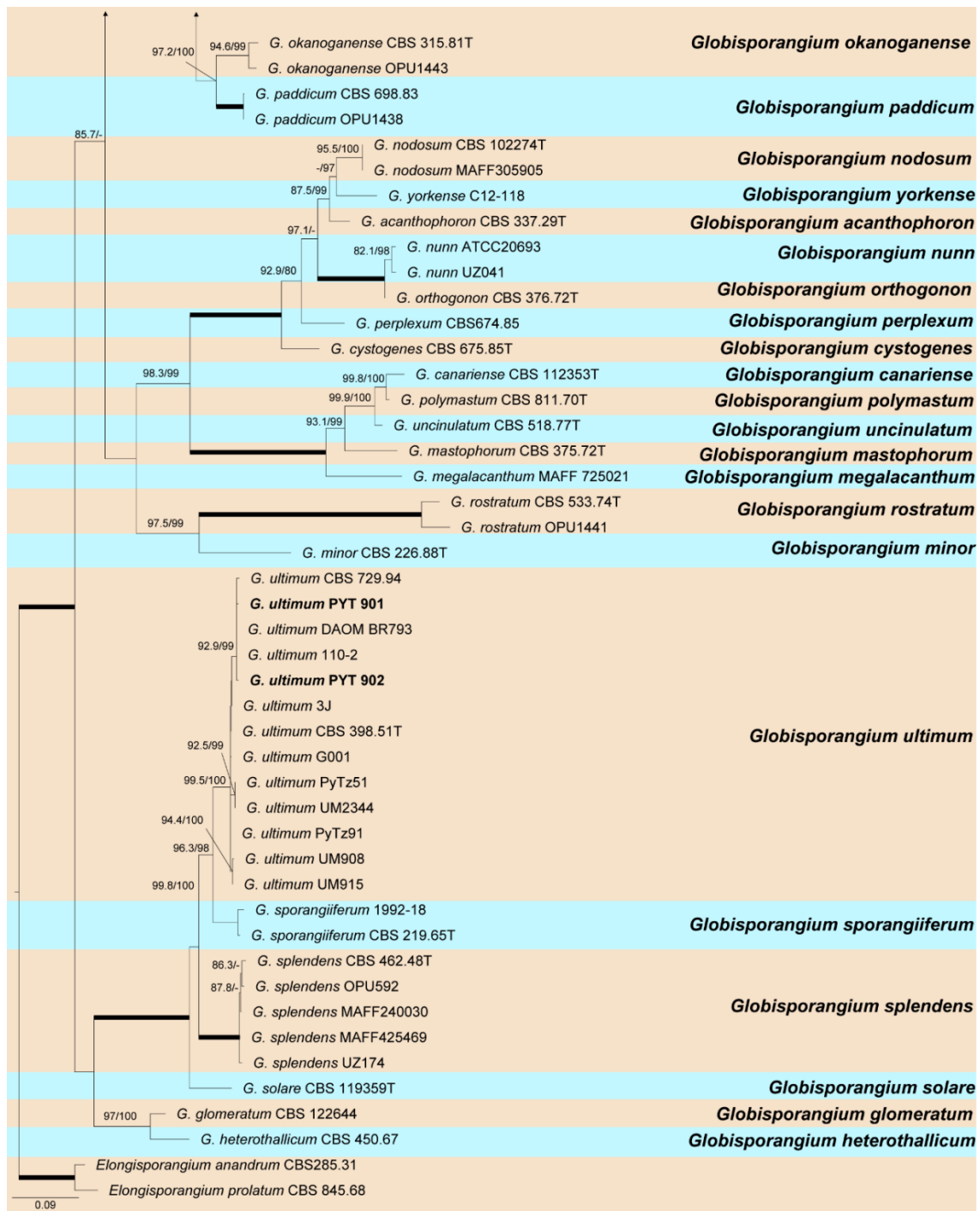


Figura 6. Árvore filogenética concatenada das espécies de *Globisporangium* associadas com o cultivo do coentro baseada nas regiões Cox II e ITS. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

Discussão

A identificação precisa dos fitopatógenos é crucial para o manejo eficaz de doenças de plantas. No contexto da agricultura brasileira, onde o coentro é cultivado em todas as macrorregiões do país, a presença de patógenos como *Pythium* e *Globisporangium*, causando tombamento e podridão de raiz, pode impactar significativamente a produtividade e a sanidade das plantas. A filogenia molecular tem se mostrado uma ferramenta importante para distinguir essas espécies fitopatogênicas, oferecendo uma compreensão mais detalhada da sua distribuição e diversidade (Garibaldi *et al.*, 2022).

No presente trabalho, as análises filogenéticas indicaram um complexo de espécies de oomicetos causando doenças no cultivo do coentro no Brasil. A filogenia confirmou, de maneira consistente, a presença das espécies *P. oopapillum* (PYT 974 e PYT 978), *P. aphanidermatum* (PYT 944 e PYT 945), *P. sulcatum* (PYT 953) em coentro. Quatro isolados (PYT 901, PYT 902, PYT 955 e PYT 989) do gênero *Globisporangium*, que foi separado de *Pythium* (Uzuhashi *et al.*, 2010, Nguyen *et al.*, 2022) também foram identificados, sendo todos pertencentes à espécie *G. ultimum*. Nesse sentido, métodos de identificação molecular, como o uso das regiões gênicas de Cox II e ITS, têm se tornado ferramentas importantes para distinguir diferentes espécies de *Pythium* e *Globisporangium* (Al-Mahmooli *et al.*, 2024). O ponto para destacar é que essas análises também agruparam dez isolados (PYT 900, PYT 924, PYT 940, PYT 941, PYT 942, PYT 954, PYT 975, PYT 976, PYT 979 e PYT 1035) em clados inespecíficos, que englobam várias espécies. Assim, eles não puderam ser identificados com precisão e foram denominados como *Pythium* sp. Esses isolados podem, portanto, representar potenciais espécies novas. Para identificar esses isolados a nível de espécie, seria necessário analisar outras regiões gênicas e/ou caracterizá-los morfológicamente.

Os oomicetos identificados neste estudo causam doenças em várias espécies vegetais e estão presentes em diferentes regiões de plantio, o que evidencia sua ampla distribuição e adaptabilidade. *Pythium aphanidermatum*, por exemplo, já foi relatado atacando espécies de várias famílias botânicas, como Malvaceae, Bromeliaceae, Asparagaceae, Poaceae, Amaryllidaceae, Amaranthaceae, Acanthaceae, Fabaceae, Asteraceae e Solanaceae (USDA, 2024). Na família Apiaceae, além do coentro, *P. aphanidermatum* já foi relatado em cenoura-brava causando doença nas raízes e presente no solo (Ma *et al.*, 1990) e em salsa (Raabe *et al.*, 1981). Também na família Apiaceae, a espécie *P. sulcatum* foi relatada no coentro, em salsão (Ginns, 1986), na cenoura-brava (Levesque *et al.*, 1998), no funcho (Koike *et al.*, 2015) e na salsa (Petkowski *et al.*, 2013). Além disso, há relatos deste patógeno nas famílias Solanaceae, Curcubitaceae, Asteraceae e Fabaceae (USDA, 2024), indicando uma ampla gama de hospedeiras.

Em outro trabalho com a família Apiaceae, além de coentro, *P. oopapillum* já foi relatado, causando podridão de raiz, em salsa, em cultivo hidropônico no Brasil (Gonçalves *et al.*, 2016). Além disso, há relatos de sua presença em plantas das famílias Fabaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Poaceae, Lamiaceae, Cucurbitaceae, Ericaceae, Liliaceae e Scrophulariaceae (USDA, 2024).

Pythium ultimum (= *G. ultimum*) já foi relatado causando podridão de colo e raiz em coentro na Itália (Garibaldi *et al.*, 2010). No entanto, o presente estudo representa o primeiro registro de *G. ultimum* atacando coentro no Brasil. *Pythium ultimum* var. *ultimum* foi registrado afetando membros da família Solanaceae na Índia (Dubey *et al.*, 2020). Na família Brassicaceae, *G. ultimum* foi relatado em *Brassica oleracea* var. *botrytis* (couve-flor) na Itália (Cariddi *et al.*, 2017). Na família Pinaceae, *Pythium ultimum* foi identificado em *Cedrus libani* (cedro-do-líbano) na Grécia (Pantidou, 1973). Na família Punicaceae, *Globisporangium ultimum* foi encontrado em *Punica granatum* (romã) na Tunísia (Benfradj *et al.*, 2022). Na família Amaranthaceae, *P. ultimum* foi registrado em *Beta vulgaris* (beterraba) nos Estados Unidos (Shaw, 1973). Na família Fabaceae, foi identificado atacando *Glycine max* (soja) na Argentina (Grijalba *et al.*, 2021). Na família Cucurbitaceae, foi encontrado em *Cucumis sativus* (pepino) nos Estados Unidos (Shaw, 1973). Todos esses registros demonstram uma distribuição cosmopolita deste patógeno sendo capaz de afetar várias espécies em diferentes famílias botânicas ao redor do mundo (USDA, 2024).

Além da diversidade de hospedeiras, os oomicetos do complexo *Pythium* apresentam ampla distribuição geográfica. Neste estudo, isolados coletados no estado do Rio de Janeiro foram identificados como *Pythium* sp. e *G. ultimum*. Enquanto isolados provenientes de São Paulo apresentaram uma maior diversidade, incluindo *P. sulcatum*, *P. oopapillum*, *Pythium* sp. e *G. ultimum*. Já o isolado encontrado em Santa Catarina foi caracterizado como *P. aphanidermatum*. E o isolado oriundo de Minas Gerais foi identificado como *G. ultimum*. A distribuição de patógenos como *Pythium* sp., *P. aphanidermatum*, *P. sulcatum*, *P. oopapillum* e *G. ultimum* em regiões produtoras de coentro no Brasil indica uma ampla presença desses organismos em diferentes condições edafoclimáticas e sistemas de cultivo, tanto em campo aberto quanto em hidroponia. O presente levantamento (ainda de abrangência limitada) revela que esses patógenos estão amplamente disseminados, o que pode impactar negativamente a produção de coentro, uma cultura de grande importância regional e cultural. Neste cenário, se faz necessário buscar estratégias de controle para as espécies do complexo *Pythium* para que os agricultores possam enfrentar os desafios impostos por esses patógenos e manter a viabilidade econômica da cultura.

Conclusões

A investigação realizada no presente estudo, com ajuda de marcadores moleculares, revelou uma diversidade de patógenos dos gêneros *Pythium* e *Globisporangium* em cultivos de coentro no Brasil, que pode ainda incluir potencial espécie (s) nova (s). A ampla distribuição geográfica de algumas dessas espécies nos mais diferenciados sistemas de cultivo, aponta a potencial ameaça que representa este grupo de patógenos para a produção de coentro no país. Esses achados ressaltam a necessidade da implementação de estratégias de manejo fitossanitário específicas e eficazes para minimizar o impacto desses patógenos e garantir a sustentabilidade da produção agrícola do coentro em diferentes regiões do país.

Referências

- AL-MAHMOOLI, I. H.; FINCKH, M. R.; VELAZHAHAN, R.; ALJABRI, A. M.; ŠIŠIĆ, A.; HUSSAIN, S.; ABDEL-JALIL, R.; AL-SADI, A. M. *Pythium* and *Globisporangium* species associated with cucumber rhizosphere causing damping-off and their effects on cucumber seed decay in Oman. **Arch Microbiol**, v. 206, p. 374, 2024.
- ARORA, H.; SHARMA, A.; SHARMA, S.; HARON, F. F.; GAFUR, A.; SAYYED, R. Z.; DATTA, R. *Pythium* damping-off and root rot of *Capsicum annuum* L.: Impacts, diagnosis, and management. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 823, 2021.
- BARBOZA, E. A. **Diversidade de *Pythium* e *Phytophythium* associados a hortaliças e plantas invasoras no Brasil, sensibilidade de isolados a mefenoxam e gama de hospedeiras**. 2020. 116 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil, 2020.
- BENFRADJ, N.; MANNAI, S.; FATHALLAH, A.; BOUGHALLEB-M'HAMDI, N. First report of *Fusarium oxysporum* and *Globisporangium ultimum* as causal agents of pomegranate fruit rot in Tunisia. **New Disease Reports**, v. 45, p. e12055, 2022.
- BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; SIMON, P. W. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, p. 32-38, 1999.
- CARIDDI, C.; MIACOLA, C.; PRIGIGALLO, M. I.; BUBICI, G. First report of cauliflower collar rot caused by *Globisporangium ultimum* in Italy. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, p. 540, 2017.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J. trop. Med. Hyg.**, v. 42, p. 225-226, 1939.

