



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**DIVERSIDADE DE *Pythium* E *Phytophthium* ASSOCIADOS A
HORTALIÇAS E PLANTAS INVASORAS NO BRASIL,
SENSIBILIDADE DE ISOLADOS A MEFENOXAM E GAMA
DE HOSPEDEIRAS.**

ELENICE ALVES BARBOZA

**Brasília – DF
2020**

ELENICE ALVES BARBOZA

DIVERSIDADE DE *Pythium* E *Phytophthium* ASSOCIADOS A HORTALIÇAS E PLANTAS INVASORAS NO BRASIL, SENSIBILIDADE DE ISOLADOS A MEFENOXAM E GAMA DE HOSPEDEIRAS.

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

ORIENTADOR:

Dr. Ailton Reis, Ph.D.

BRASÍLIA

DISTRITO FEDERAL - BRASIL

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Barboza, Elenice Alves

Diversidade de *Pythium* e *Phytophythium* associados a hortaliças e plantas invasoras no Brasil, sensibilidade de isolados a mefenoxam e gama de hospedeiras. Orientação: Ailton Reis. Brasília, 2020.

116p.: il.

Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. controle químico. 2. filogenia. 3. marcadores moleculares 4. oomicetos e patogenicidade

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Barboza, E.A. 2020. Diversidade de *Pythium* e *Phytophythium* associados a hortaliças e plantas invasoras no Brasil, sensibilidade de isolados a mefenoxam e gama de hospedeiras. Brasília, Universidade de Brasília, Tese de Doutorado. 116p.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Elenice Alves Barboza

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Diversidade de *Pythium* e *F* hortaliças e plantas invasoras no Brasil, sensibilidade de isolados hospedeiras.

GRAU: DOUTOR ANO: 2020

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. Ao autor reservam-se os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta tese pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor

Dedico

Aos meus pais, Francisco Barboza e Francisca Alves e à minha tia Alzira, pelo carinho e incentivo durante todas as fases da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida, pela sabedoria e perseverança para superar os momentos difíceis.

Aos meus pais, Francisco e Francisca, pelo apoio e carinho dedicados durante toda minha vida. À minha querida tia Alzira pela compreensão, pelas palavras de amparo e conforto nas horas de angústia. E a todos os meus familiares que são a base da minha vida, por me encorajarem a continuar estudando e por compartilharem comigo cada passo dessa trajetória.

Ao meu orientador, Dr. Ailton Reis, pelos preciosos conselhos, pela confiança e pelos conhecimentos transmitidos que foram essenciais à conclusão desse trabalho.

Aos amigos Cléia Cabral e Maurício Rossato, pelo auxílio nas análises e por terem sido fundamentais na execução de cada etapa deste trabalho. Agradeço também pela amizade e por terem permanecido sempre ao meu lado nas horas de desânimo e estresse.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia, Geane, Carina, João, Luíz, Polyane, Luciane, Camila e Tadeu por tornarem a pós-graduação mais alegre, por dividirem comigo as horas de estudo e de tensão pré-provas e pela ajuda mútua durante todo o doutorado.

Aos colegas e amigos do sistema penitenciário que se tornaram uma família e que sempre apoiaram a conclusão deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos e pela paciência em sempre transmitir os conhecimentos da melhor forma possível.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Fitopatologia, Wagner, Luana, Fabiana e Josefa pela assistência durante todos esses meses, pela valiosa troca de experiência e pelos momentos agradáveis que tornaram essa jornada menos tediosa.

À FAPDF pelos recursos destinados ao desenvolvimento do projeto.

À Capes pela concessão da bolsa durante os primeiros anos deste trabalho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão da tese.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Dr. Ailton Reis, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal – FAPDF.

DIVERSIDADE DE *Pythium* E *Phytophthium* ASSOCIADOS A HORTALIÇAS E PLANTAS INVASORAS NO BRASIL, SENSIBILIDADE DE ISOLADOS A MEFENOXAM E GAMA DE HOSPEDEIRAS.

ELENICE ALVES BARBOZA

TESE APROVADA em 26/06/2020 por:

Professor, Dr. Danilo Batista Pinho (Universidade de Brasília)
Examinador interno

Pesquisadora, Dra. Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli (Instituto de Botânica)
Examinador externo

Pesquisador, Dr. Murillo Lobo Junior (Embrapa Arroz e Feijão)
Examinador externo

Pesquisador, Dr. Carlos Alberto Lopes (Embrapa Hortaliças)
Suplente

Pesquisador, Dr. Ailton Reis (Embrapa Hortaliças)
Orientador (Presidente)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2020**

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO GERAL.....	iv
GENERAL ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO GERAL.....	viii
REVISÃO DE LITERATURA	1
1. Cadeia produtiva de hortaliças no Brasil	1
2. Os gêneros <i>Pythium</i> e <i>Phytopythium</i>	2
3. Caracterização morfológica e molecular de espécies de <i>Pythium</i> e <i>Phytopythium</i>	5
4. Controle químico de espécies de <i>Pythium</i> e <i>Phytopythium</i>	7
5. Gama de hospedeiras de espécies de <i>Pythium</i> e <i>Phytopythium</i>	9
6. Plantas invasoras em áreas de produção de hortaliças.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
CAPÍTULO 1: IDENTIFICAÇÃO DE <i>Pythium</i> E <i>Phytopythium</i> OBTIDOS DE HORTALIÇAS NO BRASIL	19
RESUMO	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. Obtenção dos isolados de <i>Pythium</i> e <i>Phytopythium</i>	23
2.2. Caracterização molecular dos isolados.....	24
2.3. Análise filogenética.....	26
3. RESULTADOS	26
3.1. Caracterização molecular dos isolados.....	26
3.2. Análise filogenética.....	33
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CAPÍTULO 2: SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> A MEFENOXAM E GAMA DE HOSPEDEIRAS DE ISOLADOS DE <i>Pythium</i> E <i>Phytopythium</i> OBTIDOS DE HORTALIÇAS NO BRASIL	57
RESUMO	58
ABSTRACT.....	59
1. INTRODUÇÃO.....	60
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1. Avaliação da sensibilidade <i>in vitro</i> a mefenoxam.....	61
2.2. Determinação da gama de hospedeiras e teste de patogenicidade em casa de vegetação.....	62
3. RESULTADOS	64
3.1. Avaliação da sensibilidade <i>in vitro</i> a mefenoxam.....	64
3.2. Determinação da gama de hospedeiras e teste de patogenicidade em casa de vegetação.....	68
4. DISCUSSÃO.....	73
5. CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

CHAPTER 3: <i>Pythium</i> AND <i>Phytophthium</i> SPECIES ASSOCIATED WITH WEEDS COLLECTED IN VEGETABLE PRODUCTION FIELDS.....	83
ABSTRACT	84
1. INTRODUCTION	85
2. MATERIAL AND METHODS.....	87
2.1. Sampling of the weeds.....	87
2.2. Molecular characterization of the isolates	87
2.3. Phylogenetic analysis	88
2.4. Pathogenicity tests	89
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	89
3.1. Molecular characterization of the isolates	89
3.2. Phylogenetic analysis	92
3.3. Pathogenicity tests	97
4. REFERENCES	101
CONCLUSÕES GERAIS DA TESE	106
ANEXOS	108

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1: IDENTIFICAÇÃO DE *Pythium* E *Phytophthium* OBTIDOS DE HORTALIÇAS NO BRASIL

Tabela 1. Espécimes de *Pythium* e *Phytophthium* coletadas em olerícolas no Brasil, número de isolados em cada hospedeira e o local de coleta das amostras.....

30

CAPÍTULO 2: SENSIBILIDADE *IN VITRO* À MEFENOXAM E GAMA DE HOSPEDEIRAS DE ISOLADOS DE *Pythium* e *Phytophthium* OBTIDOS DE HORTALIÇAS NO BRASIL

Tabela 1. Porcentagem de plantas de hortaliças com sintomas pelo total de plantas inoculadas com isolados de *Pythium* e *Phytophthium*.....

70

CHAPTER 3: *Pythium* AND *Phytophthium* SPECIES ASSOCIATED WITH WEEDS COLLECTED IN VEGETABLE PRODUCTION FIELDS

Table 1. *Pythium* and *Phytophthium* isolates associated with weeds, hosts, collected month/year, origin, species and GenBank accession of the ITS and *Cox II*.....

91

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1: IDENTIFICAÇÃO DE *Pythium* E *Phytophythium* OBTIDOS DE HORTALIÇAS NO BRASIL

- Figura 1.** Distribuição geográfica e quantidade de isolados por estado. O número entre parênteses representa a quantidade de isolados para cada hospedeira..... 24
- Figura 2.** Número de isolados obtidos de cada espécie de *Pythium* e *Phytophythium* em áreas de produção de hortaliças. As cores representam as diferentes hospedeiras de origem dos isolados..... 32
- Figura 3.** Árvore filogenética da região ITS, com 173 isolados de *Pythium*, 111 coletados de hortaliças e 62 isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G+I escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. Um isolado de *Lagenidium giganteum*, acesso KJ716868, foi usado como *outgroup*. *Isolados-tipo da espécie..... 36
- Figura 4.** Árvore filogenética da região *Cox II*, com 69 isolados de *Pythium*, 29 coletados de hortaliças e 40 isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G+I escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. Um isolado de *Lagenidium giganteum*, acesso KJ595392, foi usado como *outgroup*. *Isolados-tipo da espécie..... 37
- Figura 5.** Árvore filogenética das regiões ITS e *Cox II*, com 69 isolados de *Pythium*, 29 coletados de hortaliças e 40 isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G+I escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. A espécie *Lagenidium giganteum* foi usada como *outgroup*. *Isolados-tipo da espécie..... 38
- Figura 6.** Árvore filogenética da região ITS, com 30 isolados de *Phytophythium* obtidos de hortaliças e isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G+I escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. Um isolado de *Pythium aphanidermatum*, acesso AY598622, usado como *outgroup*..... 40
- Figura 7.** Árvore filogenética da região *Cox II*, com 20 isolados de *Phytophythium* obtidos de hortaliças e isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G+I escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. Os isolados *Pythium aphanidermatum*, acesso KJ595344, e usado *Pythium pleroticum*, acesso AB362321, foram usados como *outgroup*..... 41
- Figura 8.** Árvore filogenética da região ITS e *Cox II*, com 17 isolados de *Phytophythium* obtidos de hortaliças e isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. A espécie *Pythium aphanidermatum* foi usada como *outgroup*. *Isolados-tipo da espécie..... 42