- DIEDERICHSEN, A.; HAMMER, K. The infraspecific taxa of coriander (*Coriandrum sativum* L.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 33-63, 2003.
- DUBEY, M. K.; YADAV, M.; UPADHYAY, R. S. An annotated list of genus *Pythium* from India. **Plant Pathology & Quarantine**, v. 10, p. 120-132, 2020.
- USDA. USDA Fungal Databases. Available online: <https://fungi.ars.usda.gov/>. Acessado em 21 de maio de 2024.
- GANTAIT, S.; SHARANGI, A. B.; MAHANTA, M.; MEENA, N. K. Agri-biotechnology of coriander (*Coriandrum sativum* L.): An inclusive appraisal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.106, p. 951-969, 2022.
- GARIBALDI, A.; TABONE, G.; GULLINO, M. L. First report of root rot caused by *Pythium oopapillum* on *Digitalis purpurea* in Italy. **Plant Disease**, v. 106, n. 4, p. 1309, 2022.
- GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L. First report of collar and root rot caused by *Pythium ultimum* on coriander in Italy. **Plant Disease**, v. 94, n. 9, p. 1167, 2010.
- GINNS, J. H. Compendium of plant disease and decay fungi in Canada 1960-1980. **Res. Br. Can. Agric. Publ.**, v. 1813, p. 416, 1986.
- GONÇALVES, D. R.; JESUS, A. L.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. *Pythium* and *Phytophythium* species associated with hydroponically grown crops around the city of São Paulo, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, p. 397-405, 2016.
- GRIJALBA, P. E.; RIDAO, A. C.; STECIOW, M. M. Oomycetes species associated with soybean in Buenos Aires Province (Argentina). **Phytoparasitica**, v. 49, p. 1027-1042, 2021.
- FERREIRA, M. F. **Epidemiologia de doenças radiculares na cultura do coentro no município de Arapiraca-AL**. 2013. 32 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2013.
- HUDSPETH, D. S. S.; NADLER, S. A.; HUDSPETH, M. E. S. A *Cox 2* molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. **Mycologia**, v. 92, n. 4, p. 674-684, 2000.
- IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. Censo Agropecuário 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>>. Acesso em: 2 jul. 2024.
- KEARSE, M. et al., Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.
- KOIKE, S. T.; TOMPKINS, D. V.; MARTIN, F.; RAMON, M. L. First report of *Pythium* root rot of fennel in California caused by *Pythium sulcatum*. **Plant Disease**, v. 99, p. 1645, 2015.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- LARIBI, B.; KOUKI, K.; M'HAMDI, M.; BETTAIEB, T. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. **Fitoterapia**, v. 103, p. 9-26, 2015.

- LEHARWAN, M.; GUPTA, M. Stem gall of coriander: a review. **Agricultural Reviews**, v. 40, n. 2, p. 121-128, 2019.
- LEVESQUE, C. A.; DE COCK, A. W. A. M. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, v. 108, p. 1363-1383, 2004.
- LEVESQUE, C. A.; HARLTON, C. E.; DE COCK, A. W. A. M. Identification of some oomycetes by reverse dot blot hybridization. **Phytopathology**, v. 88, p. 213-222, 1998.
- LIMA, M. F.; DE ÁVILA, A. C.; WANDERLEY JR, L. J. G.; NAGATA, T.; GAMA, L. J. W. Coriander: a new natural host of *Groundnut ringspot virus* in Brazil. **Plant Disease**, v. 83, n. 9, p. 878, 1999.
- MA, G.Z.; YU, Y.N.; WANG, K. Species of *Pythium* recently isolated from Ningxia in China. **Mycosystema**, v. 3, p. 1-8, 1990.
- MASAGO, H.; YOSHIKAWA, M.; FUKADA, M.; NAKANISHI, N. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. **Phytopathology**, v. 67, p. 425-428, 1977.
- MUSSI-DIAS, V. **Fitopatologia no estado do Rio de Janeiro: histórico, índice de doenças de plantas e 15 anos de atividades da Clínica Fitossanitária da UENF**. 2011. 283 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2011.
- NGUYEN, H. D. T. et al., Whole genome sequencing and phylogenomic analysis show support for the splitting of genus *Pythium*. **Mycologia**, v. 114, n. 3, p. 501-515, 2022.
- NORONHA, M. A.; ASSUNÇÃO, M. C. **Identificação e manejo das principais doenças do coentro e alface no estado de Alagoas**. Comunicado Técnico, Embrapa, dez. 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/141878/1/cot-179.pdf>>. Acesso em: jul. 2024.
- PANTIDOU, M. E. Fungus-host index for Greece. **Kiphissia: Benaki Phytopathological Institute**, 1973. 382 p.
- PETKOWSKI, J. E. et al., *Pythium* species associated with root rot complex in winter-grown parsnip and parsley crops in southeastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, p. 403-411, 2013.
- PRACHAYASITTIKUL, V. et al., Coriander (*Coriandrum sativum*): a promising functional food toward the well-being. **Food Research International**, v. 105, p. 305-323, 2018.
- RAABE, R. D.; CONNERS, I. L.; MARTINEZ, A. P. Checklist of plant diseases in Hawaii. **Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources**, p. 313, 1981.
- REIS, A.; LOPES, C. A.; LIMA, M. L. P.; BOITEUX, L. S. *Eryngium foetidum*, *Petroselinum crispum* and *Coriandrum sativum*: New apiaceae hosts of *Oidiopsis taurica* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 339, 2004.
- REIS, A.; LOPES, C. A. **Doenças do coentro no Brasil**. Circular Técnica, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/157359/1/CT-157.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2024.

SHAW, C. G. **Host fungus index for the Pacific Northwest** - I. Hosts. *Bulletin* 765. Washington: Washington State University Agricultural Experiment Station, 1973. p. 1-121.

SILVA, E. M. D.; BRITO, N. D.; MESQUITA, N. L. S. *Pythium aphanidermatum* causing damping off, collar and root rot of coriander in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 90, p. 168-172, 2024.

SINGH, R. K.; MEENA, S. S.; VASHISHTHA, B. B. Medicinal properties of seed spices. **Ajmer: National Research Centre on Seed Spices (ICAR)**, p. 19-22, 2007.

UZUHASHI, S.; KAKISHIMA, M.; TOJO, M. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. **Mycoscience**, v. 51, n. 5, p. 337-365, 2010.

ZHOU, Y. et al., First report of coriander leaf blight diseases caused by *Cladosporium tenuissimum* in China and analysis of metabolic alterations related to pathogenic processes. **Plant Pathology**, v. 71, n. 5, p. 1092-1102, 2022.

CAPÍTULO IV

Identificação molecular de isolados de *Pythium* e *Globisporangium* associados com o cultivo da rúcula (*Eruca sativa*) no Brasil

Identificação molecular de isolados de *Pythium* e *Globisporangium* associados com o cultivo da rúcula (*Eruca sativa*) no Brasil

Éllen Junia Canedo¹, Maria Esther de Noronha Fonseca², Josiene Silva Veloso¹, Leonardo Silva Boiteux^{1,2}, Ailton Reis^{1,2}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fitopatologia, 52.171-900, Recife-PE, Brasil;

²Embrapa Hortaliças, 70.275-970, Brasília-DF, Brasil.

Resumo

A rúcula (*Eruca sativa*) é uma hortaliça folhosa da família Brassicaceae, nativa da região do Mediterrâneo, sendo muito apreciada no centro-sul do Brasil. Patógenos de raízes, incluindo espécies do complexo *Pythium*, causam doenças importantes na rúcula, como podridão radicular e tombamento, afetando severamente a produção. No presente trabalho, foi conduzida a caracterização molecular de isolados do complexo *Pythium* obtidos de plantas de rúcula com sintomas de tombamento ou podridão radicular em diferentes regiões produtoras do Brasil. O principal objetivo foi catalogar a diversidade deste complexo patogênico nesta cultura. Os isolamentos foram realizados a partir de fragmentos de raízes e caules, desinfestados e incubados placas de Petri contendo o meio de cultura V8. Posteriormente, o DNA total dos isolados foi extraído dos micélios e amplificados a partir de primers das regiões ITS (espaçador transcrito interno) do DNA ribossômico e do gene mitocondrial *Cox II* (subunidade 2 da citocromo c oxidase). Os amplicons foram sequenciados e as sequências de consenso foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados do NCBI. As sequências consenso também foram utilizadas para estudar as relações filogenéticas dos isolados. Dos nove isolados caracterizados, quatro foram identificados como *P. oopapillum* e um como *G. ultimum*. Não foi possível determinar as espécies de três isolados de *Pythium* e um de *Globisporangium*. A presença de uma gama de espécies distintas de *Pythium* e *Globisporangium* em diferentes sistemas de cultivo (campo aberto e hidroponia) reforça a necessidade de estratégias de manejo adequadas para evitar perdas por esse grupo de patógenos.

Palavras-chave: *Eruca sativa*, Complexo *Pythium*, Diversidade genética.

Abstract

Arugula or salad rocket (*Eruca sativa*) is a leafy vegetable of the Brassicaceae family, native to the Mediterranean region and highly appreciated in the central-southern parts of Brazil. Root pathogens, including species from the *Pythium* complex, cause significant diseases in arugula, such as root rot and damping-off, which severely affect production. In the present study,

molecular characterization was conducted on isolates from the *Pythium* complex obtained from arugula plants showing symptoms of damping-off or root rot in different production regions of Brazil. The primary goal was to catalog the diversity of this pathogenic complex in this crop. Isolations were performed using root and stem fragments, which were disinfected and incubated on Petri dishes containing V8 culture medium. Subsequently, the total DNA of the isolates was extracted from the mycelia and amplified using primers for the ITS (internal transcribed spacer) regions of ribosomal DNA and the mitochondrial gene *Cox II* (cytochrome c oxidase subunit 2). The amplicons were sequenced, and the consensus sequences were compared to those available in the NCBI database. The consensus sequences were also used to study the phylogenetic relationships of the isolates. Of the nine characterized isolates, four were identified as *P. oopapillum* and one as *G. ultimum*. The species of three *Pythium* isolates and one *Globisporangium* isolate could not be determined. The presence of a range of distinct *Pythium* and *Globisporangium* species in different cultivation systems (open field and hydroponics) highlights the need for appropriate management strategies to prevent losses from this group of pathogens.

Keywords: *Eruca sativa*, *Pythium* complex, Genetic diversity.

Introdução

A rúcula (*Eruca sativa* Miller) é uma hortaliça folhosa pertencente à família Brassicaceae, originária da região mediterrânea. É encontrada naturalmente no sul da Europa, no norte da África e em alguns países da Ásia (Garg & Sharma, 2014; Sarabi *et al.*, 2022). Possui diversos compostos com propriedades medicinais para o estômago, rins e intestino (Garg & Sharma, 2014; Bell *et al.*, 2015). Além de apresentar ações adstringentes, depurativas e tônicas (Garg & Sharma, 2014; Bell *et al.*, 2015). Esta hortaliça também é fonte de moléculas quimioprotetoras, como os polifenóis, flavonoides, fibras, vitamina C e pró-vitamina A (Bell *et al.*, 2015).

A demanda por esta folhosa tem aumentado consideravelmente no Brasil, impulsionada tanto por suas propriedades benéficas para a saúde quanto por suas características sensoriais, como a picância e o aroma distintivo (CFN, 2024). Segundo dados do IBGE (2017), a produção dessa hortaliça no Brasil atingiu 40.527 toneladas. O crescimento do consumo pode ser atribuído ao sabor picante e ao cheiro característico que a tornam atraente para os consumidores (CFN, 2024).

Como toda hortaliça, a rúcula sofre grandes perdas devido ao ataque de fitopatógenos, principalmente os fungos e os oomicetos. Os principais fungos que afetam a rúcula são espécies de *Alternaria* (Reis & Boiteux, 2010), *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, responsáveis por podridões de raízes e tombamento (Reis *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2024). Os oídios (causados por espécies de *Erysiphe*) e a ferrugem branca (induzida pelo oomiceto *Albugo candida*) afetam principalmente os tecidos foliares e caulinares (Latinovic *et al.*, 2019).

Oomicetos do complexo *Pythium* têm sido reportados causando podridões e destruição dos sistemas radiculares, resultando em tombamento, murcha e morte das plantas (Freire & Cardoso, 2009). A presença de oomicetos do complexo *Pythium* em rúcula é particularmente problemática em sistemas hidropônicos, onde a água e os nutrientes circulam continuamente, proporcionando condições ideais para a propagação desses patógenos (Freire & Cardoso, 2009; Sutton *et al.*, 2006). Gonçalves *et al.* (2016) relataram sete espécies de *Pythium* (*P. oopapillum*, *P. kashmirensense*, *P. middletonii*, *P. periprosum* e *P. segnitium*) causando podridões de raízes em rúcula em condições de hidroponia.

A identificação de isolados de oomicetos geralmente é realizada com base em dados morfológicos e em informações obtidas por meio de técnicas moleculares, como o sequenciamento de regiões específicas do DNA, principalmente as regiões ITS (espaçador interno transcrito) e Cox II (subunidade 2 da citocromo c oxidase) (Levesque & Cock, 2004; Nguyen *et al.*, 2022).

Embora o gênero *Pythium* seja um importante causador de doenças na cultura da rúcula, ainda são escassos os estudos sobre a diversidade e a filogenia das espécies de *Pythium* associadas a essa cultura, nas diferentes regiões produtoras do Brasil. Diante disso, o objetivo deste trabalho é identificar os isolados do complexo *Pythium* coletados em plantas de rúcula com o auxílio de filogenia de sequências das regiões ITS e Cox II.

Material e métodos

Local de condução dos trabalhos

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e Melhoramento Vegetal e nas casas de vegetação da Embrapa Hortaliças, localizada na zona rural da Ponte Alta, em Brasília-DF, a 15°56'00" latitude sul, 48°08'00" longitude oeste e altitude 997,6 m.

Obtenção e conservação dos isolados

Os isolados de *Pythium* foram obtidos de amostras de plantas de rúcula infectadas coletadas em hidroponias e em campos de produção de rúcula, em diferentes regiões produtoras do Brasil, ou recebidas no laboratório de fitopatologia da Embrapa Hortaliças.

O isolamento foi realizado a partir de fragmentos de raiz e caule com sintomas da doença. Os tecidos à margem da lesão foram desinfestados em álcool a 70% por um minuto e

em hipoclorito de sódio a 0,5% por dois minutos, lavados duas vezes em água destilada e esterilizada e colocados para secar em papel de filtro esterilizado. Após o processo de desinfestação superficial, os fragmentos de aproximadamente 5 mm foram transferidos para placas de Petri contendo meio V8 clarificado (100 mL de suco V8, 9 g de ágar, 1,5 g de CaCO_3 , 400 mL de água destilada) (Campbell®), suplementado com antibióticos e fungicidas nas seguintes concentrações: Benomyl (40 mg.L^{-1}) (E. I. duPont De Nemours, Inc. Wilmington, DE), Ampicilina (100 mg.L^{-1}) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), Rifampicina (10 mg.L^{-1}) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Pentacloronitrobenzeno - PCNB (30 mg.L^{-1}) (Uniroyal Chemical Co. Naugatuck, CT) e Nistatina (50 mg.L^{-1}) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), conforme descrito por Masago *et al.* (1977) e incubados em BOD à temperatura de 25°C. Após um a três dias, pontas de hifas foram transferidas para meio V8 clarificado e incubados em câmara de crescimento a 25 °C, em fotoperíodo de 12 h (Mussi-Dias *et al.*, 2011). Os isolados obtidos foram preservados através do método de Castellani (Castellani, 1939).

Amplificação de duas regiões genômicas dos isolados do complexo *Pythium*

A identificação dos isolados foi realizada através de filogenia de sequências das regiões ITS e *Cox II*. Para isso, o DNA total dos isolados foi extraído utilizando o método CTAB 2X modificado (pH = 8,0) e o protocolo de clorofórmio/álcool isoamílico (Boiteux *et al.*, 1999). O DNA purificado foi armazenado em microtubos com tampão Tris-EDTA (10 mM Tris e 0,5 mM EDTA) a -20 °C. A concentração de DNA foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop (NanoDrop Lite, Thermo Scientific®, EUA), e a integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para os ensaios de PCR, foram utilizados os primers derivados do gene *Cox II*, PF34 (5'-GGC AAA TGG GTT TTC AAG ATC C-3') e PF35 (5'-CCA TGA TTA ATA CCA CAA ATT TCA CTA-3'), além dos primers ITS4 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') e ITS5 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') desenhados para anelar em sequências conservadas da região ITS (Hudspeth *et al.*, 2000). Os amplicons foram purificados do gel de agarose empregando o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram enviados à ACTGene-Análises moleculares LTDA (Alvorada-RS) para sequenciamento.

Caracterização molecular dos isolados

A edição e a obtenção das sequências consensos foi feita por meio do programa Dragon v.1.6.0 (<http://www.dna-dragon.com/>). Posteriormente, as sequências consenso foram comparadas com os dados do NCBI via ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn). Sequências representando ex-tipos e sequências publicadas relacionadas foram recuperadas do GenBank (**Tabela Suplementar 1**). As sequências foram alinhadas usando método de refinamento iterativo G-INS-i no programa online MAFFT v.7 (Katoh & Toh, 2013, Katoh *et al.*, 2019), com parâmetros padrão para abertura e extensão de lacunas e matriz de pontuação de nucleotídeos 200PAM / $\kappa=2$ e ajustada manualmente quando necessário no MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). As relações filogenéticas de cada região e da matriz concatenada foram inferidas utilizando a Máxima Verossimilhança (ML), usando IQ-TREE v2.1.3 (Nguyen *et al.*, 2015). Os modelos de substituição mais adequados foram selecionados pelo ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017; Minh *et al.*, 2020). Os suportes dos ramos foram estimados usando o teste de razão de verossimilhança aproximada com interpretação Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT; Guindon *et al.*, 2010) e o suporte bootstrap ultrarrápido (UFboot) (Minh *et al.*, 2013; Hoang *et al.*, 2017) com 1000 de bootstrap. Os clados foram considerados bem suportados quando o suporte bootstrap ML foi ≥ 95 (UFboot) e ≥ 80 (SH-aLRT).

As árvores filogenéticas foram visualizadas no FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2012) e editadas no software Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems, EUA). A filogenia, baseada na informação das sequências Cox II e ITS, foi realizada tanto para as espécies identificadas como pertencentes ao gênero *Pythium* quanto para as espécies inicialmente identificadas como *Globisporangium*, cada uma comparada com isolados referência depositados no NCBI. Por fim, foi realizada a filogenia para as espécies identificadas como *Pythium* e *Globisporangium* a partir da concatenação das sequências amplificadas de Cox II e ITS.

Resultados

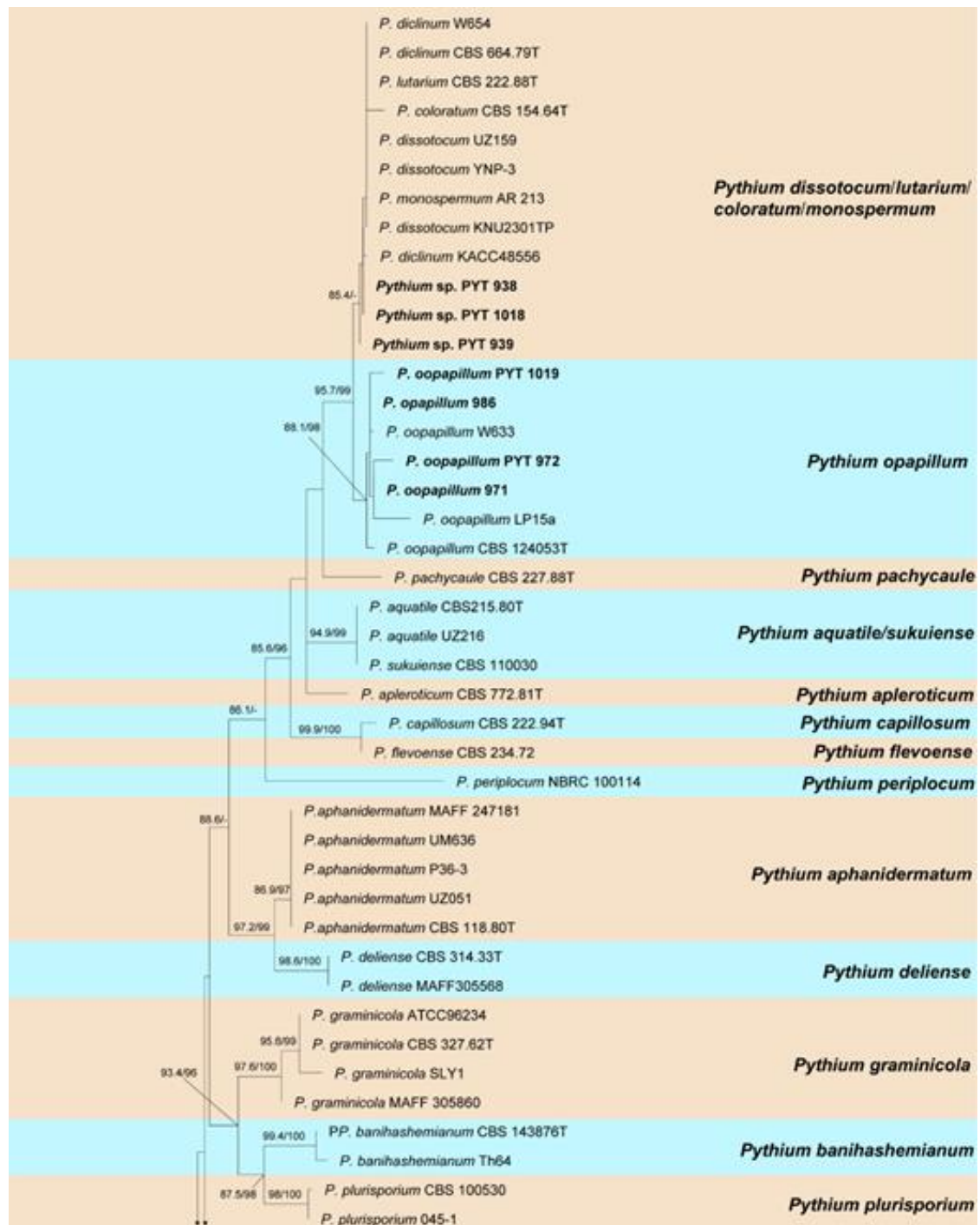
Foram obtidos dez isolados em rúcula, em diferentes regiões geográficas do Brasil (**Tabela 1**). Com base na comparação das sequências amplificadas para a região do Cox II com os dados depositados no NCBI, três isolados não puderam ser identificados ao nível de espécie e foram designados como *Pythium* sp. (PYT 938, PYT 939 e PYT 1018), quatro isolados foram identificados como *P. oopapillum* (PYT 971, PYT 972, PYT 986 e PYT 1019), e dois isolados apresentaram alta similaridade com isolados de referência de espécies de *Globisporangium*, sendo um identificado como *G. ultimum* (PYT 951) e o outro (PYT-968) não pode ser identificado ao nível de espécie. O isolado PYT 970, quando comparado com sequências do

GenBank, foi identificado com *G. irregulare*. Entretanto, ele não pode ser utilizado nas análises filogenéticas por causa da baixa qualidade das sequências geradas, devendo este isolado ser sequenciado novamente.

Tabela 1. Isolados, do complexo *Pythium*, obtidos de rúcula em diferentes sistemas de cultivo em três unidades federativas, entre 2022 e 2023.

Isolado	Local	Ambiente	Espécie	Mês/Ano
PYT-938	Piedade-SP	Hidroponia	<i>Pythium</i> sp.	Abril/2022
PYT-939	Ibiúna-SP	Campo	<i>Pythium</i> sp.	Abril/2022
PYT-951	Gama-DF	Campo	<i>Globisporangium ultimum</i>	Abril/2022
PYT-968	Conchal-SP	Campo	<i>Globisporangium</i> sp.	Junho/2022
PYT-970	Conchal-SP	Campo	<i>Globisporangium irregulare</i>	Junho/2022
PYT-971	Conchal-SP	Campo	<i>Pythium oopapillum</i>	Junho/2022
PYT-972	Conchal-SP	Campo	<i>Pythium oopapillum</i>	Junho/2022
PYT-986	Conchal-SP	Campo	<i>Pythium oopapillum</i>	Junho/2022
PYT-1018	Tijucas-SC	Hidroponia	<i>Pythium</i> sp.	Abril/2023
PYT-1019	Tijucas-SC	Hidroponia	<i>Pythium oopapillum</i>	Abril/2023

A árvore filogenética das espécies de *Pythium* em rúcula baseada na região Cox II (**Figura 1**) agrupou os isolados em estudo em dois clados. Os isolados PYT 938, PYT 1016, PYT 939 foram agrupados com um valor de bootstrap de 85,4 junto com isolados representativos de *Pythium dissotocum* / *P. lutarium* / *P. coloratum* / *P. monospermum*, sendo estes identificados apenas como *Pythium* sp. Quatro isolados (PYT 971, PYT 972, PYT 986 e PYT 1019) foram agrupados, com um valor de bootstrap de 88,1, junto com isolados representativos da espécie *P. oopapillum*.