CAPÍTULO 2: SENSIBILIDADE *IN VITRO* À MEFENOXAM E GAMA DE HOSPEDEIRAS DE ISOLADOS DE *Pythium* E *Phytophythium* OBTIDOS DE HORTALIÇAS NO BRASIL

Figura 1. Crescimento micelial dos isolados de *P. aphanidermatum* (Pyt 480 a Pyt 613), *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 481 a Pyt 757) e *P. deliense* (Pyt 539 a Pyt 707) nas concentrações de 5, 10 e 100 g.mL⁻¹ de mefenoxam em meio de cultura comparados à testemunha sem fungicida (%). Valores representam as médias das repetições e dos dois experimentos. CV (%) = 7,98..... 65

Figura 2. Crescimento micelial dos isolados nas concentrações de 5, 10 e 100 g.mL⁻¹ de mefenoxam em meio de cultura comparados à testemunha sem fungicida (%). **A.** *P. splendens* (Pyt 504 a Pyt 708); *P. myriotylum* (Pyt 442 a Pyt 610); *P. tracheiphilum* (Pyt 623, Pyt 635 e Pyt 751); *P. sylvaticum* (Pyt 692); *P. spinosum* (Pyt 552) e *P. acanthophoron* (Pyt 690). **B.** Isolados de *Pythium* sp. e isolados de *Phytophythium*, *Phy. cucurbitacearum* (Pyt 585 e Pyt 594), *Phy. vexans* (Pyt 508 e Pyt 535) e *Phy. chamaeophyon* (Pyt 650). Valores representam as médias das repetições e dos dois experimentos. CV (%) = 7,25 e CV (%) = 9,28, respectivamente..... 67

Figura 3. Sintomas de tombamento e podridão no colo nas hospedeiras de origem inoculadas com isolados de *Pythium* e *Phytophythium*: **A-D.** Tomate (*Solanum lycopersicon*) inoculado com os isolados, **A.** *P. deliense* (Pyt 439) x cv. Santa Clara, **B.** *Pythium* sp. (Pyt 450) x cv. Santa Clara, **C.** *P. splendens* (Pyt 602) x cv. Santa Clara e **D.** *P. splendens* (Pyt 602) x cv. Viradoro; **E-G.** Batata (*Solanum tuberosum*) cv. Camila **E-F.** *P. aphanidermatum* (Pyt 645), **G.** *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 595); **H-I.** Rúcula (*Eruca vesicatoria*) cv. Rococó **H.** *Phy. chamaeophyon* (Pyt 650) e **I.** *P. aphanidermatum* (Pyt 483). **J.** Quiabo (*Abelmoschus esculentus*) x *P. splendens* (Pyt 504) **K.** Repolho (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) cv. União x *P. aphanidermatum* (Pyt 698); **L.** Melancia (*Citrulus lanatus*) Crimson Sweet x *P. aphanidermatum* (Pyt 633). **M.** Beterraba (*Beta vulgaris*) cv. Maravilha x *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 618). **N.** Salsa lisa (*Petroselinum crispum*) x *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 663). **O.** Mostarda (*Brassica juncea*) cv. Gisilba x *P. oopapillum* (Pyt 749). **P-Q.** Alface (*Lactuca sativa*) cv. Vanda **P.** *P. deliense* (Pyt 630) e **Q.** *P. tracheiphilum* (Pyt 635)..... 72

CHAPTER 3: *Pythium* AND *Phytophythium* SPECIES ASSOCIATED WITH WEEDS COLLECTED IN VEGETABLE PRODUCTION FIELDS

Figure 1. Maximum likelihood tree of the ITS region of 34 *Pythium* and *Phytophythium* isolates from weeds sampled vegetables fields in Brazil, and 50 reference isolates. Branching support was based on 1,000 bootstrap replicates. Model GTR+G chosen in MEGA X using Akaike Information Criterion. Accession KJ716868 of *Lagenidium giganteum* was included as the outgroup..... 95

Figure 2 Maximum likelihood tree of ITS and *Cox II* regions of 26 *Pythium* and *Phytophythium* isolates and 35 reference isolates. Branch support based on 1,000 bootstrap replicates. Model GTR+G+I chosen in MEGA X using Akaike information criterion. *Lagenidium giganteum* as outgroup..... 96

Figure 3. Damping-off, root and collar rot symptoms in weeds species inoculated with Brazilian *Pythium* isolates: **A-D.** *Galinsoga parviflora* **A.B.** *Pythium ultimum* var. *ultimum* (Pyt 656) and **C-D.** *Pythium aphanidermatum* (Pyt 660); **E-F.** *Solanum lycocarpum*, **E.** *Pythium aphanidermatum* (Pyt 607) and **F.** *Pythium myriotylum* (Pyt 612); **G-H.** *Sonchus oleraceus*, **G.** *Pythium aphanidermatum* (Pyt 804) and **H.** *Pythium aphanidermatum* (Pyt 657) **I-J.** *Bidens pilosa* x *Pythium aphanidermatum* (Pyt 807); **K.** *Amaranthus spinosus* x *Pythium aphanidermatum* (Pyt 806); **L.** *Amaranthus lividus* x *Pythium aphanidermatum* (Pyt 709)..... 99

BARBOZA, Elenice Alves. **Diversidade de *Pythium* e *Phytopythium* associados a hortaliças e plantas invasoras no Brasil, sensibilidade de isolados à mefenoxam e gama de hospedeiras.** 2020. 116p. Tese de Doutorado em Fitopatologia - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A produção de hortaliças representa um setor importante do agronegócio brasileiro. Apesar de ser um mercado altamente diversificado em termos de produtos, cerca de doze espécies de olerícolas representam mais de 80% do valor total gerado. A cadeia produtiva de hortaliças possui vários entraves ao aumento da produção em razão de adversidades climáticas, custo dos insumos e incidência de pragas e doenças. Diversos problemas fitossanitários ainda desafiam e limitam a produtividade de diversas culturas, merecendo destaque patógenos que sobrevivem no solo por longos períodos, que possuem ampla gama de hospedeiras, incluindo muitas plantas invasoras, e que são difíceis de controlar. Espécies dos gêneros *Pythium* e *Phytopythium* estão entre os patógenos mais comumente distribuídos no solo, sendo que a dificuldade de controle dessas espécies em hortaliças baseia-se na oferta reduzida de defensivos, elevado número de espécies patogênicas e o surgimento de populações resistentes aos ingredientes ativos utilizados. Dentre os principais fungicidas utilizados no controle de oomicetos merece destaque o mefenoxam, o qual é amplamente utilizado no mundo para diversas culturas. Apesar de ser considerado efetivo, populações de *Pythium* e *Phytopythium* resistentes ao mefenoxam já têm sido observadas, comprometendo assim o controle em campo. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi identificar isolados de *Pythium* e *Phytopythium* obtidos de plantas olerícolas e invasoras provenientes de diversas regiões produtoras de hortaliças do Brasil, avaliar a sensibilidade ao fungicida mefenoxam *in vitro* e determinar a gama de hospedeiras entre diversas espécies olerícolas. Para a identificação inicial dos isolados, o DNA genômico foi extraído para o sequenciamento das regiões ITS do rDNA e citocromo c oxidase II (*Cox II*). Em seguida, avaliou-se a sensibilidade *in vitro* ao fungicida mefenoxam nas concentrações de 5, 10 e 100 g.mL⁻¹ e a gama de hospedeiras dos isolados em 17 cultivares pertencentes a 14 culturas olerícolas diferentes. Por fim, foi realizado um levantamento de espécies de *Pythium* e *Phytopythium* associadas a plantas invasoras, com sintomas de tombamento ou podridão de raiz, em campos de produção de hortaliças no Brasil. Estas foram identificadas da mesma forma que os isolados obtidos de hortaliças. A comparação das sequências da região ITS de 127 isolados provenientes de 25 culturas olerícolas, resultou na identificação de 10 espécies de *Pythium* que atacam diferentes culturas, a saber: *P. acanthophoron*, *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. myriotylum*, *P. oopapillum*, *P. spinosum*, *P. splendens*, *P. sylvaticum*, *P. tracheiphilum* e *P. ultimum* var. *ultimum*, e três espécies de

Phytophythium, *Phy. chamaehyphon*, *Phy. cucurbitacearum* e *Phy. vexans*. Entre os 65 isolados testados para a sensibilidade *in vitro* a mefenoxam, apenas dois isolados de *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 481 e Pyt 553), possuem reação intermediária, com crescimento micelial maior que 50% em relação à testemunha na concentração de 10 g.mL⁻¹. Esses mesmos isolados tiveram crescimento reduzido na concentração de 100 g.mL⁻¹. Na avaliação das possíveis hospedeiras, as espécies com ampla gama de hospedeiras entre as cultivares avaliadas, foram: *P. myriotylum*, *P. deliense*, *P. aphanidermatum* e *P. ultimum* var. *ultimum*. O teste de patogenicidade em 17 cultivares comprova que *P. myriotylum*, *P. deliense* e *P. aphanidermatum* foram capazes de causar doença em dez, nove e oito cultivares, respectivamente. Contrariamente, *Pythium sylvaticum* infecta somente o pimentão e *P. tracheiphilum* (Pyt 635) apenas alface. *Phytophythium cucurbitacearum* não causou doença nas culturas avaliadas. *Phytophythium chamaehyphon* foi reisolado de pimenta e rúcula, enquanto *Phy. vexans* causou podridão de cenoura, coentro e rúcula. As principais espécies de *Pythium* recuperadas de plantas invasoras foram *P. aphanidermatum* (doze isolados) e *P. ultimum* var. *ultimum* (oito isolados) de um total de 34 isolados. As espécies *P. myriotylum* (dois isolados), *P. sylvaticum*, *Phy. chamaehyphon* e *Phy. oedochilum* (um isolado de cada) também foram identificadas. Os resultados desse trabalho comprovam a diversidade de espécies de *Pythium* e *Phytophythium* associadas a hortaliças e plantas invasoras no Brasil, sendo *P. aphanidermatum* a espécie com maior prevalência e ampla distribuição entre as regiões produtoras. A utilização de mefenoxam é uma alternativa viável para o controle de espécies de *Pythium* e *Phytophythium* em áreas produtoras de hortaliças. Esses resultados ressaltam a importância da identificação precisa de oomicetos, determinação da gama de hospedeiros e sensibilidade a fungicidas dos isolados para recomendação de estratégias de manejo em cultivos de hortaliças.