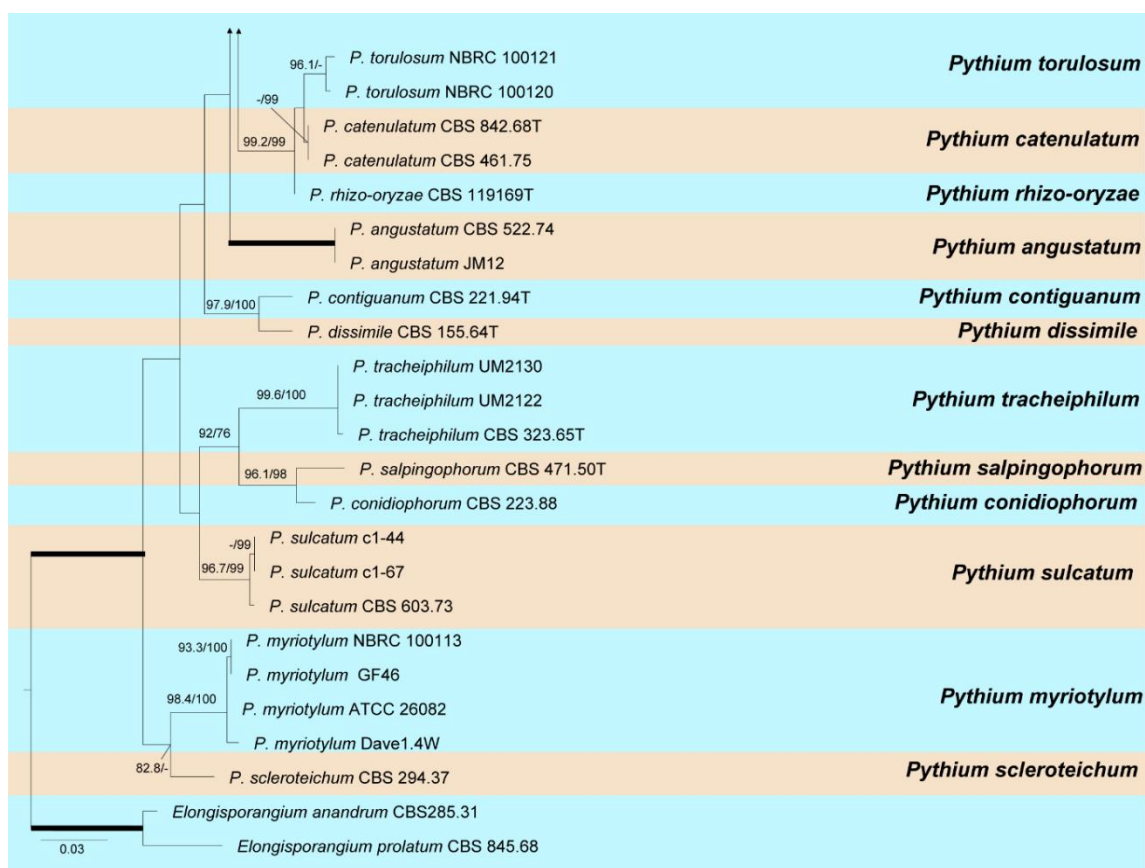
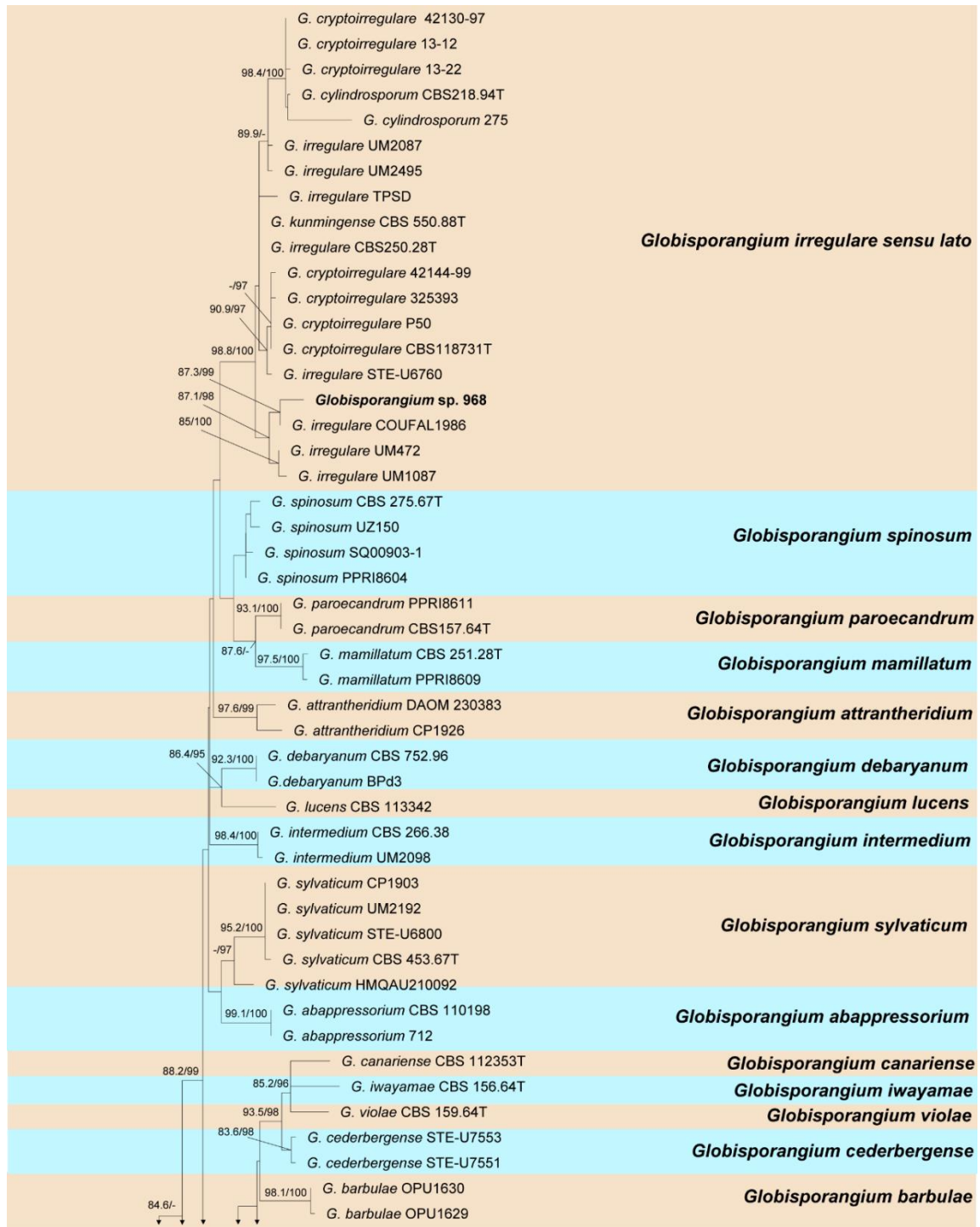


Figura 1. Árvore filogenética das espécies de *Pythium* em rúcula baseada em Cox II. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

A árvore filogenética das espécies de *Globisporangium* em rúcula baseada na região Cox II (**Figura 2**) agrupou o isolado PYT 968, com um valor de bootstrap de 87,1 junto aos isolados representativos de *Globisporangium* sp. e o isolado PYT 951 junto aos isolados representativos de *G. ultimum*, com um bootstrap de 95,6.



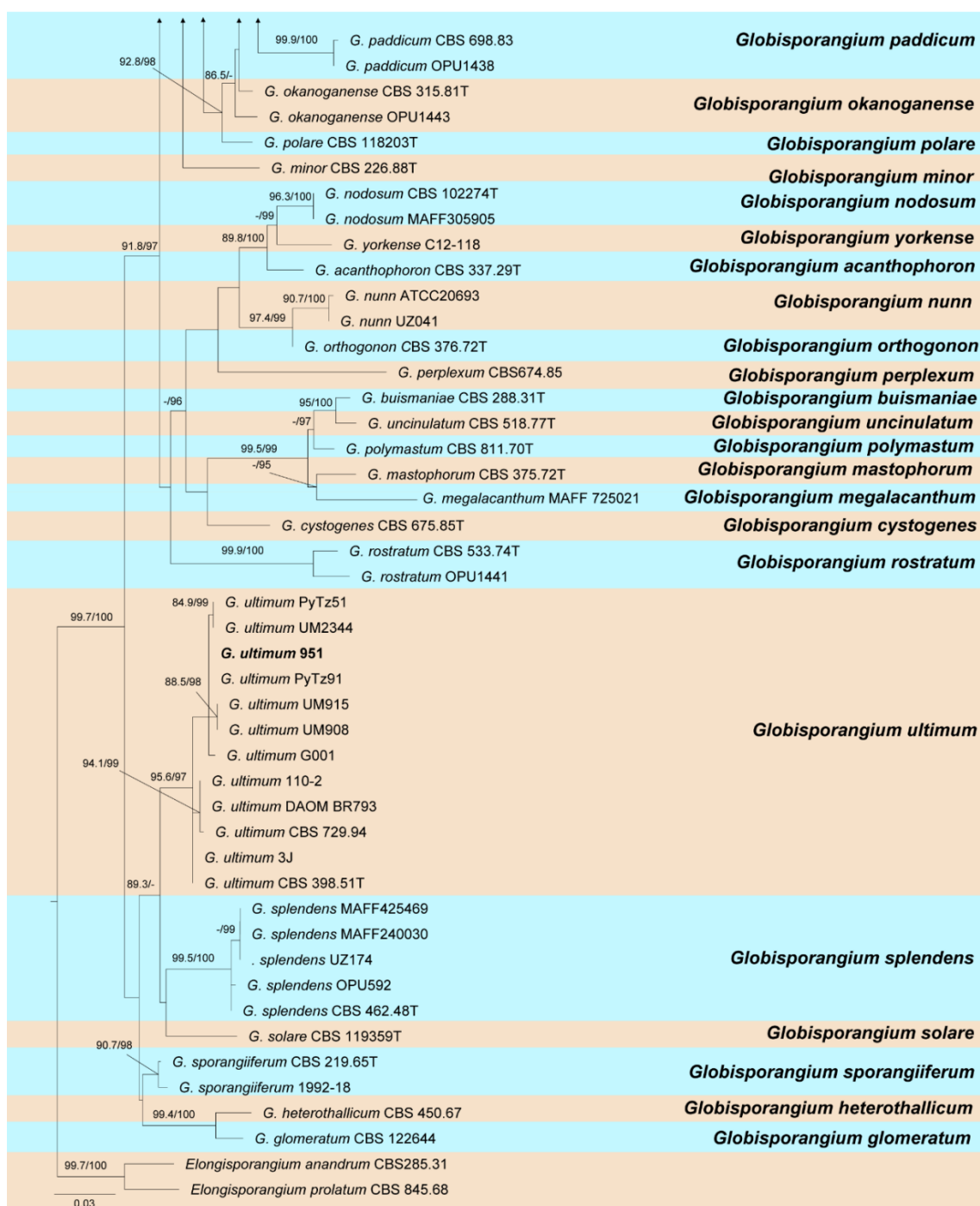
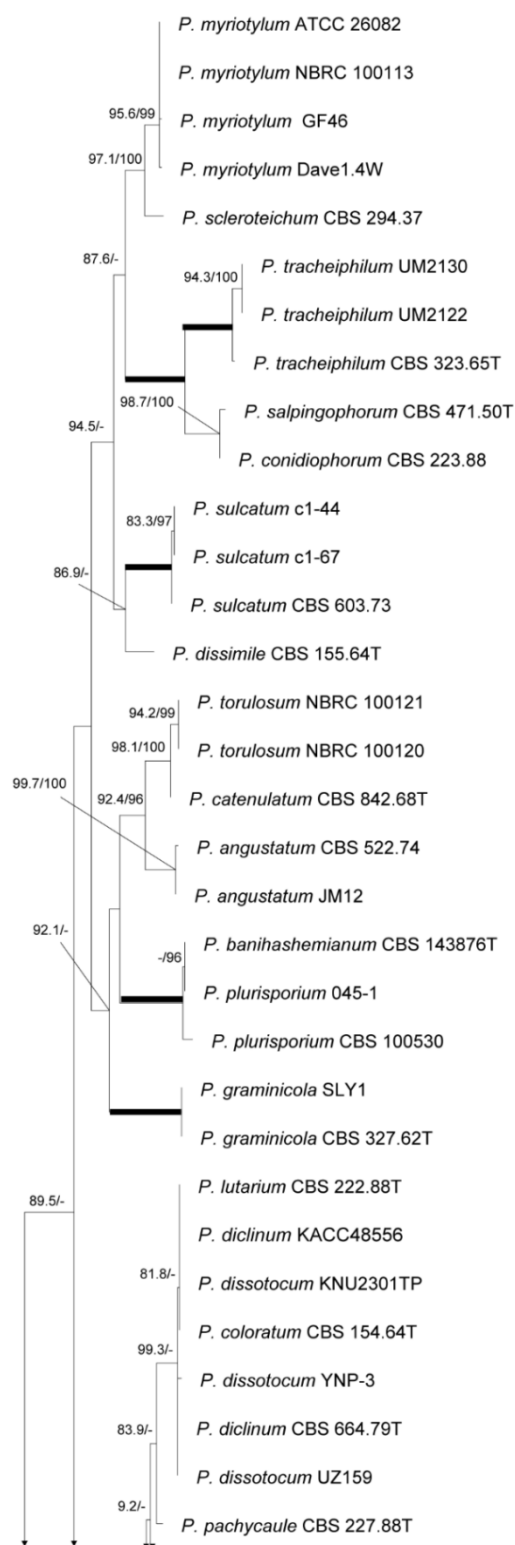


Figura 2. Árvore de máxima verossimilhança das espécies de *Globisporangium* obtidos de rúcula baseada na região Cox II. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

Na árvore filogenética da região ITS, o isolado PYT 938, com um valor de *bootstrap* de 88,5, foi agrupado próximo aos isolados representativos de *P. delinense*, e o isolado PYT 971 junto ao isolado representativo de *P. oopapillum*, com um bootstrap de 99,9.



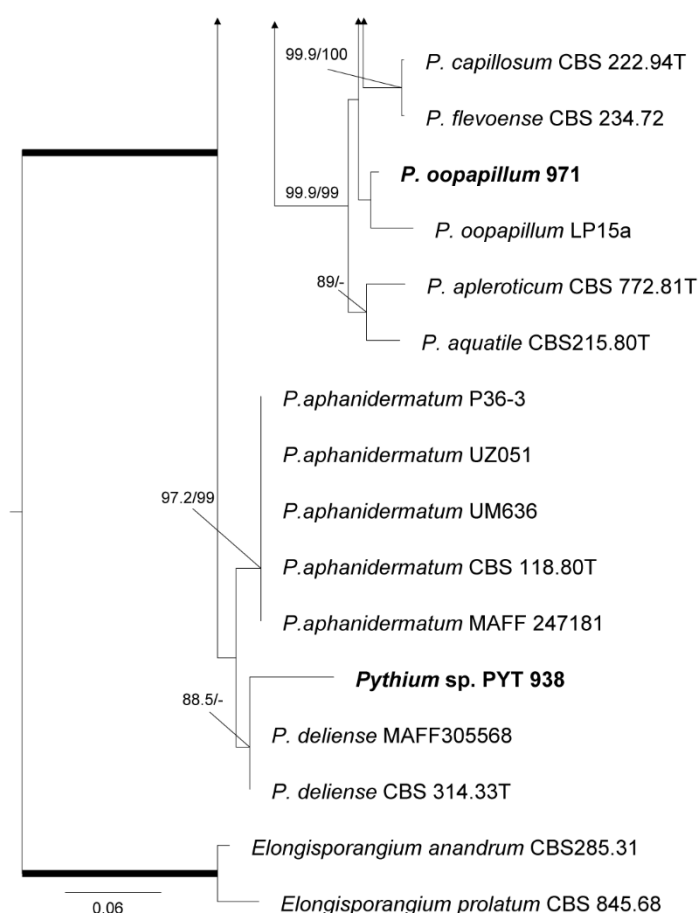
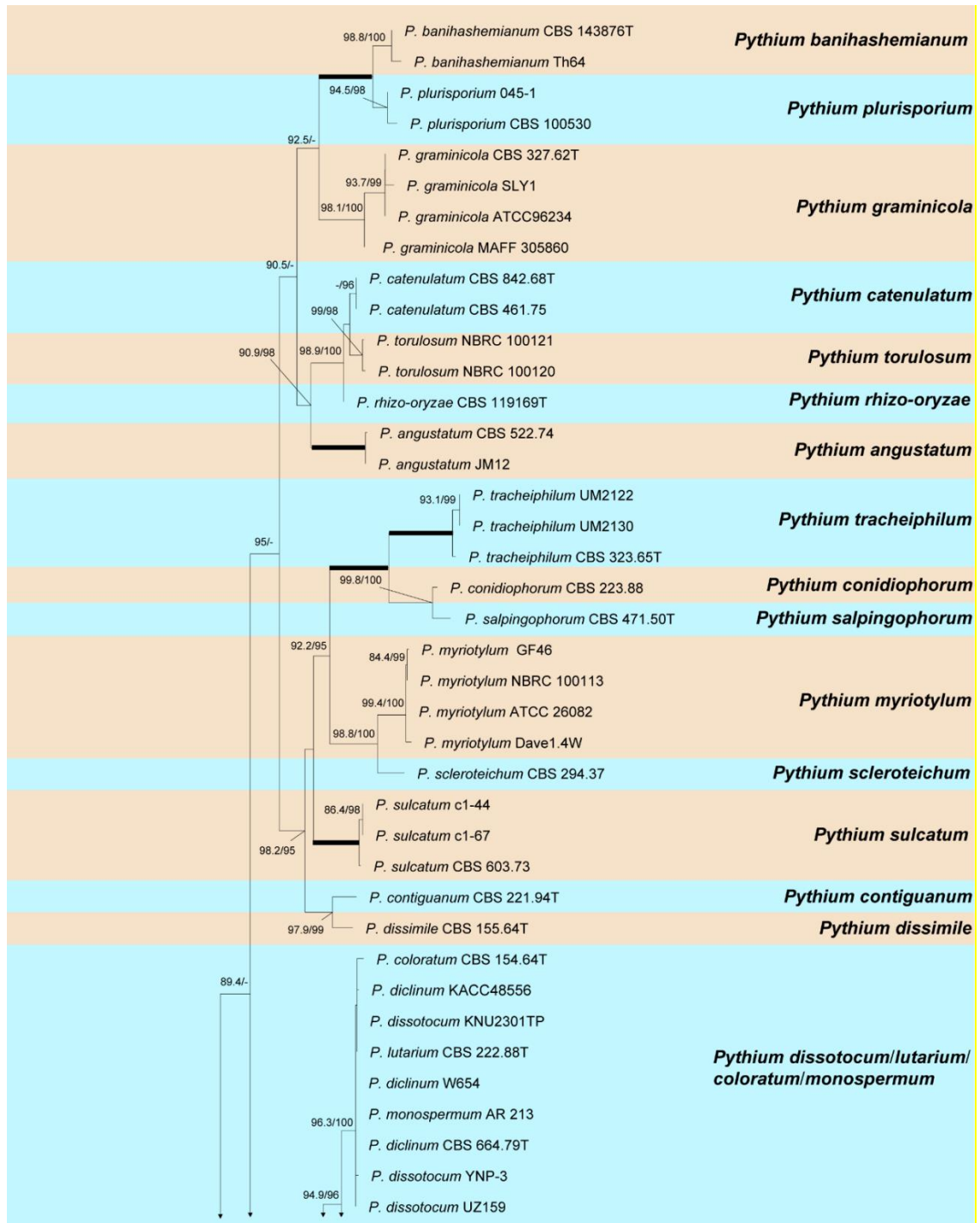


Figura 3. Árvore filogenética das espécies de *Pythium* ocorrendo em rúcula baseada na região ITS. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

A árvore filogenética concatenada das espécies de *Pythium* em rúcula baseada nas regiões Cox II e ITS (**Figura 4**) agrupou o isolado PYT 938, com um valor de bootstrap de 95,5, próximo aos isolados representativos de *P. deliense* e *P. aphanidermatum*, e o isolado PYT 971 junto ao isolado representativo de *P. oopapillum*, com um bootstrap de 86,3.



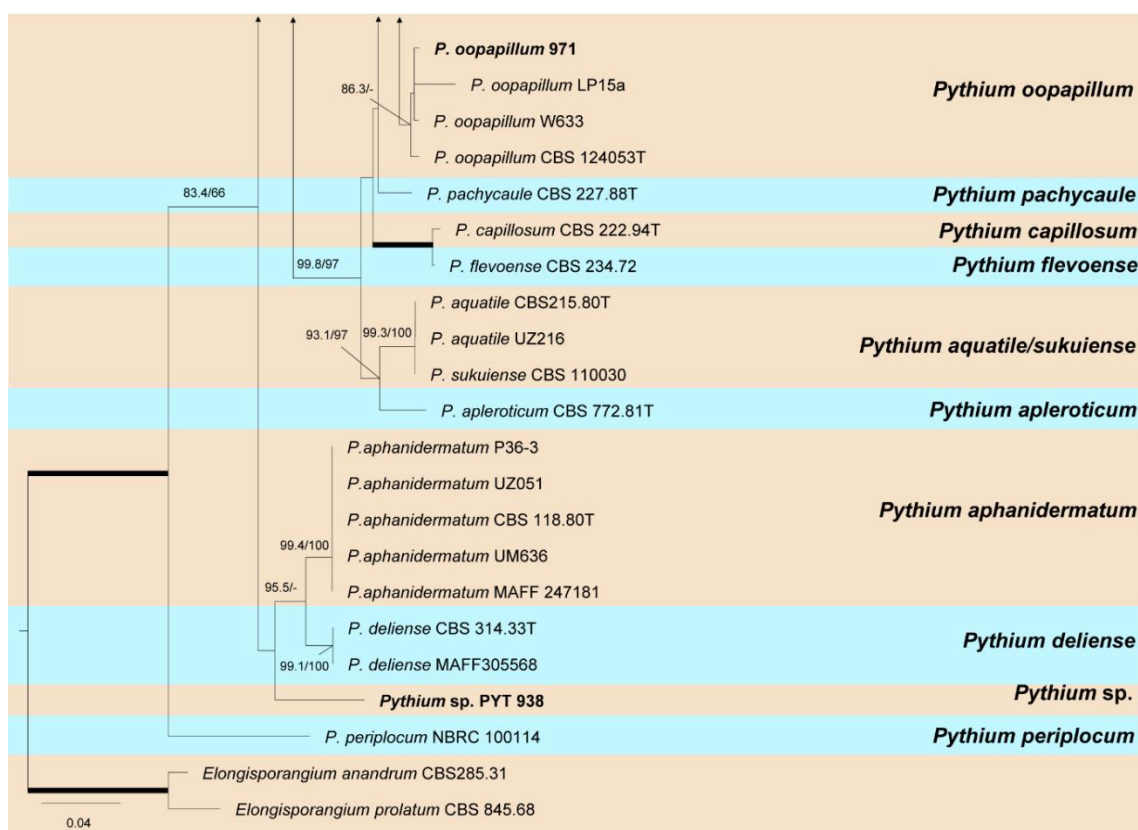


Figura 4. Árvore filogenética concatenada das espécies de *Pythium* em rúcula baseada nas regiões *Cox II* e *ITS*. Os números nos ramos representam valores de suporte estatístico: SH-aLRT (≥ 80) e UFboot (≥ 95). Ramificações em negrito indicam suporte total (SH-aLRT/UFboot = 100%). O símbolo “-” indica nenhum suporte significativo ou ausência do nó. Os isolados do presente estudo são mostrados em negrito. T indica ex-tipo. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

Discussão

O complexo *Pythium* engloba um conjunto de gêneros de oomicetos com várias espécies fitopatogênicas, que causam doenças em diversas plantas de relevância econômica, em condições de campo e em sistemas hidropônicos. Portanto, a identificação precisa das espécies presentes em um sistema de produção é essencial para implementar estratégias de manejo eficazes e prevenir danos causados pelas doenças.

A filogenia de sequências de *Cox II* e *ITS* agrupou os isolados PYT 939, PYT 968 e PYT 1018 nos mesmos clados inespecíficos, que englobam várias espécies, que provavelmente são iguais e precisam ser sinonimizadas. Por outro lado, as árvores de *Cox II* e *ITS* separadas agruparam o isolado PYT 938 próximo a *P. dissotocum*, enquanto a árvore das regiões concatenadas alocou este isolado próximo a *P. deliense*. Embora, a análise concatenada seja

mais robusta e possua uma capacidade melhor de inferir relações evolutivas de forma mais precisa, é necessário sequenciar outras regiões gênicas para identifica-los precisamente ao nível de espécie.

Em contrapartida, análise filogenética confirmou a presença de *P. oopapillum* (PYT 971, PYT 972 e PYT 986) e *G. ultimum* (PYT 951) em rúcula. O gênero *Globisporangium* é um táxon recentemente descrito, que foi separado de *Pythium* (Uzuhashi *et al.* 2010; Nguyen *et al.*, 2022). Portanto, a filogenia molecular, considerada essencial para a identificação de espécies em Oomycota, permite a identificação de espécies ao basear-se na evolução de genes específicos. Além disso, essa abordagem ajuda a esclarecer a classificação e delimitação de espécies dentro dos oomicetos, facilitando a identificação de novas linhagens e aprimorando a precisão das classificações taxonômicas (Lücking *et al.*, 2021).

A espécie *P. oopapillum* foi detectada em rúcula tanto no campo em Conchal (SP), quanto em sistema hidropônico em Tijucas (SC). Essa ocorrência em diferentes regiões geográficas e em diferentes sistemas de cultivo (campo e hidropônico) reforçam a alta adaptabilidade do patógeno e a necessidade de estratégias de manejo adequadas para diferentes ambientes de cultivo. Por outro lado, *G. ultimum* foi isolado no campo em Gama (DF), demonstrando que esse patógeno está presente em sistemas convencionais de cultivo no cerrado brasileiro. Portanto, a presença desses patógenos em diferentes estados e tipos de cultivo ressalta a importância de um monitoramento constante para prevenir perdas em culturas de rúcula e garantir a produtividade.

As espécies de *Pythium* apresentam uma ampla gama de plantas hospedeiras dentro da família Brassicaceae (**Quadro 1**) (USDA, 2024), refletindo sua adaptabilidade e distribuição global. A presença dessas espécies em países com grande produção agrícola, como China, Índia, Estados Unidos e Brasil, reforça a relevância do manejo eficaz desses patógenos para mitigar perdas econômicas significativas associadas às doenças nas culturas de Brassicaceae.

Quadro 1. Espécies de *Pythium* e seus respectivos hospedeiros na família Brassicaceae e seus locais de ocorrências.

Espécie de <i>Pythium</i>	Planta hospedeira	País de ocorrência
<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Brassica campestris</i> var. <i>toria</i>	Índia
	<i>Brassica chinensis</i>	China
	<i>Brassica juncea</i>	Índia
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Índia
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	China, Índia
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>caulorapa</i>	Índia
	<i>Brassica</i> sp.	China

<i>Pythium butleri</i>	<i>Brassica campestris</i> var. <i>toria</i>	Índia
	<i>Brassica chinensis</i> var. <i>chinensis</i>	Malásia
<i>Pythium catenulatum</i>	<i>Brassica</i> sp.	China
<i>Pythium coloratum</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	China, Nova Zelândia
<i>Pythium debaryanum</i>	<i>Brassica napus</i>	Polônia
	<i>Brassica oleracea</i>	Austrália, Brasil, Malaué, Polônia
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Nova Zelândia
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Canadá
<i>Pythium dissotocum</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Estados Unidos
<i>Pythium echinocarpum</i>	<i>Brassica campestris</i> subsp. <i>Pekinensis</i>	Coréia do Sul
<i>Pythium indigoferae</i>	<i>Brassica</i> sp.	China
<i>Pythium irregulare</i>	<i>Brassica napus</i>	Austrália
<i>Pythium jasmonium</i>	<i>Brassica napus</i>	África do Sul
<i>Pythium myriotylum</i>	<i>Brassica chinensis</i>	Taiwan
<i>Pythium oopapillum</i>	<i>Brassica napu</i>	Estados Unidos
<i>Pythium oligandrum</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	África do Sul
	<i>Brassica pekinensis</i>	China
<i>Pythium pachycaule</i>	<i>Brassica napus</i>	Estados Unidos
<i>Pythium paroecandrum</i>	<i>Brassica pekinensis</i>	China
<i>Pythium sylvaticum</i>	<i>Brassica napus</i>	Estados Unidos
<i>Pythium ultimum</i>	<i>Brassica campestris</i>	China

Este estudo confirmou a presença de *P. oopapillum* e *G. ultimum* em rúcula por meio de técnicas de identificação molecular, corroboradas pela análise filogenética. A detecção desses patógenos em múltiplos sistemas de cultivo, tanto em campo quanto em cultivos hidropônicos, e em diferentes regiões produtoras do Brasil, ressalta a ampla distribuição desses organismos. Esses achados destacam a importância de estratégias eficazes de monitoramento e manejo fitossanitário, que levem em consideração a diversidade de ambientes e a capacidade de adaptação dos patógenos. A identificação precisa dessas espécies é essencial para mitigar os impactos sobre a produção agrícola, proteger culturas economicamente relevantes e promover a sustentabilidade dos sistemas de cultivo.