Palavras-chave: controle químico, filogenia, marcadores moleculares, oomicetos, patogenicidade

Orientador: Dr. Ailton Reis - Embrapa Hortaliças

BARBOZA, Elenice Alves. **Diversity of *Pythium* and *Phytophthium* associated to vegetables and weeds in Brazil, sensitivity of isolates to mefenoxam and host range.** 2020. 116p. Thesis of Doctorate in Plant Pathology - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Vegetable crops represents an important sector of Brazilian agribusiness. Despite being a highly diversified market in terms of products, about twelve species of vegetables represent more than 80% of the total value generated. The vegetable production chain has several obstacles to increasing production due to climatic adversities, the cost of inputs and the incidence of pests and diseases. Several phytosanitary problems still challenge and limit the productivity of several crops, with emphasis on soilborne plant pathogens that survive in the area for long periods, have a wide host range, including many weeds, and are difficult to control. Species of *Pythium* and *Phytophthium* genus are among the pathogens most commonly distributed in the soil, and the difficulty in controlling these species in vegetables is based on the reduced supply of pesticides, high numbers of pathogenic species and the emergence of resistant populations to the active ingredients used. Among the main fungicides used in the control of oomycetes, mefenoxam deserves mention, which is widely used in the world for several cultures. Despite being considered effective, resistant *Pythium* and *Phytophthium* populations to mefenoxam have already been observed, compromising the control in the field. Thus, the aim of this work was to identify *Pythium* and *Phytophthium* isolates obtained from vegetable and weed from different vegetable producing regions of Brazil, to evaluate the sensitivity to the fungicide mefenoxam *in vitro* and to determine the host range among different vegetable species. For the initial identification of the isolates, genomic DNA was extracted for sequencing of ITS region of the rDNA and cytochrome oxidase II (*Cox II*). Then, evaluated the *in vitro* sensitivity to the fungicide mefenoxam at 5, 10 and 100 g.mL⁻¹ concentrations and the host range of some isolates in 17 cultivars belonging of 14 vegetable crops. Finally, a survey was carried out of *Pythium* and *Phytophthium* species associated with weeds with symptoms of damping-off or root rot obtained from vegetable production fields in Brazil. These were identified in the same way as the isolates obtained from vegetables. The sequences comparison of ITS region of 127 isolates from 25 vegetable crops, resulted in identification of 10 species of *Pythium* that attack different cultures, including: *P. acanthophoron*, *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. myriotylum*, *P. oopapillum*, *P. spinosum*, *P. splendens*, *P. sylvaticum*, *P. tracheiphilum* and *P. ultimum* var. *ultimum*, and three species of *Phytophthium*, *Phy. chamaehyphon*, *Phy. cucurbitacearum* and *Phy. vexans*. Among the 65 isolates tested for *in vitro* sensitivity to mefenoxam, only two *P. ultimum* var. *ultimum* isolates (Pyt 481 and Pyt

553), showed intermediate reaction, with mycelial growth higher than 50% in relation to the control in the 10 g.mL⁻¹ concentration. These same isolates have reduced colony diameter in the 100 g.mL⁻¹ concentration. The other isolates were sensitive to mefenoxam in the culture medium. In the evaluation of possible hosts, the species with widest range of hosts among the cultivars evaluated were: *P. myriotylum* (Pyt 604), *P. deliense* (Pyt 589), *P. aphanidermatum* (Pyt 586 and Pyt 600) and *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 502). The pathogenicity test in 17 cultivars prove that *P. myriotylum*, *P. deliense* and *P. aphanidermatum* caused disease in ten, nine and eight cultivars, respectively. Contrary, *Pythium sylvaticum* (Pyt 692) infected only peppers and *P. tracheiphilum* (Pyt 635) only lettuce. *Phytophythium cucurbitacearum* (Pyt 650) did not cause disease in any evaluated crop. *Phytophythium chamaehyphon* was reisolated from pepper and arugula, and *Phy. vexans* (Pyt 535) caused root rot in carrots, coriander and arugula. The main *Pythium* species recovered from weeds were *P. aphanidermatum* (twelve isolates) and *P. ultimum* var. *ultimum* (eight isolates) of a total of 34 isolates. *Pythium myriotylum* (two isolates), *P. sylvaticum*, *Phy. chamaehyphon* and *Phy. oedochilum* (one isolate from each) were also identified. The results of this work demonstrate that there is high diversity of *Pythium* and *Phytophythium* species associated with vegetables and weeds in Brazil, with *P. aphanidermatum* being the species with the highest prevalence and wide distribution among the producing regions. The use of mefenoxam is a viable alternative for *Pythium* spp. and *Phytophythium* spp. control in vegetable-producing areas. These results emphasize the importance of accurate identification of oomycetes, determination of the host range and sensitivity to fungicides of the isolates to recommend management strategies in vegetable crops.

Keywords: chemical control, phylogeny, molecular markers, oomycetes, pathogenicity

Guidance Committee: Dr. Ailton Reis - Embrapa Hortaliças (Advisor)

INTRODUÇÃO GERAL

A cadeia produtiva de hortaliças destaca-se como segmento no agronegócio brasileiro, movimentando cerca de 19 bilhões de reais por ano (CNA, 2017a). Em 2016, estimou-se que a produção alcançou cerca de 18 milhões de toneladas em uma área aproximada de 750 mil hectares (IBGE, 2018). Apesar de ser um mercado muito diversificado em quantidade de espécies cultivadas, os produtos que mais contribuem para o valor da produção é o tomate, a batata, a alface, a cebola, a cenoura, o repolho, o melão, o quiabo, o pimentão, a abobrinha, a abóbora e a melancia (CNA, 2017b).

Mesmo com o aumento da produtividade de hortaliças na última década, um dos grandes entraves continua sendo os problemas fitossanitários que acometem as principais culturas, principalmente aquelas com reduzida oferta de defensivos registrados. Entre esses, doenças causadas por patógenos de solo continuam sendo um desafio para os produtores em razão da dificuldade de métodos eficientes de controle após a infestação do solo. Diversos fitopatógenos importantes para a olericultura são encontrados no solo, como nematoides, bactérias, fungos e oomicetos. Este último grupo inclui espécies de *Phytophthora*, *Phytophthium* e *Pythium* que são adaptadas a ambientes terrestres e aquáticos. Esta característica os torna um problema em sistemas de produção de hortaliças que depende de grandes quantidades de água, em especial os sistemas hidropônicos onde as demais espécies de patógenos são geralmente menos favorecidas (Hong & Moorman, 2005; Schroeder *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2016).

Espécies dos gêneros *Pythium* e *Phytophthium* são consideradas importantes agentes etiológicos de doenças de plantas devido o grande número de hospedeiras, ampla distribuição geográfica, sobrevivência no solo por um longo período e rápido crescimento na presença da hospedeira. Espécies destes gêneros atacam geralmente tecidos jovens e são considerados parasitas facultativos, estando associados a podridões de sementes, tombamento de mudas, podridão radicular e podridão de tecidos vegetais em contato com o solo (Ho, 2018). Várias culturas olerícolas são afetadas, sofrendo perdas consideráveis tanto em casa de vegetação quanto em campo, já que as mudas são totalmente destruídas ou morrem logo após serem transplantadas em solos infestados. A severidade da doença depende muito de condições favoráveis, como solos compactados que permitem o acúmulo de água, excesso de irrigação, temperatura favorável, entre outros fatores (Schroeder *et al.*, 2013; Amorim *et al.*, 2018).

As perdas causadas por *Pythium* e *Phytophthium* podem ser reduzidas com implementação do manejo preventivo, como uso de mudas saudáveis, transplante mais tardio,

escolha de épocas e locais com condições desfavoráveis e uso de fungicidas (**Lamichhane et al., 2017**). Entre essas práticas de manejo, o controle químico tem sido utilizado no tratamento de sementes visando garantir a germinação e emergência da espécie de interesse. O principal entrave à utilização de fungicidas é a baixa disponibilidade de produtos registrados para controle de oomicetos em hortaliças (**AGROFIT, 2020**). O mais utilizado é o fungicida mefenoxam, que apresenta modo de ação sítio-específico, inibindo a polimerase do RNA ribossômico, característica que tem facilitado o surgimento de isolados resistentes (**FRAC, 2019**). Quando os isolados são resistentes, aplicações em campo não surtem efeito sobre as populações do patógeno, demonstrando que o conhecimento sobre a sensibilidade aos ingredientes ativos pode garantir o sucesso do controle químico e reduzir os custos.

O gênero *Pythium* engloba cerca de 140 espécies, cuja identificação das espécies é tradicionalmente baseada em características morfológicas, como formato do esporângio, características do oogônio, anterídio e oósporo (**van der Plaats-Niterink, 1981; Kageyama et al., 2014**). Em razão da sobreposição das características morfológicas em diferentes espécies, assim como dificuldade para a formação dessas estruturas em meio de cultura e necessidade de treinamento, a caracterização baseada apenas em critérios morfológicos tornou-se laboriosa. Sendo assim, marcadores moleculares passaram a ser uma ferramenta importante na separação de espécies, permitindo uma identificação mais rápida, precisa e confiável (**Cooke et al., 2000; Martin, 2000; Matsutomo et al., 2000; Levésque & de Cock, 2004; Villa et al., 2006; Robideau et al., 2011**). Apesar desse avanço, a taxonomia de *Pythium* ainda permanece um desafio. A natureza polifilética de *Pythium* resultou na reclassificação e proposição de novos gêneros e espécies (**Bala et al., 2010; Uzuhashi et al., 2010; de Cock et al., 2015**), demonstrando a necessidade de mais estudos visando a compreensão do gênero. Recentemente, a posição filogenética e as características morfológicas intermediárias entre *Pythium* e *Phytophthora* suportaram a mudança das espécies pertencentes ao clado K de **Lévesque & de Cock (2015)** para o gênero *Phytopythium* (**Bala et al., 2010; de Cock et al., 2015**). Este novo gênero passou a incluir 17 espécies, número que ao longo dos anos foi ampliado a partir de estudos sobre a diversidade, compreendendo atualmente cerca de 28 espécies (**Marano et al., 2014; Baten et al., 2015; de Cock et al., 2015; Bennett et al. 2017; Chen et al., 2019**).

No Brasil, as espécies de *Pythium* e *Phytopythium* e sua respectiva distribuição geográfica são pouco conhecidas (**Baptista et al., 2004; Milanez et al., 2007; Pereira, 2008; Maia & Carvalho, 2015; Rios & Rocha, 2018**). Acredita-se que aproximadamente 47 espécies já foram relatadas no país (**Maia & Carvalho, 2015; Gonçalves et al., 2016**), porém, pode existir uma diversidade muito maior de espécies associadas a perdas de produção em culturas

agrícolas. Dessa forma, o manejo correto depende do conhecimento do patógeno e a identificação em nível de espécie, sua distribuição geográfica e a biologia na região de interesse, sendo também mais fácil mensurar o potencial de perdas que determinadas espécies podem causar em condições específicas.

OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi identificar os isolados de *Pythium* e *Phytophthora* provenientes de diferentes regiões produtoras de hortaliças do Brasil, avaliar a sensibilidade ao fungicida mefenoxam *in vitro* e determinar a patogenicidade dos isolados em diferentes espécies olerícolas e invasoras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Identificar espécies de *Pythium* e *Phytophthora* associadas a hortaliças e plantas invasoras no Brasil por meio de marcadores moleculares;
- ✓ Determinar as espécies de *Pythium* e *Phytophthora* que predominam nos campos de produção de hortaliças e sua respectiva distribuição geográfica no país;
- ✓ Determinar a relação filogenética entre os isolados;
- ✓ Determinar a ocorrência de isolados sensíveis e resistentes ao fungicida mefenoxam;
- ✓ Definir a gama de hospedeiras das diferentes espécies de *Pythium* e *Phytophthora*.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Cadeia produtiva de hortaliças no Brasil

A Olericultura no Brasil representa uma atividade de grande importância social, econômica, industrial e alimentar (**Pereira & Pereira, 2016**). Esse setor é representado pelo cultivo de plantas que apresentam como características a consistência tenra e não lenhosa, ciclo biológico curto, intensa necessidade de tratamentos culturais, cultivo em áreas menores comparadas às grandes culturas e consumo que geralmente não exige processamento industrial (**Filgueira, 2007; CNA, 2017b**).

A característica mais marcante da exploração olerícola vem do fato desse segmento possuir uma alta diversidade e complexidade em razão das particularidades de cada espécie cultivada (**Melo & Vilela, 2007**). O ramo da olericultura abrange mais de uma centena de espécies cultivadas em todas as regiões do Brasil, apresentando uma grande segmentação do setor em razão da diversidade de produtos (**CNA, 2017a**). Para otimizar o estudo das culturas, algumas classificações das diferentes espécies segundo suas similaridades têm sido propostas. Um dos critérios é agrupar as culturas de acordo com o parentesco botânico, baseado em características mais estáveis. Em termos práticos, a classificação mais utilizada baseia-se na parte utilizada na alimentação e permite definir diferentes grupos (**Filgueira, 2007**):

- a) Hortaliças-fruto - a parte consumida são os frutos ou a parte deles, como as sementes. Exemplos de hortaliças nesse grupo são: tomate, melancia, quiabo, morango, feijão-vagem, entre outras.
- b) Hortaliças herbáceas - as partes comercializáveis e utilizáveis localizam-se acima do solo, sendo tenras e suculentas: folhosas (alface, repolho); talos e hastes (asparago, aipo); flores e inflorescências (couve-flor, brócolis).
- c) Hortaliças tuberosas - plantas cujas partes consumidas desenvolvem-se no solo, sendo ricas em carboidratos: raízes (cenoura, batata-doce, rabanete mandioquinha-salsa); tubérculos (batata, cara); rizomas (inhames); bulbos (alho e cebola).

Considerando a quantidade de produtos, a grande participação de médios e pequenos produtores e a descentralização nesse setor, é um desafio definir valores exatos de produção e área (**CNA, 2017a**). A área destinada à produção de culturas olerícolas sofreu variações nos últimos 10 anos, com redução aproximada de 1,5%, ainda assim a área em 2017, incluindo a

safrade verão 2017/2018, foi estimada em 752 mil ha (**Hortifruti/Cepea, 2018**). Apesar dessas variações negativas em área, o setor de hortaliças é um ramo do agronegócio que faturou em 2016 aproximadamente US\$ 19 bilhões, demonstrando seu importante papel na economia nacional (**CNA, 2017b**).

No Brasil, o principal estado produtor é São Paulo, que acumula 20% da produção de hortaliças. Os demais polos produtores se concentram no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais. Nas últimas décadas, houve uma expansão da produção para outras regiões com destaque para Rio Grande do Norte, Ceará, Vale do São Francisco, região de Irecê, Chapada Diamantina, Cristalina, norte de Minas Gerais e o Triângulo Mineiro (**Pereira & Pereira, 2016**).

Dentre as hortaliças, destacam-se pela participação no mercado brasileiro, tomate, batata, cebola, melancia, cenoura e alface. Apenas esses seis produtos representam cerca de 64% da quantidade total produzida (**Camargo Filho & Camargo, 2017**). A cadeia produtiva das hortaliças tem conquistado avanços consideráveis, porém, ainda existem desafios a serem superados: o estímulo ao aumento do consumo, a expansão da base técnico-científica, garantia de oferta de defensivos para culturas com suporte fitossanitário insuficiente (*minor crops*), redução de resíduos de agrotóxicos nos produtos e de perdas durante o cultivo e na pós-colheita (**CNA, 2017b**). A oferta de defensivos químicos registrados para olerícolas ainda é limitado, principalmente por ser uma atividade realizada por pequenos e médios produtores, o que reduz o interesse de multinacionais em desenvolverem e registrarem novas formulações para essas culturas.

Aliado a isso, a olericultura ainda é considerada uma atividade econômica de alto risco, em razão dos vários fatores limitantes, como sensibilidade às condições climáticas adversas, sazonalidade da oferta que gera instabilidade de preços na comercialização e diversos problemas fitossanitários que acometem as principais culturas (**Melo & Vilela, 2007; HORTIFRUTI/CEPEA, 2018**).

2. Os gêneros *Pythium* e *Phytophthium*

Os gêneros *Pythium* e *Phytophthium* pertencem ao Filo Oomycota que está inserido atualmente no Reino *Straminipila* (**Kirk et al., 2008; Beakes et al., 2014**). Até a década de 90, o Reino *Fungi* agrupava todos os organismos conhecidos como fungos, incluindo os oomicetos. Porém, o posicionamento filogenético e a condição polifilética das espécies, levaram à separação em três Reinos distintos: *Fungi*, *Straminipila* e *Protista*. Desta forma, os membros

da Classe *Oomycetes*, anteriormente conhecidos como fungos zoósporicos, ou *watermolds* (mofos aquáticos), foram transferidos do Reino *Fungi* e reclassificados dentro do Reino *Straminipila*, juntamente com algas marrons e diatomáceas (**Alexopoulos et al., 1996; Kirk et al., 2008; Fry & Grünwald, 2010**).

O Reino *Straminipila* engloba os Filos Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota e Oomycota, com as espécies fitopatogênicas incluídas principalmente no Filo Oomycota (**Beakes et al., 2014**). Dentro deste Filo, a classe Peronosporomycetes compreende a Ordem Albuginales, da qual faz parte espécies do gênero *Albugo*, agentes causais de ferrugens brancas em diversas espécies de plantas e que possuem comportamento biotrófico (**Choi & Biga, 1995**), e a Ordem Peronosporales s. lat. Esta última inclui a maioria das espécies fitopatogênicas que causam doenças popularmente conhecidas como míldios e aquelas pertencentes aos gêneros *Phytophthora*, *Phytophthium* e *Pythium* (**Amorim et al., 2018**).

Os oomicetos compartilham diversas características com os fungos verdadeiros, como: crescimento micelial, nutrição por absorção e reprodução por meio de esporos. No entanto, características estruturais e bioquímicas divergentes reforçaram essa reclassificação dos oomicetos em um Reino distinto, tais como: composição da parede celular, constituída de celulose e β glucanas, e não de quitina, componente principal da parede celular fúngica; presença de hifas asseptadas que formam um micélio cenocítico e cristas mitocondriais tubulares. Na reprodução assexuada são formados zoósporos diploides e biflagelados, com um flagelo liso e longo, do tipo chicote, e outro curto com mastigonemas (**Cavalier-Smith, 1998; Dick, 1990; Fry & Grünwald, 2010**).

O talo assimilativo se apresenta na condição diploide e a formação dos gametângios feminino e masculino, chamados oogônio e anterídio, respectivamente, ocorrem durante a reprodução sexual. A reprodução sexual inclui meiose gametangial, transformando os núcleos diploides em haploides (**Alexopoulos et al., 1996; Fry & Grünwald, 2010**). A plasmogamia ocorre com a passagem dos núcleos do anterídio para o interior do oogônio por meio de tubo de fertilização. Com o pareamento dos núcleos ocorre a cariogamia, originando o oósporo, esporo de repouso diploide. A maioria das espécies de *Pythium* é homotálica, ou seja, produzem órgãos sexuais a partir de culturas únicas, com exceção de *P. catenulatum* Mathews, *P. flevoense* van der Plaats-Niterink, *P. heterothallicum* Campbell & Hendrix, *P. intermedium* de Bary, *P. macrosporum* Vaartaja & van der Plaats-Niterink, *P. splendens* Braun e *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix (**Ho, 2018**).

Mais de 140 espécies de *Pythium* são reconhecidas, porém mais de 300 espécies foram propostas, muitas com a identidade ainda duvidosa de acordo com o MycoBank

(<http://www.mycobank.org>) (Kirk et al., 2008; Kageyama, 2014). O aumento no número de espécies descritas é atribuído ao aumento na variedade de ambientes em que são isoladas e ao desenvolvimento de métodos moleculares que ajudam a elucidar a relação filogenética entre essas (Kageyama, 2014).