Conclusões

A identificação precisa de patógenos do complexo *Pythium* é essencial para um manejo eficaz e para evitar danos às plantas de importância econômica, especialmente em culturas como a rúcula. Este estudo utilizou técnicas moleculares e análise filogenética para confirmar a presença de *Pythium oopapillum* e *Globisporangium ultimum* em diferentes sistemas de cultivo e regiões do Brasil, demonstrando a ampla distribuição e adaptabilidade desses patógenos.

Os resultados ressaltam a necessidade de monitoramento constante e de estratégias de manejo que considerem a diversidade dos patógenos e as variações ambientais. A identificação e o uso de cultivares resistentes são fundamentais para proteger a produção agrícola e garantir a sustentabilidade dos sistemas de cultivo.

Referências

- BELL, L.; ORUNA-CONCHA, M. J.; WAGSTAFF, C. Identification and quantification of glucosinolate and flavonol compounds in rocket salad (*Eruca sativa*, *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*) by LC–MS: Highlighting the potential for improving nutritional value of rocket crops. **Food Chemistry**, v. 172, p. 852–861, 2015.
- BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; SIMON, P. W. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, p. 32–38, 1999.
- CARIDDI, C.; MIACOLA, C.; PRIGIGALLO, M. I.; BUBICI, G. First report of cauliflower collar rot caused by *Globisporangium ultimum* in Italy. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, p. 540, 2017.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225–226, 1939.
- CONSELHO FEDERAL DE NUTRIÇÃO (CFN). **Rúcula**. Brasília, DF: CFN, 2024. Disponível em: <<https://shorturl.at/gO6X8>>. Acesso em: 17 ago. 2024.
- USDA. USDA Fungal Databases. Available online: <https://fungi.ars.usda.gov/>. Acessado em 21 de maio de 2024.
- FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, B. B. **Patógenos associados a hortaliças em cultivos hidropônicos no Estado do Ceará. Fortaleza-CE**: Embrapa, 2009. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/659065/1/cot140.pdf>>. Acesso em: 4 jul. 2024.
- GARG, G.; SHARMA, V. Assessment of fatty acid content and genetic diversity in *Eruca sativa* (L.) (Taramira) using ISSR markers. **Biomass and Bioenergy**, v. 76, p. 118–129, 2015.
- GARIBALDI, A.; TABONE, G.; GULLINO, M. L. First report of root rot caused by *Pythium oopapillum* on *Digitalis purpurea* in Italy. **Plant Disease**, v. 106, n. 4, p. 1309, 2022.
- GONÇALVES, D. R.; JESUS, A. L.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. *Pythium* and *Phytophthora* species associated with hydroponically grown crops around the city of São Paulo, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, p. 397–405, 2016.
- HUDSPETH, D. S. S.; NADLER, S. A.; HUDSPETH, M. E. S. A Cox 2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. **Mycologia**, v. 92, p. 674–684, 2000.

- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, p. 1647–1649, 2012.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870–1874, 2016.
- LATINOVIĆ, J.; LATINOVIĆ, N.; JAKŠE, J.; RADIŠEK, S. First report of white rust of rocket (*Eruca sativa*) caused by *Albugo candida* in Montenegro. **Plant Disease**, v. 103, p. 163, 2019.
- LÉVESQUE, C. A.; COCK, A. W. A. M. de. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, v. 108, p. 1363–1383, 2004.
- LI, M.; YSHIGURO, Y.; OTSUBO, K.; SUZUKI, H.; TSUJI, T.; MIYAKE, N.; NAGAI, H.; SUGA, H.; KAGEYAMA, K. Monitoring by real-time PCR of three water-borne zoosporic *Pythium* species in potted flower and tomato greenhouses under hydroponic culture systems. **European Journal of Plant Pathology**, v. 140, p. 229–242, 2014.
- LIMA, G. S.; SANTOS, K. M.; BARROS, A. P. O.; REIS, A.; MACHADO, A. R.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MICHEREFF, S. J. Diversity and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia* associated with brassicas in Brazil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 46, p. 275–287, 2024.
- LÜCKING, R.; AIME, M. C.; ROBBERTSE, B.; *et al.* Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. **Nature Microbiology**, v. 6, p. 540–548, 2021.
- MANGANIELLO, G.; PANE, C. First report of *Globisporangium ultimum* causing damping-off of wild rocket seedlings. **Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 721, 2021.
- MUSSI-DIAS, V. **Fitopatologia no estado do Rio de Janeiro: histórico, índice de doenças de plantas e 15 anos de atividades da Clínica Fitossanitária da UENF**. 2011. 283 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, 2011.
- NGUYEN, H. D. T.; DODGE, A.; DADEJ, K.; RINTOUL, T. L.; PONOMAREVA, E.; MARTIN, F. N.; DE COCK, A. W. A. M.; LÉVESQUE, C. A.; REDHEAD, S. A.; SPIES, C. F. J. Whole genome sequencing and phylogenomic analysis show support for the splitting of genus *Pythium*. **Mycologia**, v. 114, p. 501–515, 2022.
- REEVES, E. R.; KERNS, J. P.; SHEW, B. B. *Pythium* spp. associated with root rot and stunting of winter crops in North Carolina. **Plant Disease**, v. 105, p. 3433–3442, 2021.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S. *Alternaria* species infecting Brassicaceae in the Brazilian neotropics: Geographical distribution, host range and specificity. **J. Plant Pathol.** v. 92, p. 661–668, 2010.

REIS, A.; SOUZA, R. L. de; KÓR, D. G.; CANEDO, E. J.; LIMA, F. L. dos S. **Principais doenças das brássicas causadas por fungos, oomicetos e protozoários: identificação e manejo**. Circular Técnica, Embrapa, Brasília, DF, 2021.

ROBIDEAU, G. P.; DE COCK, A.; COFFEY, M. D.; VOGLMAYR, H.; BROUWER, H.; BALA, K.; CHITTY, D. W.; DÉSAULNIERS, N.; EGGERTSON, Q. A.; GACHON, C. M. M.; HU, C. H.; KÜPPER, F. C.; RINTOUL, T. L.; SARHAN, E.; VERSTAPPEN, E. C. P.; ZHANG, Y.; BONANTS, P. J. M.; RISTAINO, J. B.; LÉVESQUE, A. C. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 1002–1011, 2011.

SUTTON, J. C.; SOPHER, C. R.; OWEN-GOING, T. N.; LIU, W.; GRODZINSKI, B.; HALL, J. C.; BENCHIMOL, R. L. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 307–321, 2006.

UZUHASHI, S.; KAKISHIMA, M.; TOJO, M. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. **Mycoscience**, v. 51, n. 5, p. 337–365, 2010.

CAPÍTULO V

Characterization of *Pythium* isolates causing leaf rot of *Basella alba* in Brazil

SHORT COMUNICATION

Journal of Plant Pathology

Characterization of *Pythium* isolates causing leaf rot of *Basella alba* in Brazil

Éllen Júnia Canedo¹; Leonardo Silva Boiteux^{1,2}, Maria Esther de Noronha Fonseca², Nuno Rodrigo Madeira², Josiene Silva Veloso¹, Ruthe Lima de Souza¹, Ailton Reis^{1,2*}

¹Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife–PE,

²Embrapa Hortaliças (CNPq), Brasília–DF, Brazil.

*Corresponding author, e-mail: ailton.reis@embrapa.br, ORCID 0000-0002-5791-8002

ORCID

Éllen J. Canedo, <https://orcid.org/0000-0002-0311-4754>,

Leonardo S. Boiteux, <https://orcid.org/0000-0002-5791-8002>,

Maria Esther de N. Fonseca, <https://orcid.org/0000-0002-0180-5594>,

Josiene S. Veloso, <https://orcid.org/0000-0003-3903-6847>,

Ruthe L. Souza, <https://orcid.org/0000-0001-7926-6209>,

Abstract

Basella alba L. (Basellaceae family) belongs to a group of vegetable crops used in Brazilian regional cuisine. Herein, samples were collected from *B. alba* plants exhibiting symptoms of leaf rot in two fields in Central Brazil. Colonies with typical characteristics of *Pythium* species were obtained on PARP selective medium from the field-collected leaf lesions. PCR amplification and sequencing of the *Cox2* gene region were carried out aiming to refine the identification of the pathogen(s). Phylogenetic relationships among the isolates were assessed using reference isolates available on GenBank. Eight isolates were obtained from leaf lesions, with seven identified as *P. ultimum*, one as *P. aphanidermatum*. The genomic region encompassing the *Cox2* gene proved to be informative, enabling discrimination and identification of these *Pythium* species. Pathogenicity tests were carried under greenhouse conditions by inoculating *B. alba* leaves with mycelial discs of five *Pythium* isolates with and without injury. Detached *B. alba* leaves were also inoculated under laboratory conditions with the same five *Pythium* isolates. Lesion diameter was used for the evaluation of pathogenicity. *P. aphanidermatum* (Pyt 915 isolate) was the only statistically different from the rest of the the isolates ($p=0,05$) as it induced smaller lesions in assays without injury. Therefore, there are unequivocal evidences of the infection of *B. alba* by a complex of *Pythium* species, with *P. ultimum* var. *ultimum* being the most prevalent one. To our knowledge, it is the first worldwide report of *Pythium* species causing leaf rot in *B. alba*, which may have relevant epidemiological role as an additional host of these two polyphagous soil-borne pathogens.

Indian spinach (*Basella alba* L.) is a climbing plant belonging to the Basellaceae family native to the tropical regions of India and Southeast Asia (Kinupp & Lorenzi, 2014). Also called Malabar spinach, Ceylon spinach, bertalha, and kale, whose leaves are used for consumption in different ways in many parts of the world, including regional Brazilian cuisine (Yen et al., 2001; Kinupp & Lorenzi, 2017; Silva et al., 2022). Several pathogens have been reported causing diseases in *B. alba*. Among the main diseases highlights the *Cercospora* leaf spot (*Cercospora beticola*), *Acrothecium* leaf spot (*Acrothecium basellae*), *Alternaria* leaf spot (*Alternaria* species) (Mussi-Dias, 2011). In Amazonas, leaf rot caused by *Rhizoctonia* species was recorded in *B. alba* (Pereira & Coelho Netto, 2011). Nematodes of the genus *Meloidogyne* were also found to cause galls on *B. alba* roots in the state of Pará (Boari, 2016). Thus far, diseases induced by *Pythium* species had not been reported to this crop in Brazil.

In 2023, *B. alba* plants showing symptoms of leaf rot (**Figure 1**) in an experimental and a commercial field located in the Federal District, Central Brazil were observed. In order to identify the causal agent of the disease, infected leaves were collected in these fields and taken to the Phytopathology Laboratory of Embrapa Vegetables. Pieces of leaves with lesions were disinfested in 70% alcohol (0,5 min) and 0,5% sodium hypochlorite (1 min) and then placed in selective Pimaricin-Ampicillin-Rifampicin-Pentachloronitrobenzene (PARP) medium resulting in the growth of colonies with morphology characteristic of species of the *Pythium* genus.

The identification of the *Pythium* isolates was determined by sequencing the amplicons corresponding to the *Cox2* mitochondrial DNA (mtDNA) region. For this, the total DNA of the fungal isolates was extracted using a modified CTAB 2X (pH = 8.0) and chloroform/isoamyl alcohol protocol (Boiteux et al., 1999). Purified DNA was stored in microcentrifuge tubes with Tris–EDTA buffer (10-mM Tris and 0.5 mM EDTA solution) at –20 °C. DNA concentration was estimated with spectrophotometer Nanodrop (NanoDrop Lite, Thermo Scientific®, USA), while DNA integrity was evaluated through electrophoresis using 1.5% agarose gel. The *Cox2*-derived primers PF34 (5'–GGC AAA TGG GTT TTC AAG ATC C–3') and PF35 (5'–CCA TGA TTA ATA CCA CAA ATT TCA CTA–3') were employed in PCR assays as previously described (Hudspeth et al., 2000). The resulting sequences displayed identity levels to sequences of known *Pythium* species deposited in GenBank nucleotide database (www.ncbi.nlm.nih.gov). The sequences of the isolates were aligned with data from the *Cox2* gene of *Pythium* species obtained from reference mitochondrial genomes deposited in

GenBank, using the Geneious® 8.1.9 program (<https://www.geneious.com>). Phylogenetic analyses were performed using Maximum Likelihood and Bayesian inference (Ronquist *et al.*, 2012; Stamatakis, 2014).