Desde que o gênero *Pythium* foi descrito, várias mudanças taxonômicas já foram propostas (Pringsheim, 1858; Waterhouse, 1968). Inúmeras tentativas surgiram com a intenção de dividir o gênero, entre essas Uzuhashi et al. (2010) que propuseram dividi-lo em cinco gêneros baseado em filogenia: *Pythium sensu stricto*, *Ovatisporangium*, *Pilasporangium*, *Globisporangium* e *Elongisporangium*, refletindo o formato de esporângios filamentosos, ovoides com papila, globosos sem proliferação, globosos e alongados clavado, respectivamente. Da mesma forma, Bala et al. (2010) propôs um novo gênero, *Phytopythium* Abad, amplamente aceito pela comunidade científica devido às evidências filogenéticas. *Phytopythium* inclui espécies possuem morfologia considerada intermediária entre *Pythium* e *Phytophthora*. As espécies desse gênero possuem esporângios globosos, papilados (com exceção de *P. vexans*) e com proliferação interna como em *Phytophthora*. No entanto, o desenvolvimento e liberação dos zoósporos ocorre em uma vesícula externa ao zoosporângio, como em *Pythium* (van der Plaats-Niterink 1981; de Cock et al., 2015). A espécie *Phytopythium sindhum* A.M. Lodhi, Shahzad & Lévesque foi proposta como a espécie-tipo do gênero (Bala et al., 2010; de Cock et al., 2015; Jesus et al., 2016).

O gênero *Pythium* é considerado cosmopolita, estando amplamente distribuído em regiões temperadas ou tropicais, e assim como *Phytopythium*, habita ecossistemas aquáticos ou continentais. Ambos apresentam a capacidade de sobreviver de forma saprofítica ou parasitando plantas, animais, algas ou fungos (Nechwatal et al. 2008; Kageyama, 2014). As espécies de *Pythium* e *Phytopythium* fitopatogênicas podem sobreviver de forma saprofítica em restos culturais ou permanecer em dormência através dos oósporos ou clamidósporos na ausência da hospedeira (Baten et al., 2015). Quando as condições são favoráveis, o oósporo germina produzindo esporângios dos quais o citoplasma flui para formar uma vesícula, local em que os zoósporos serão diferenciados. Os zoósporos móveis possuem a habilidade de se deslocar em filmes de água entre as partículas de solo e são atraídos por exsudatos da hospedeira (Schroeder et al., 2013; Amorim et al., 2018).

Dentre as espécies que atacam plantas, existe uma variabilidade muito grande em relação à patogenicidade em diferentes culturas, assim como à sensibilidade a fungicidas (Moorman et al., 2002; Broders et al., 2007; Zitnick-Anderson & Nelson, 2015). Essas espécies são geneticamente diferentes e exibem variações em termos de patogenicidade, gama

de hospedeiras e distribuição geográfica até mesmo dentro de uma mesma espécie (**Spies et al., 2011**).

O controle de espécies de *Pythium* e *Phytopyhtium* em campos de produção de hortaliças é baseado principalmente em medidas preventivas, assim como para a maioria dos patógenos de solo. Outro fator agravante é a rápida dispersão em cultivos que adotam o sistema hidropônico de produção após a contaminação da água, resultando em perdas significativas (**Sutton et al., 2006; Gonçalves et al., 2016**).

3. Caracterização morfológica e molecular de espécies de *Pythium* e *Phytopyhtium*

A identificação e a taxonomia tradicional de *Pythium* se baseiam em uma gama de critérios morfológicos compilados em diversos trabalhos (**Mathews,1931; Sideris, 1932; Middleton, 1943; Waterhouse,1967; Dick, 1990**). A monografia de **van der Plaats-Niterink (1981)** é considerada a principal chave taxonômica do gênero, apresentando a descrição de 85 espécies diferentes. As principais características consideradas são a morfologia dos esporângios (filamentosos, inflados ou não, e sub-globosos, com ou sem proliferação), ornamentação da parede do oogônio (liso ou ornamentado), o preenchimento do oogônio pelo oósporo (plerótico = preenche totalmente, ou applerótico = preenche parcialmente), a origem e modo de ligação do anterídio com o oogônio (monoclino, díclino ou hipógino), e formação de espessamentos de hifas (**van der Plaats-Niterink 1981**). Este sistema de classificação foi útil para os fitopatologistas nas últimas décadas, entretanto começou-se a perceber que as características podem variar segundo as condições culturais e as características morfológicas de diferentes espécies poderiam se sobrepor. Além disso, determinadas espécies descritas até então eram, na verdade, um complexo de espécies (**Irwin, 1997**).

Os avanços na biologia molecular têm permitido um estudo mais racional das relações filogenéticas entre vários organismos. Entre as várias opções de marcadores genéticos que têm sido utilizados em filogenia de oomicetos está a região interna não codificada (ITS) do DNA ribossomal como uma das opções mais populares devido à alta variabilidade entre as espécies (**Irwin, 1997; Robideau et al., 2011**) e à disponibilidade de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) que podem ser usados na classificação de uma ampla gama de taxa (**White et al., 1990**). Estas regiões localizam-se entre as subunidades 18S e 28S. Outra região codificadora, o gene 5.8S, encontra-se entre o ITS1 e o ITS2. A análise de sequências destas regiões não

codificante tem sido largamente empregadas para compreender as relações filogenéticas entre espécies de *Pythium* (Lévesque & de Cook, 2004; Villa *et al.*, 2006; Uzuhashi *et al.*, 2010).

Apesar do largo uso das sequências de DNA ribossômico em estudos de filogenia, a evolução de um gene pode não representar adequadamente a evolução de todo o genoma. Dessa forma, é necessário amostrar separadamente quantos genes independentes forem necessários, uma vez que a escolha de diferentes genes independentes e a comparação das filogenias derivadas de cada um possibilita verificar se eles suportam ou contradizem um ao outro (Shen, 2001; Villa *et al.*, 2006). Por isso, genes que codificam para proteínas metabólicas ou estruturais tais como a citocromo oxidase I e II, o fator de translocação e alongação 1- α e a β -tubulina, tem recebido mais atenção ultimamente. Estes genes são conservados dentro de espécies e o alinhamento de suas sequências é menos ambíguo, comparado ao DNA ribossômico (Brunset *et al.*, 1991; Hyde *et al.*, 2014).

O gene da citocromo c oxidase subunidades I e II (*Cox*) codifica para uma enzima que catalisa o passo final na cadeia de transporte de elétrons. Assim, diferentemente da região ITS, ele é de herança mitocondrial e, portanto, geralmente é mais variável que o DNA nuclear. Ele tem se mostrado útil na exploração de relações entre organismos semelhantes, especialmente ao nível de taxa subgenéricos ou inferiores (Martin, 2000; Robideau *et al.*, 2011; de Cock *et al.*, 2015). Um outro gene que está crescendo em importância para estudos de caracterização e filogenia é o gene da β -tubulina. Este gene codifica para uma de duas famílias conservadas de tubulinas, os blocos constituintes dos microtúbulos que fazem parte da constituição do citoesqueleto, microtúbulos e flagelos das células eucarióticas. Este gene tem se mostrado útil na reconstrução da relação filogenética entre fungos e oomicetos em todos os níveis (Thon & Royse, 1999; Villa *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos sobre a filogenia molecular de *Pythium* foram baseadas em sequências das regiões 28S, ITS e *Cox II*. Mesmo utilizando poucas espécies, esses estudos foram capazes de indicar a natureza polifilética do gênero, onde os clados refletiam a morfologia dos zoosporângios ou dos espessamentos de hifas (hyphal swellings) (Cooke *et al.*, 2000; Martin, 2000). Analisando as relações evolutivas dentro do gênero *Pythium* a partir de sequências da região ITS e 28S, Levesque & de Cock (2004) dividiram o gênero em 11 clados que suportam as características morfológicas, sendo o clado K (inclui *Phy. vexans*) filogeneticamente mais distante dos clados contendo as demais espécies de *Pythium*. Villa *et al.* (2006) realizaram um estudo filogenético com espécies de *Pythium* e *Phytophthora* utilizando as regiões gênicas ITS, *Cox II* e β -tubulina. Os autores conseguiram distinguir quatro clados, sendo o clado K mais próximo ao clado contendo espécies de *Phytophthora* do que o

restante dos clados de *Pythium*. Esses clados foram condizentes, mais uma vez, com a morfologia dos esporângios: clado 1 composto por espécies de *Pythium* apresentando esporângios lobulados; clado 2 também composto por espécies de *Pythium*, porém com zoosporângios globosos, clado 3 abrangendo isolados de *Phytophthora* sendo que espécies papiladas, semipapiladas e não papiladas se agruparam em subclados diferentes; e clado 4 constituído de espécies de *Pythium* com esporângios subglobosos semelhantes aos esporângios papilados observados em *Phytophthora*, confirmando a natureza intermediária deste clado.

As espécies pertencentes ao clado K foram reclassificadas dentro do gênero *Phytopythium*, que passou a incluir 14 espécies segundo **de Cock et al. (2015)**, que descreveu uma nova espécie, *Phy. mirpurens*. Mais tarde, duas novas espécies, *Phy. aichiense* e *Phy. iriomotense*, foram adicionados ao gênero por **Baten et al. (2015)** e **Kirk (2015)** propôs a inclusão de *Phy. indigoferae*, *Phy. cucurbitacearum*, *Phy. megacarpum* e *Phy. sterile*. **Bennett et al. (2017)** descreveu as espécies *Phy. dogmae* e *Phy. leanoi* e recentemente, **Chen et al. (2019)** propôs uma nova espécie, *Phy. nanjingense*. Essas espécies foram inicialmente classificadas em três clados: Clado I, compreendendo a maioria das espécies (12 espécies conhecidas); Clado II composto por *Phy. chamaehyphon* Sideris e *Phy. helicoides* Drechsler e uma possível nova espécie e Clado III com *Phy. cucurbitacearum* S. Takim e *Phy. vexans* de Bary (**Baten et al., 2014; Gonçalves et al., 2016; Jesus et al., 2016; Bennett et al., 2017; Rai et al., 2020**).

4. Controle químico de espécies de *Pythium* e *Phytopythium*

O uso de defensivos químicos nos cultivos está diretamente associado à manutenção da sanidade da cultura e à garantia de produção, sendo uma ferramenta importante no controle de pragas e doenças (**Lamichhane et al., 2017**). Para a aplicação de defensivos nas culturas é necessário que os mesmos estejam registrados e regulamentados especificamente para a cultura alvo do produto. O maior desafio para hortaliças é a quantidade baixa de produtos registrados, o que reduz as alternativas para o produtor, fazendo que este tenha que utilizar intensivamente aqueles disponíveis ou induzindo-o ao uso de produtos sem registro (**AGROFIT, 2020**).