Morphological observations were carried out with two contrasting isolates identified in the phylogenetic analysis as *P. aphenidermatum* (Pyt-915) and *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt-911). These isolates were cultivated in clarified V8 culture medium for seven days and then observed under a stereoscope microscope. Microscopic preparations were made on glass slides for observation under an optical microscope. The Pyt-915 isolate displayed sporangia with terminal complexes of swollen hyphal branches variable in length; oogonia terminal, globose, smooth, antheridia mostly intercalary, sometimes terminal, 1(-2) per oogonium, monoclinal or diclinal and oospores aplerotic, characteristic of *P. aphanidermatum*. On the other hand, the Pyt-913 isolate was devoid of sporangia and displayed terminal oogonia, sometimes intercalary, globose, smooth-walled; antheridia either 1(-3) per oogonium, sac-like, mostly monoclinal originating high below the oogonium, sometimes hypogynous, or 2-3 either monoclinal or diclinal and frequently straight; aplerotic oospores. These morphological characteristics correspond to those of *P. ultimum* var. *ultimum* (Van Der Plaats-Niterink, 1981).

Pathogenicity tests were carried out under greenhouse conditions by inoculating mycelial discs of five *Pythium* isolates (viz. Pyt-911, Pyt-913, Pyt-915, Pyt-917, and Pyt-922) on *B. alba* leaves with and without injury. Detached *B. alba* leaves were also inoculated under laboratory conditions with the same five *Pythium* isolates. Lesion diameter was employed as the evaluation criterion. In the greenhouse test, plants with at least four pairs of true leaves were selected. Discs of culture medium colonized from five *Pythium* isolates were placed separately under three conditions: leaves wounded with a sterile toothpick and mycelium disc, unwounded basal leaves with a disc, and wounded leaves without mycelium disc. As a control, plants with leaves wounded with a sterile toothpick and plants with unwounded leaves were included (**Figure 2**). Then, the plants were kept in a humid chamber (30 ± 2 °C) for one day and transferred to the greenhouse (28 ± 3 °C). The test was carried out twice conducted with four replications per treatment, arranged in a completely randomized design (DIC). In the laboratory assay, detached leaves were inoculated with agar disks colonized with the same five isolates. The inoculations followed two conditions: leaves wounded with a sterile toothpick with a mycelium disc and leaves without wounds only with a mycelium disc. As a control, leaves wounded with a sterile

toothpick and unwounded leaves were included (**Figure 3**) The evaluation of the inoculations was carried out by measuring the diameter of the lesions with a caliper. The test was performed in four replications per treatment in DIC, and the data were subjected to ANOVA analysis of variation followed by Tukey's test for the means.

Analysis of the sequences obtained from the *CoxII* region allowed the identification of seven isolates of *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt-910, Pyt-911, Pyt-912, Pyt-913, Pyt-914, Pyt-916, and Pyt-921) and one of *P. aphanidermatum* (Pyt-915 isolate). The phylogenetic tree obtained through analysis of the sequences of the isolates and sequences of reference isolates of *Pythium* from GenBank (**Figure 4**). In this study, we provide evidence about the pathogenicity of a complex of *Pythium* species implicated in leaf rot of *B. alba* with *P. ultimum* var. *ultimum* being the most prevalent one. To our knowledge, this is the first worldwide report of *Pythium* species causing the disease (Farr & Rossman, 2023) which may have relevant epidemiological role as an additional host of the polyphagous soil-borne pathogens *P. ultimum* and *P. aphanidermatum*.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare no potential conflict of interest.

CONSENT FOR PUBLICATION

All the authors have read and approved the manuscript for publication.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AR, LSB and EJC conceived the work. AR, EJC, NRM and RLS carried out the field surveys and lab work. JSV, EJC and MENF performed the phylogenetic analysis. EJC, AR and LSB wrote the initial version of the manuscript. All authors reviewed the manuscript and agree with the publication of the paper.

References

- BOITEUX, L. S., FONSECA, M. E. N., & SIMON, P. W. (1999). Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of American Society for Horticultural Science*, 124: 32–38.
- FARR, D.F., ROSSMAN, A.Y. (2023). Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA, <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Accessed 18 february 2023.
- HUDSPETH, DSS; NADLER, SA; HUDSPETH, MES. 2000. A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia*, 92:674-684.
- KINUPP, V.F., LORENZI, H. Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil. Reimpressão, São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2017.
- LORENZI, H; KINUPP, VF. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014.
- MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F.; Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michhtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 21/8/2023.
- MUSSI-DIAS, V. Fitopatologia no estado do Rio de Janeiro: histórico, índice de doenças de plantas e 15 anos de atividades da Clínica Fitossanitária da UENF. 2011. 283f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2011.
- PEREIRA, G.R.S.; COELHO NETTO, R.A. Problemas fitossanitários em hortaliças não convencionais no Amazonas. In: Jornada de Iniciação Científica do INPA - PIBIC/CNPq, 2011, Manaus. Anais da XX Jornada de Iniciação Científica do INPA. Manaus, AM : Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2011. v. 20. 4p.
- RONQUIST, F. et al. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61:539-542.
- SILVA, A., DE JESUS SILVA, A., DE JESUS BENEVIDES, C.M.. (2022). Revisão sistemática sobre PANC no Brasil: aspectos nutricionais e medicinais. *Scientia: Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1):, 132-151.
- STAMATAKIS, A.. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30:1312-1313, 2014.

Tojo, M.; Yonemoto, K; and Kawamura, A. (2007). First Report of *Pythium aphanidermatum* on *Basella rubra* in Japan. Plant Disease, v.90, n.3, 830-830.

VAN DER PLAATS-NITERINK J. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Studies in mycology, 21: 1-242.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y.; PENG, H.H. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. Food and Chemical Toxicology, [s.l.], v.39, n.11, p.1045-1053, Nov. 2001.



Figure 1. Field growing *Basella alba* plants displaying leaf rot symptoms, caused by a complex of *Pythium* species.



Figure 2. Pathogenicity test in *Basella alba* plants employing the Pyt 911 isolate (three days after inoculation under greenhouse conditions). **(A)** mock-inoculated control; **(B)** leaves with a colonized agar disk and without injuries; **(C)** leaves with the colonized agar disk and wound with a sterile toothpick and **(D)** leaves with a sterile toothpick wound and no colonized agar disk.



Figure 3. Overview of the pathogenicity tests carried out with *Basella alba* leaves under laboratory conditions employing the Pyt 911 isolate (*Pythium ultimum* var. *ultimum*). **(A)** leaves inoculated with colonized agar discs; **(B)** leaves with a colonized agar discs (three days after inoculation); **(C)** leaves inoculated with colonized agar discs in association with wounds with a sterile toothpick; **(D)** leaves inoculated with colonized agar discs in association with wounds with a sterile toothpick (three days after inoculation); **(E)** control leaves wounded with sterile toothpick with no agar disc; **(F)** control leaves wounded with sterile toothpick without wounds and with no agar disc.

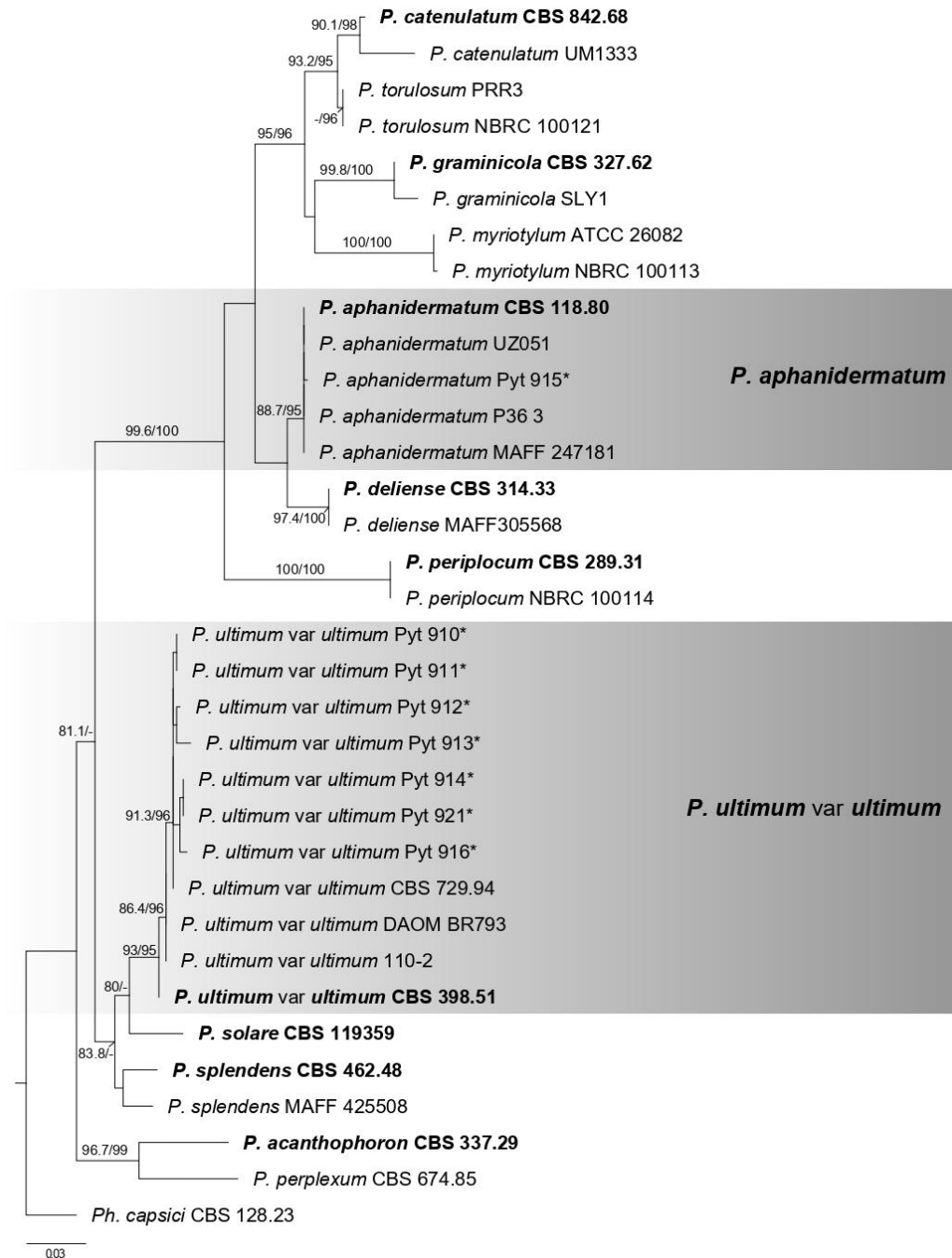


Figure 4. Maximum likelihood tree of *Phytophthora* isolates based upon DNA sequences of *Cox2* gene, with isolates obtained in the present study (initial code Pyt). Numbers at the branches indicate support values (SH-aLRT (≥ 80)/ UFboot (≥ 95) and Bayesian posterior probability values (PP ≥ 0.95). “-” indicates no-significant support or absence of the node. Ex-types are highlighted in bold. *Phytophthora capsici* (CBS 128.23) was used as the outgroup. The scale bar indicates the estimated number of substitutions per site.

Table 1. Leaf rot severity in *Basella alba* induced by five *Pythium* species isolates, in two inoculation assays.

Isolates	Lesion diameter (cm)			
	Laboratory		Greenhouse	
	With wound	Without wound	With wound	Without wound
Control	0.00a*	0.00 a	0.00a	0.00a
Pyt 911	3.75b	3.11b	3.00b	2.40b
Pyt 913	3.75b	3.67b	2.40b	3.19b
Pyt 915	3.25b	0.00a	3.21b	0.34a
Pyt 917	2.85b	2.50b	3.19b	1.66b
Pyt 922	3.96b	2.78b	3.53b	2.25b

*Means followed by equal letters do not differ within the conditions with and without injury using the Tukey test at 5% probability

CONCLUSÕES GERAIS

A análise molecular e filogenética de patógenos do complexo *Pythium* revelou uma diversidade significativa de espécies em culturas de importância econômica no Brasil, incluindo alface, coentro, rúcula e beralha.

Pythium tracheiphilum foi identificado como o patógeno mais prevalente em alface, com uma ampla distribuição em estados produtores, destacando a urgência em desenvolver variedades resistentes para mitigar os impactos significativos desses patógenos na produção agrícola.

Em coentro, a diversidade de patógenos dos gêneros *Pythium* e *Globisporangium* foi revelada, evidenciando a presença de novas espécies como distribuição de patógenos como *P. sulcatum*, *P. oopapillum* e *G. ultimum*, enfatiza a diversidade dos patógenos do complexo *Pythium* nesta cultura

Em rúcula, foram prevalentes os patógenos *Pythium oopapillum* e *Globisporangium ultimum*. Entretanto algumas cultivares de rúcula apresentaram resistência a *G. irregulare*, destacando o potencial de sucesso dos programas de melhoramento genético, visando resistência a estes patógenos.