Da mesma forma, o controle de espécies de *Pythium* e *Phytopythium* é dificultado por essa limitação de fungicidas registrados, aliado à sobrevivência das espécies no solo que torna o controle ainda mais difícil. O controle químico desses oomicetos envolve o uso de diferentes fungicidas como mancozeb, carbendazim, metalaxil, azoxistrobina e fosetil-Al (**Poudyal, 2011; Weiland et al., 2014**). Dentre esses, o fungicida sistêmico metalaxil, que apresenta como

isômero mefexonam é o mais utilizado, sendo considerado o principal fungicida contra oomicetos em uma grande variedade de culturas. Esse fungicida pode ser utilizado no tratamento de sementes ou ainda por aplicação foliar, apresentando como modo de ação a inibição da polimerase do RNA ribossômico, impedindo assim a síntese proteica, característica dos fungicidas pertencentes ao grupo das fenilamidas (**Davidse et al., 1983; FRAC, 2019**).

Mesmo sendo considerado um fungicida altamente efetivo, aplicações repetitivas de metalaxil têm provocado o surgimento de populações resistentes, com o primeiro registro de resistência datado da década de 1980 (**Reuveni et al., 1980**). O primeiro relato de isolados de *Pythium* resistentes a metalaxil nos Estados Unidos foi realizado por **Sanders (1984)**, demonstrando que mais de 60% dos isolados de *P. aphanidermatum* foram resistentes ao fungicida e causaram doenças em pastagens e gramados. Vários mecanismos de resistência a fungicidas já foram relatados para diferentes espécies de fitopatógenos (**Gisi & Sierotzki, 2014**), mas acredita-se que dentro do grupo das fenilamidas, o qual pertence o metalaxil, a alteração do sítio-alvo é o principal mecanismo utilizado por oomicetos (**FRAC, 2019**).

A resistência a fenilamidas já foi relatado em várias espécies de *Pythium*, como *P. aphanidermatum* Edson (Fitz), *P. dissotocum* Drechsler, *P. heterothallicum* Campbell & Hendrix, *P. irregulare* Buisman, *P. cylindrosporum*, *P. splendens* Hans Braun, *P. torulosum* Coker & P.Patt. e *P. ultimum* Trow (**Sanders, 1984; Brantner & Windels, 1998; Moorman et al., 2002; Taylor et al., 2002; Weiland et al., 2014**), assim como em *Phytophythium* spp. (**Williams-Woodward & De Mott, 2014**). A pressão de seleção provocada pelo uso intensivo de mefenoxam é considerada a principal causa do surgimento de indivíduos que apresentam resistência nesses estudos. Segundo **Moorman et al. (2002)**, mais de 62% dos isolados de *P. aphanidermatum* e *P. irregulare* provenientes de plantas ornamentais sintomáticas foram resistentes ao mefenoxam. Da mesma forma, **Lookabaugh et al. (2015)** observaram mais de 52% de isolados com resistência à metalaxil. Em adição, a resistência ao mefenoxam (metalaxil-M) tem sido encontrada em isolados de *Pythium* provenientes de campos em que o uso de metalaxil foi ausente ou esporádico (**Brantner & Windels, 1998**).

Estudos em populações de *Pythium* já demonstraram que existe uma sensibilidade diferencial a este fungicida, com uma variabilidade considerável entre espécies assim como entre isolados de uma mesma espécie (**Cook & Zhang, 1985; Porter et al., 2009; Lookabaugh et al., 2015**). No Brasil, a sensibilidade de *Pythium* a fungicidas foi avaliada por **Yañez (2000)** que demonstrou a efetividade de metalaxil na inibição do crescimento micelial de doze isolados. No entanto, informações recentes sobre a ocorrência de resistência a fungicidas em espécies de *Pythium* e *Phytophythium* são desconhecidas, sendo esse dado

importante para caracterizar populações existentes em cultivos de hortaliças e subsidiar a aplicação de determinado fungicida.

5. Gama de hospedeiras de espécies de *Pythium* e *Phytophthium*

Espécies de *Pythium* e *Phytophthium* são consideradas patógenas oportunistas e saprófitas facultativos, atacando tecidos jovens e não diferenciados de plantas (Amorim *et al.*, 2018). No entanto, os danos causados em culturas de importância econômica, aliada à ampla gama de hospedeiras da maioria das espécies, torna importante a adoção de medidas de controle. As espécies de *Pythium* e *Phytophthium* prevalentes nos solos cultivados do Brasil são reconhecidamente polífagas, como é o caso de *P. myriotylum*, *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* e *Phy. vexans*, dificultando estratégias de controle baseadas em rotação de cultura (Trigiano *et al.*, 2004; Kageyama, 2014). Da mesma forma, *Pythium* spp. e *Phytophthium* spp. associados a hortaliças, frequentemente atacam diferentes famílias botânicas (van der Plaats-Niterink, 1981; Rai *et al.*, 2020). Em sistemas hidropônicos no estado de São Paulo, Gonçalves *et al.* (2016) detectaram sete espécies diferentes de *Pythium* (*P. oopapillum*, *P. kashmirensis*, *P. middletonii*, *P. periplocum* e *P. segnitium*) e duas de *Phytophthium* (*Phy. vexans* e *Phy. helicoides*), todas associadas a raízes de plantas de alface, salsa, rúcula e agrião. Em um estudo de levantamento de espécies de *Pythium* associadas a plantas ornamentais, Moorman *et al.* (2002) observaram a associação de *P. ultimum* a 23 diferentes culturas. Da mesma forma, Robertson (1976) ao testar a patogenicidade de isolados de *Pythium* obtidos de plantas com sintomas de *damping-off*, encontrou *P. ultimum* e *P. irregulare* como altamente agressivos à maioria das hospedeiras testadas, reduzindo de forma acentuada a sobrevivência de plântulas.

Poucas espécies de *Pythium*, entre elas *P. aristosporum*, *P. graminicola* e *P. arrhenomanes*, têm gama de hospedeiras restrita, sendo associadas principalmente a gramíneas (van der Plaats-Niterink, 1981). Da mesma forma, *Pythium zingiberis* tem o nome da espécie derivado de sua hospedeira, sugerindo que o ataque está limitado ao gengibre e plantas relacionadas (Le *et al.*, 2014). Em muitas situações, o surgimento de sintomas e a agressividade dessas espécies são influenciados por condições climáticas, o que pode determinar a importância de determinadas espécies em épocas e regiões geográficas específicas.

6. Plantas invasoras em áreas de produção de hortaliças

Plantas invasoras ou infestantes podem ser definidas como qualquer vegetal que cresce onde não é desejado (Lorenzi, 2014). As plantas invasoras apresentam características que favorecem sua persistência em diferentes áreas, como taxa de crescimento alta, grande capacidade reprodutiva e adaptativa, e ainda elevada capacidade de exploração de nutrientes do solo, podendo se desenvolver durante todos os meses do ano em climas tropicais e subtropicais (Braz *et al.*, 2016).

Diversas espécies de plantas invasoras são encontradas em campos de produção de hortaliças no Brasil, porém as principais famílias botânicas são Amaranthaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Poaceae e Solanaceae (Moreira & Bragança, 2011). A família Amaranthaceae compreende o gênero *Amaranthus* que engloba plantas conhecidas como caruru, encontradas em todo o território agrícola brasileiro, sendo utilizadas também na alimentação humana e animal (Lima *et al.*, 2019). A família Asteraceae inclui a maioria das espécies de plantas invasoras presentes em áreas agrícolas no Brasil, entre elas *Ageratum conyzoides* L., *Bidens pilosa* L., *Galinsoga parviflora* Cav., *Jaegeria hirta* (Lag.) Less. *Sonchus oleraceus* L. e *Tagetes minuta* L., entre outras. A família Portulacaceae engloba a espécie *Portulaca oleraceae* L., conhecida popularmente como beldroega. Dentro da família Solanaceae encontram-se as espécies *Solanum lycocarpum* L. e *Solanum americanum* Mill. (Lorenzi, 2014). Uma das características dessas espécies é que a maioria possui ciclo de vida curto, sendo caracterizadas como anuais assim como as hortaliças, apresentando também alta adaptação às condições climáticas.

Quando essas plantas crescem juntamente com culturas agrícolas, interferem no seu desenvolvimento, reduzindo a produção e competindo pela extração de elementos vitais (nutrientes, água, luz e CO₂). Podem ser prejudiciais também por inibirem o desenvolvimento e depreciar o produto de interesse (Carvalho *et al.*, 2013; Lorenzi, 2014). Além de todos esses efeitos deletérios, plantas invasoras interferem indiretamente em culturas agrícolas, atuando como hospedeiras alternativas de pragas e patógenos. A presença de plantas invasoras suscetíveis em áreas de cultivo interfere diretamente na epidemiologia de doenças causadas por fitopatógenos quando estas atuam como fonte de inóculo na ausência da hospedeira ou multiplicação de propágulos dos patógenos na área (Dissanayake *et al.*, 1997; Toda *et al.*, 2015; Ocimati *et al.*, 2018).

Plantas invasoras são descritas como hospedeiras de diversas espécies de fitopatógenos, como bactérias, vírus, nematoides, oomicetos e fungos (Black *et al.*, 1996;

Hollowell *et al.*, 2003; French-Monar *et al.*, 2006; Rich *et al.*, 2009; Barreto *et al.*, 2013; Araujo *et al.*, 2015). *Amaranthus* spp. e picão preto são conhecidas como hospedeiras de diversas espécies de *Pythium* (National Research Council, 1984; Kissmann & Groth, 1999; Lopez *et al.*, 2018). Adicionalmente, *Pythium irregulare* e *P. intermedium* foram relatadas em beldroega (Kalu *et al.*, 1976). Entre as espécies de *Phytophythium*, *Phy. boreale* e *Phy. litolare* já foram associadas a invasoras presentes em ecossistemas aquáticos, assim como *Phy. oedochilum* foi encontrado na rizosfera dessas plantas (Lodhi, 2020) Sendo assim, além dessas plantas apresentarem alto potencial competitivo e serem muito agressivas, servem como forma de sobrevivência e multiplicação de inóculo de espécies de *Pythium* e *Phytophythium* que posteriormente atacam as plantas cultivadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Consultado em 12/01/2020.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. 1996. Phylum Oomycota. Introductory Mycology. New York: John Wiley & Sons, 4th ed. p. 683-737.