Por fim, foi demonstrada a presença de *Pythium ultimum* var. *ultimum* (*G. ultimum*) e *P. aphanidermatum* causando podridão foliar em *Bassella alba*, um relato inédito, com potencial papel epidemiológico como hospedeiro adicional desses patógenos.

Em suma, a identificação precisa desses patógenos e o desenvolvimento de estratégias de controle são cruciais para proteger as culturas e garantir a sustentabilidade agrícola no Brasil.

MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELA SUPLEMENTAR 1. Cepas de *Globisporangium*, *Phytophthium* e *Pythium* usadas neste estudo e os números de acesso do GenBank.

Gênero	Espécie	Número da cepa	Número de acesso GenBank
			Cox II
<i>Elongisporangium</i>	<i>Elongisporangium prolatum</i>	CBS 845.68	AB362330
<i>Elongisporangium</i>	<i>Elongisporangium anandrum</i>	CBS 285.31	AB362328
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	CBS 398.51T	GU138663
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	CBS 729.94	KJ639191
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	110-2	AF196629
		DAOM	
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	BR793	KJ639182
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	3J	MT075865
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	PyTz91	OK309800
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	G001	OQ877095
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	PyTz51	OK309793
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	UM915	MW006657
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	UM908	MW006656
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium ultimum</i>	UM2344	OL332042
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium solare</i>	CBS:119359T	KJ595421
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium splendens</i>	CBS 462.48T	KJ639203
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium splendens</i>	UZ174	AB468903
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium splendens</i>	MAFF425469	AB796284
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium splendens</i>	OPU592	AB780564
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium splendens</i>	MAFF240030	AB796282
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium perplexum</i>	CBS 674.85	KJ595395
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium acanthophoron</i>	CBS 337.29T	KJ595376
		HMQAU2100	
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium sylvaticum</i>	92	OP375350
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium sylvaticum</i>	CP1903	OR463397
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium sylvaticum</i>	UM2192	OL332017
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium sylvaticum</i>	CBS 453.67T	KJ595383
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium sylvaticum</i>	STE-U6800	GU071754
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium spinosum</i>	CBS 275.67T	KJ595366
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium spinosum</i>	PPRI8604	GU071755
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium spinosum</i>	UZ150	AB468902
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium spinosum</i>	SQ00903-1	MN381730
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium sporangiiferum</i>	CBS 219.65 T	AF196641
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium sporangiiferum</i>	1992-18	AF196640
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium minor</i>	CBS 226.88T	AB362320
		DAOM	
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium attrantheridium</i>	230383	AB512886
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium attrantheridium</i>	CP1926	OR381467

<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium barbulae</i>	OPU1630	LC028397
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium barbulae</i>	OPU1629	LC028396
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium buismaniae</i>	CBS 288.31T	KJ595368
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium canariense</i>	CBS 112353T	JX397983
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cederbergense</i>	STE-U7553	JQ412804
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cederbergense</i>	STE-U7551	JQ412805
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cystogenes</i>	CBS 675.85T	KJ595396
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium intermedium</i>	CBS 266.38	AB507410
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium intermedium</i>	OL332035	UM2098
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium iwayamae</i>	CBS 156.64T	JX397979
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium mastophorum</i>	CBS 375.72T	KJ595378
		MAFF	
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium megalacanthum</i>	725021	AB517620
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium nodosum</i>	CBS 102274T	KJ595407
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium nodosum</i>	MAFF305905	DQ071399
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium nunn</i>	ATCC20693	DQ071388
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium nunn</i>	UZ041	AB468897
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium okanoganense</i>	CBS 315.81T	KJ595373
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium okanoganense</i>	OPU1443	AB468936
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium orthogonon</i>	CBS 376.72T	KJ595379
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium paddicum</i>	CBS 698.83	JX397982
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium paddicum</i>	OPU1438	AB468898
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium polare</i>	CBS 118203T	KJ595417
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium polymastum</i>	CBS 811.70T	KJ595403
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium rostratum</i>	CBS 533.74T	KJ595388
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium rostratum</i>	OPU1441	AB46890
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium uncinulatum</i>	CBS 518.77T	KJ595385
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium violae</i>	CBS 159.64T	JX397980
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium irregulare</i>	UM2087	OL332026
		COUFAL198	
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium irregulare</i>	6	KX869910
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium irregulare</i>	STE-U6760	GU071813
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium irregulare</i>	CBS250.28T	GU071760.1
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium irregulare</i>	UM472	MW006648.1
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium irregulare</i>	UM1087	MW006635.1
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium irregulare</i>	UZ370	AB468894.1_
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium irregulare</i>	UM2495	OL860935.1
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium irregulare</i>	TPSD	OM371061.1
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cylindrosporum</i>	CBS218.94T	GU071762
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cylindrosporum</i>	275	EU199107
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cryptoirregulare</i>	CBS118731T	GU071763
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cryptoirregulare</i>	13-22	AY907943
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cryptoirregulare</i>	42130-97	AY907944
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cryptoirregulare</i>	13-12	AY907942
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cryptoirregulare</i>	42144-99	AY907925
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cryptoirregulare</i>	325393	AY907926
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium cryptoirregulare</i>	P50	AY907918

<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium kunmingense</i>	CBS:550.88T	KJ595389
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium paroecandrum</i>	PPRI8611	GU071756
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium paroecandrum</i>	CBS157.64T	DQ071391
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium mamillatum</i>	CBS 251.28T	AB512918
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium mamillatum</i>	PPRI8609	GU071757
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium abappressorium</i>	CBS 110198	KJ595409
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium abappressorium</i>	712	MN103371
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium lucens</i>	CBS 113342	KJ595415
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium debaryanum</i>	CBS 752.96	KJ595399
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium debaryanum</i>	BPd3	OQ303604
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium heterothallicum</i>	CBS 450.67	AB512919
<i>Globisporangium</i>	<i>Globisporangium glomeratum</i>	CBS 122644	KJ595424
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium helicoides</i>	GD3	KT595689
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium helicoides</i>	CBS 286.31	AB690675
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium helicoides</i>	F2020814-2	OM350704
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium helicoides</i>	Jnyq1 NBRC	KT258907
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium kandeliae</i>	32620T USTCMS	MF397927
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium leanoi</i>	4102T	MF359560
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium leanoi</i>	CBS 113.91	MF397929
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium megacarpum</i>	CBS112351	AB690665
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium boreale</i>	CBS 551.88T	EF408876
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium boreale</i>	P41	MT720677
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium fagopyri</i>	CBS 293.35 CBS 137104	AB690671
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium iriomotense</i>	T CBS 118360	AB690689
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium litorale</i>	T	KJ595418
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium litorale</i>	GUCC 1072 IRAN 4017C	AB920502
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium longitubum</i>	T	MT720672
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium longitubum</i>	IRAN 4018C CBS 122443	MT720673
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium mercuriale</i>	T	AB690666
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium mercuriale</i>	SZ14S6 CBS 111349	AB920503
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium montanum</i>	T	AB690667
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium nanjigense</i>	Chen 218 T	MG788317
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium nanjigense</i>	Chen 216	MG788316
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium oedochilum</i>	CBS 292.37T	AB690676
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium ostracodes</i>	CBS 768.73	AB690668
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium ostracodes</i>	P121 CBS 124518	MT720684
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium sindhum</i>	T	KJ595436
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium vexans</i>	CBS 119.80	GU133518
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium vexans</i>	P133	MT720685

<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium chamaihyphon</i>	CBS 259.30T CBS 123040	AB690674
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium delawareense</i>	T	AB690672
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium delawareense</i>	382B CBS 119171	AB690672
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium citrinum</i>	T CBS 112544	AB690679
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium carbonicum</i>	T	AB690678
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium carbonicum</i>	P24 IRAN 4015C	MT720679
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium babaiaharii</i>	T	MT720670
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium babaiaharii</i>	IRAN 4016C CBS 137195	MT720671
<i>Phytopythium</i>	<i>Phytopythium aichiense</i>	T	AB948192
<i>Pythium</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	P36-3	AB095073
<i>Pythium</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	UZ051 MAFF	AB468890
<i>Pythium</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	247181	MW006653
<i>Pythium</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	CBS:118.80T	KJ595344
<i>Pythium</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	UM636	MW006653
<i>Pythium</i>	<i>Pythium deliense</i>	CBS:314.33T	KJ595372
<i>Pythium</i>	<i>Pythium deliense</i>	MAFF305568 NBRC	DQ071374
<i>Pythium</i>	<i>Pythium periplocum</i>	100114	DQ071392
<i>Pythium</i>	<i>Pythium myriotylum</i>	ATCC 26082 NBRC	AB095066
<i>Pythium</i>	<i>Pythium myriotylum</i>	100113	AB095071
<i>Pythium</i>	<i>Pythium myriotylum</i>	GF46	AB095070
<i>Pythium</i>	<i>Pythium myriotylum</i>	Dave1.4W	KX260351
<i>Pythium</i>	<i>Pythium graminicola</i>	SLY1	MW965276
<i>Pythium</i>	<i>Pythium graminicola</i>	CBS 327.62T	AF196593
<i>Pythium</i>	<i>Pythium graminicola</i>	ATCC96234 MAFF	AB160849
<i>Pythium</i>	<i>Pythium graminicola</i>	305860 NBRC	AB095064
<i>Pythium</i>	<i>Pythium torulosum</i>	100121 NBRC	AB160856
<i>Pythium</i>	<i>Pythium torulosum</i>	100120	AB160855
<i>Pythium</i>	<i>Pythium catenulatum</i>	CBS:842.68T	KJ595404
<i>Pythium</i>	<i>Pythium catenulatum</i>	CBS 461.75	AF196588
<i>Pythium</i>	<i>Pythium tracheiphilum</i>	CBS:323.65T	KJ595375
<i>Pythium</i>	<i>Pythium tracheiphilum</i>	UM2122	OL332004
<i>Pythium</i>	<i>Pythium tracheiphilum</i>	UM2130	OL332007
<i>Pythium</i>	<i>Pythium monospermum</i>	AR 213	DQ365765
<i>Pythium</i>	<i>Pythium dissotocum</i>	YNP-3	MG719859
<i>Pythium</i>	<i>Pythium dissotocum</i>	UZ159	AB468893
<i>Pythium</i>	<i>Pythium dissotocum</i>	KNU2301TP	OQ700848
<i>Pythium</i>	<i>Pythium baniihashemianum</i>	CBS 143876T	KX228120

<i>Pythium</i>	<i>Pythium banhashemianum</i>	Th64	MK455863
<i>Pythium</i>	<i>Pythium plurisporium</i>	CBS:100530	KJ595405
<i>Pythium</i>	<i>Pythium plurisporium</i>	045-1	KX228123
<i>Pythium</i>	<i>Pythium oopapillum</i>	W633	MK425692
<i>Pythium</i>	<i>Pythium oopapillum</i>	LP15a	MT425982
<i>Pythium</i>	<i>Pythium oopapillum</i>	CBS:124053T	KJ595431
<i>Pythium</i>	<i>Pythium lutarium</i>	CBS:222.88T	KJ595359
<i>Pythium</i>	<i>Pythium diclinum</i>	W654	KJ595394
<i>Pythium</i>	<i>Pythium diclinum</i>	KACC48556	MK802178
<i>Pythium</i>	<i>Pythium diclinum</i>	CBS:664.79T	KJ595394
<i>Pythium</i>	<i>Pythium coloratum</i>	CBS:154.64T	KJ595346
<i>Pythium</i>	<i>Pythium pachycaule</i>	CBS:227.88T	KJ595362
<i>Pythium</i>	<i>Pythium apertoticum</i>	CBS:772.81T	KJ595400
<i>Pythium</i>	<i>Pythium aquatile</i>	CBS:215.80T	KJ595355
<i>Pythium</i>	<i>Pythium aquatile</i>	UZ216	AB468891
<i>Pythium</i>	<i>Pythium sukuiense</i>	CBS:110030T	KJ595408
<i>Pythium</i>	<i>Pythium capillosum</i>	CBS:222.94T	KJ595360
<i>Pythium</i>	<i>Pythium flevoense</i>	CBS:234.72	KJ595363
<i>Pythium</i>	<i>Pythium contiguanum</i>	CBS:221.94T	KJ595358
<i>Pythium</i>	<i>Pythium dissimile</i>	CBS:155.64T	KJ595347
<i>Pythium</i>	<i>Pythium salpingophorum</i>	CBS:471.50T	KJ595384
<i>Pythium</i>	<i>Pythium conidiophorum</i>	CBS:223.88	KJ595361
<i>Pythium</i>	<i>Pythium sulcatum</i>	CBS:603.73T	KJ595393
<i>Pythium</i>	<i>Pythium sulcatum</i>	c1-44	JQ734271
<i>Pythium</i>	<i>Pythium sulcatum</i>	c1-67	JQ734273
<i>Pythium</i>	<i>Pythium scleroteichum</i>	CBS:294.37	KJ595370
<i>Pythium</i>	<i>Pythium rhizo-oryzae</i>	CBS:119169T	KJ595420
<i>Pythium</i>	<i>Pythium angustatum</i>	CBS:522.74	KJ595387
<i>Pythium</i>	<i>Pythium angustatum</i>	JM12	MT458938