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO, A. (eds). 2018. Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 5. ed. V.1 Ouro fino- MG: Agronômica Ceres. 573p.

ARAÚJO, E.R.; COSTA, J.R.; PONTES, N.C. & QUEZADO-DUVAL, A.M. 2015. *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in Brazilian tomato fields. European journal of plant pathology 143: 543-548.

BALA, K.; ROBIDEAU, G.P.; LEVÉSQUE, C.A.; DE COOK, A.W.A.M. & ABAD, Z.G. 2010. *Phytophythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhiand, Lévesque, gen. nov. and *Phytophythium sindhum* Lodhi, Shahzad and Lévesque, sp. nov. Persoonia 24: 136-137.

BAPTISTA, F.R.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.; ROCHA, M. & MILANEZ, A.I. 2004. O gênero *Pythium* Pringsheim de áreas de Cerrado no estado de São Paulo, Brasil. Brazilian Journal of Botany 27: 281-290.

BARRETO, S.S.; HALLWASS, M.; AQUINO, O. M. & INOUE-NAGATA, A.K. 2013. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato infecting Begomovirus in central Brazil. Phytopathology 103:436-444.

BATEN, M.A.; ASANO, T.; MOTOHASHI, K.; ISHIGURO, Y.; RAHMAN, M.Z.; INABA, S.; SUGA, H. & KAGEYAMA, K. 2014. Phylogenetic relationships among *Phytophythium* species, and re-evaluation of *Phytophythium fagopyri* comb. nov., recovered from damped-off buckwheat seedlings in Japan. Mycological Progress 13: 4.

- BATEN, M.A.; MINGZHU, L.; MOTOHASHI, K.; ISHIGURO, Y.; RAHMAN, M.Z.; SUGA, H. & KAGEYAMA, K. 2015. Two new species, *Phytopythium iriomotense* sp. nov. and *P. aichiense* sp. nov., isolated from river water and water purification sludge in Japan. *Mycological progress* 14: 2.
- BEAKES, G.W.; HONDA, D. & THINES, M. 2014. Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytridiomycota, and Oomycota. In: *Systematics and Evolution, The Mycota, VIII Part A*, D. J. Mc Laughlin and J. W. Spatafora (Eds.). 2 ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p.39-97.
- BENNETT, R.M.; NAM, B.; DEDELES, G.R. & THINES, M. 2017. *Phytopythium leanoi* sp. nov. and *Phytopythium dogmae* sp. nov., *Phytopythium* species associated with mangrove leaf litter from the Philippines. *Acta Mycologica*, 52 (2).
- BLACK, B.D.; PADGETT, G.B.; RUSSIN, J.S.; GRIFFIN, J.L.; SNOW, J.P. & BERGGREN JR, G.T. 1996. Potential weed hosts for *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, causal agent for soybean stem canker. *Plant Disease* 80:763-765.
- BRANTNER, J.R. & WINDELS, C.E. 1998. Variability in sensitivity to metalaxyl in vitro, pathogenicity, and control of *Pythium* spp. on sugar beet. *Plant Disease* 82:896-899.
- BRAZ, G.B.P.; OLIVEIRA, J.R.R.S.; CONSTANTIN, J.; RAIMONDI, R.T.; RIBEIRO L.M.; GEMELLI, A. & TAKANO, H.K. 2016. Plantas daninhas como hospedeiras alternativas para *Pratylenchus brachyurus*. *Summa Phytopathologica* 42: 233-238.
- BRODERS, K.D.; LIPPS, P.E.; PAUL, P.A. & DORRANCE, A.E. 2007. Characterization of *Pythium* spp. Associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. *Plant Disease* 91:727-735.
- BRUNS, T.D.; WHITE, T.J. & TAYLOR, J.W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review Ecology and Systematics* 22:525–564.
- CAMARGO FILHO, W.P. & CAMARGO, F.P. 2017. A produção e a comercialização mundial dos principais olerícolas. *Horticultura Brasileira* 35.
- CARVALHO, C.; KIST, B.B. & POLL, H. 2013. *Anuário brasileiro de hortaliças*. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 88 p.
- CARVALHO, L.B. 2013. *Plantas Daninhas*. 1. ed. Lages: Autor. 82p.
- CAVALIER-SMITH, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 73(3): 203–266.
- CHEN, J.J.; FENG, H.; WANG, Y.C. & ZHENG, X.B. 2019. *Phytopythium nanjingense* sp. nov. (Pythiaceae, Peronosporales) from southern China based on morphological and molecular characters. *Phytotaxa* 403: 239-247.
- CHOI, D. & PRIEST, M.J. 1995. A key to the genus *Albugo*. *Mycotaxon* 53:261–272.

CNA. 2017a. Hortaliças. http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/11_hortalicas.pdf. Consultado em: 02/01/2020.

CNA. 2017b. Mapeamento e quantificação da cadeia produtiva das hortaliças do Brasil. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil Brasília: CNA,79 p.

COOK, R.J. & ZHANG, B.X. 1985. Degrees of sensitivity to metalaxyl within the *Pythium* spp. Pathogenic to wheat in the Pacific Northwest. *Plant Disease* 69:686-688.

COOKE, D.E.L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J.M.; WAGELS, G. & BRASIER, C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetic Biology* 30:17–32.

DAVIDSE, L.C.; HOFFMAN, A.E. & VELTHUIS, G.C.M.1983. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nucleic from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Experimental Mycology* 7: 344–361.

DE COCK, A.W.; LODHI, A.M.; RINTOUL, T.L.; BALA, K.; ROBIDEAU, G.P.; ABAD, Z.G.; COFFEY, M.D.; SHAHZAD, S. & LÉVESQUE, C.A. 2015. *Phytophthora*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia - Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 34, 25–39.

DICK, M.W. 1990. *Keys to Pythium*. College of Estate Management, Whiteknights, Reading, UK.

DISSANAYAKE, N.; HOY, J.W. & GRIFFIN, J.L. 1997. Weed hosts of the sugarcane root rot pathogen, *Pythium arrhenomanes*. *Plant Disease* 81:587-591.

FILGUEIRA, F.A.R. 2007. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.3. ed. Viçosa: UFV. 421p.

FRAC INTERNACIONAL. 2019. FRAC Code List ©*2019: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019.pdf>. Consultado em: 11/01/2020.

FRENCH-MONAR, R.D.; JONES, J.B. & ROBERTS, P.D. 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. *Plant Disease* 90: 345-350.

FRY, W.E. & GRÜNWARD, N.J. 2010. Introduction to Oomycetes. *The Plant Health Instructor*.<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroOomycetes.aspx>. Consultado em: 15/05/2019.

GISI, U & SIEROTZKI, H. 2014. Mechanisms of resistance: Oomycete fungicides—Phenylamides, Quinone outside Inhibitors and Carboxylic Acid Amides. In: ISHI, H. & HOLLOMAN, D. W. 2015. Fungicide resistance in plant pathogens. Tokyo: Springer, doi, 10, 978-4.

- GONÇALVES, D.R.; JESUS, A.L. & PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2016. *Pythium* and *Phytophythium* species associated with hydroponically grown crops around the City of São Paulo, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 41:397–405.
- HO, H.H. 2018. The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. *Journal of Bacteriology & Mycology* 6: 00174.
- HOLLOWELL, J.E.; SHEW, B.B.; CUBETA, M.A. & WILCUT, J.W. 2003. Weed species as hosts of *Sclerotinia minor* in peanut fields. *Plant Disease* 87:197-199.
- HONG, C.X. & MOORMAN, G.W. 2005. Plant pathogens in irrigation water: challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 189-208.
- HORTIFRUTI/CEPEA. 2018. Anuário 2017 – 2018. <https://www.hfbrasil.org.br/br/hortifruti-cepea-area-total-das-hortalicas-deve-recuar-5.aspx>. Consultado em: 09/01/2020.
- HYDE, K.D.; NILSSON, R.H.; ALIAS, S.A.; ARIYAWANSA, H.A.; BLAIR, J.E.; CAI, L., ... & GORCZAK, M. 2014. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity* 67: 21-125.
- IBGE. 2018. Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro: IBGE v.1 (1974-).
- IRWIN, J.A.G. 1997. Biology and management of *Phytophthora* spp. Attacking field crops in Australia. *Australasian Plant Pathology* 26:207-216.
- JESUS, A.L. DE; GONÇALVES, D.R.; ROCHA, S.C.O.; MARANO, A.V.; JERÔNIMO, G.H.; SOUZA, J.I.D.; CASTILHO BORO, M. & PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2016. Morphological and Phylogenetic Analyses of Three *Phytophythium* Species (Peronosporales, Oomycota) from Brazil. *Cryptogamie, Mycologie* 37, 117–128.
- KAGEYAMA K. 2014. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. *Journal of General Plant Pathology* 80:314-326.
- KALU, N.N.; SUTTON, J.C. & VAARTAJA, O. 1976. *Pythium* spp. associated with root dieback of carrot in Ontario. *Canadian Journal of Plant Science* 56: 555-561.
- KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W. & STALPERS, J.A. 2008. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 10th ed. CAB International, Wallingford, UK.
- KIRK, P.M. 2015. *Pythium cucurbitacearum* (S. Takim), *Phytophythium indigoferae* (E.J. Butler), *Pythium megacarpum* (B. Paul), *Pythium sterile* (Belbahri & Lefort). *Index Fungorum* 280:1.<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=551750> . Consultado em: 04/07/2020.
- KISSMANN, K. G. & GROTH, D. 1999. Plantas infestantes e nocivas. 2.ed. São Paulo: BASF, Tomo II. 978 p.
- LAMICHHANE, J.R., DÜRR, C., SCHWANCK, A.A., ROBIN, M.H., SARTHOU, J.P., CELLIER, V., MESSÉAN, A. & AUBERTOT, J. N. 2017. Integrated management of damping-off diseases. A review. *Agronomy for sustainable development* 37: 10.

- LE, D.P.; AITKEN, E.A.B. & SMITH, M.K. 2014. Comparison of host range and pathogenicity of isolates of *Pythium myriotylum* and *Pythium zingiberis*. In: XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Live lihoods and Landscapes (IHC2014): 1105 p. 47-54.
- LÉVESQUE, C.A. & COCK, A.W.A.M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycological Research 108: 1363–1383.
- LIMA, L.F.; DE SOUZA, D.C.; XAVIER, J.B.; SAMARTINI, C.Q. & RESENDE, L.V. 2019. Avaliação nutricional de caruru (*Amaranthus* spp). Agrarian 12: 411-417.
- LODHI, A.M.; SHAHZAD, S. & SYED, R. N. 2020. The Genus *Phytopythium*. In: RAI, M.; ABD-ELSALAM, K.A. & INGLE, A.P. (Eds.). *Pythium: Diagnosis, Diseases and Management*, CRC Press.
- LOOKABAUGH, E.C. IVORS, K.L. & SHEW, B.B. 2015. Mefenoxam sensitivity, aggressiveness, and identification of *Pythium* species causing root rot on floriculture crops in North Carolina. Plant Disease. 99:1550-1558.
- LOPEZ, P.; SANAHUJA, G.; SUAREZ, S.N. & PALMATEER, A.J. 2018. First Report of *Pythium myriotylum* Causing Damping-Off of *Amaranthus tricolor* in Florida. Plant Disease 102: 828-828.
- LORENZI, H. 2014. Manual da Identificação e Controle de Plantas Daninhas. Plantarum, 7ed. 382p.
- LU, X.H.; MICHAEL DAVIS, R.; LIVINGSTON, S.; NUNEZ, J. & HAO, J.J. 2012. Fungicide sensitivity of *Pythium* spp. Associated with cavity spot of carrot in California and Michigan. Plant Disease. 96:711-727.
- MAIA, L.C. & CARVALHO, A.A. 2015. Fungos. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128475>. Consultado em: 03/03/2020.
- MARANO, A.V.; JESUS, A.L.; DE SOUZA, J.I.; LEÃÑO, E.M.; JAMES, T.Y.; JERÔNIMO, G.H.; DE COCK A.W.A.M. & PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. (2014). A new combination in *Phytopythium*: *P. kandeliae* (Oomycetes, Straminipila). Mycosphere 5: 510-522.
- MARTIN, F.N. 2000. Phylogenetic relationships of some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. Mycologia 92:711–727.
- MATHEWS, V.D. 1931. Studies on the Genus *Pythium*. Univ North Carolina Press, Chapel Hill, NC, USA.
- MATSUMOTO, C.; KAGEYAMA, K.; SUGA, H. & HYAKUMACHI, M. 2000. Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. Mycoscience 40:321–331.

- MELO, P.C.T. & VILELA, N.J. 2007. Importância da cadeia produtiva brasileira de hortaliças. http://www.abhorticultura.com.br/downloads/cadeia_produtiva.pdf. Consultado em: 05/05/2018.
- MIDDLETON, J.T. 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. Mem. Torrey Bot. Club 20(1): 1-171.
- MILANEZ, A.I.; PIRES-ZOTARELLI, C.L.A. & GOMES, A.L. 2007. Brazilian Zoosporic Fungi. São Paulo.
- MOORMAN, G.W.; KANG, S.; GEISER, D.M & KUM, S.H. 2002. Identification and characterization of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. Plant Disease. 86: 1227-1231.
- MOREIRA, H.J.C. & BRAGANÇA H.B.N.2011. Manual de identificação de plantas infestantes: Hortifruti. FMC Agricultural Products, São Paulo. 1017p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1984. Amaranth: modern prospects for an ancient crop. National Academy Press, Washington, DC.
- NECHWATAL, J.; WIELGOSS, A.& MENDGEN, K. 2008. Diversity, host and habitat specificity of oomycete communities in declining and stands (*Phragmites australis*) of a large fresh water lake. Mycological Research. 112:689–696.
- OCIMATI, W.; WERE, E.; GROOT, J.C.; TITTONELL, P.; NAKATO, G.V. & BLOMME, G. 2018. Risks posed by intercrops and weeds as alternative hosts to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* in banana fields. Frontiers in Plant Science, 9, 1471.
- PEREIRA, A.A. 2008. Oomicetos (Oomycota) no campo agrícola de Nazária, Piauí-Sustentabilidade na prevenção e controle dos fitopatógenos em agricultura familiar. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Piauí. Piauí.
- PEREIRA, I.S. & PEREIRA, M.T. 2016. Olericultura. / NT Editora. -- Brasília: 158p.
- PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2015. Pythiales in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB94877>.
- PRINGSHEIM, N. 1858. Beitragezur morphologie und systematic algae. Die Saprolegnieen. Jb Wiss Bot 1: 284-306.
- POUDYAL, B.K. 2011. The control of soft rot of ginger by jeevatu based organic liquid manure. Central Vegetable Seed Production Centre Khymaltar, Laliptur, Nepal.
- RAI, M.; ABD-ELSALAM, K.A. & INGLE, A.P. (Eds.). 2020. *Pythium*: Diagnosis, Diseases and Management. CRC Press.
- REUVENI, M.; EYAL, H. & COHEN, Y. 1980. Development of resistance to metalaxyl in *Pseudoperonospora cubensis*. Plant Disease 64: 1108–1109.

- RICH, J.R.; BRITO, J.A.; KAUR, R. & FERRELL, J.A. 2009. Weed species as hosts of *Meloidogyne*: a review. *Nematropica* 39: 157-185.
- RIOS, T.L. & DE SOUSA ROCHA, J.D.R. 2018. Potencial patogênico de espécies do complexo *Pythium* (Oomycota) para a agricultura familiar no estado do Piauí. *Pesquisas, Botânica* 71: 147-158.
- ROBERTSON, G.I. 1976. *Pythium* species in Market gardens and heir pathogenicity to fourteen vegetable crops, New Zealand. *Journal of Agricultural Research*, 19:1, 97-102.
- ROBIDEAU, G.P.; DE COCK, A.W.A.M.; COFFEY, M.D.; VOGLMAYR, H.; BROUWER, H.; BALA, K.; CHITTY, D.W.; DESAULNIERS, N.; EGGERTSON, Q.A.; GACHON, C.M.M.; HU, C.H.; KUPPER, F.C.; RINTOUL, T.L.; SARHAN, E.; VERSTAPPEN, E.C.P.; ZHANG, Y.; BONANTS, P.J.M.; RISTAINO, J.B. & LEVESQUE, C.A. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol Ecol Resour* 11:1002–1011.
- SANDERS, P.L. 1984. Failure of metalaxyl to control *Pythium* blight on turfgrass in Pennsylvania. *Plant Disease*. 68:776-777.
- SCHROEDER, K.L.; MARTIN, F.N.; DE COCK, A.W.; LÉVESQUE, C.A; SPIES, C.F.; OKUBARA, P.A. & PAULITZ, T.C. 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Disease* 97: 4-20.
- SHEN, Q.S. 2001 Molecular phylogenetic analysis of *Grifolia frondosa* (Maitake) and related species and the influence of selected nutrient supplements on mushroom yield. Doctoral dissertation. The Pennsylvania State University Graduate School. Pennsylvania, United States.
- SIDERIS, C.P. 1932. Taxonomic studies in the Family Pythiaceae. *Pythium*. *Mycologia* 24: 14-61.
- SPIES, C.F.; MAZZOLA, M.; BOTHA, W.J.; VAN DER RIJST, M.; MOSTERT, L. & MCLEOD, A. 2011. Oogonial biometry and phylogenetic analyses of the *Pythium vexans* species group from woody agricultural hosts in South Africa reveal distinct groups within this taxon. *Fungal Biology* 115: 157-168.
- SUTTON, J.C.; SOPHER, C.R.; OWEN-GOING, T.N.; LIU, W.; GRODZINSKI, B.; HALL, J.C. *et al.* 2006. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathol* 32:307–321.
- TAYLOR, R.; SALAS, B.; SECOR, G.; RIVERA, V. & GUDMESTAD, N. 2002. Sensitivity of North American isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefenoxam (metalaxyl). *Plant Disease* 86: 797-802.
- THON, M.R. & ROYSE, D.J. 1999. Partial beta-tubulin gene sequences for evolutionary studies in the basidiomycotina. *Mycologia* 91: 468-474.
- TRIGIANO, R.N.; WINDHAM, M.T. & WINDHAM, A.S. 2004. *Plant Pathology. Concepts and Laboratory Exercises*. Boca Raton, CRC.

- TODA, T.; IWASA, A.; FUJI, S. & FURUYA, H. 2015. Widespread occurrence of *Pythium arrhenomanes* pathogenic to rice seedlings around Japanese rice fields. *Plant Disease* 99: 1823-1831.
- UZUHASHI, S.; TOJO, M.; KOBAYASHI, S. & KAKISHIMA, M. 2009. *Pythium apinafurcum*: its morphology, molecular phylogeny, and infectivity for plants. *Mycoscience* 50:281–290
- VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Stud Mycol* 21:1-242.
- VILLA, N.O.; KAGEYAMA, K.; TAKAHIRO, A. & SUGA, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia* 93:410-422.
- WATERHOUSE, G.M. 1968. Proposal for the conservation of the generic name *Pythium* Pringsheim 1858 (Fungi – Oomycetes: Peronosporales) vs *Pythium* Nees von Esenbeck in Carus, 1823 (Fungi -Oomycetes: Saprolegniales). *Taxon* 17: 88-88.
- WATERHOUSE, G.M. 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. *Mycol Pap* 109: 1-15.
- WEILAND, J.E.; SANTAMARIA, L. & GRUNWALD, N.J. 2014. Sensitivity of *Pythium irregulare*, *P. sylvaticum*, and *P. ultimum* from forest nurseries to mefenoxam and fosetyl-Al, and control of *Pythium* damping-off with fungicide. *Plant Disease* 98:937-942.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press .315-322.
- WILLIAMS-WOODWARD, J.L. & DEMOTT, M.E. 2014. Fungicide resistance in *Pythium* and *Phytophthora* from ornamentals in Georgia. *Acta Horticulturae* 1055: 453–456.
- YAÑEZ, L.D.T. 2000. Identificação, patogenicidade e sensibilidade a produtos químicos in vitro de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- ZITNICK-ANDERSON, K.K. & NELSON, B.D. 2015. Identification and pathogenicity of *Pythium* on soybean in North Dakota. *Plant Disease* 99:31.38.

CAPÍTULO 1

IDENTIFICAÇÃO DE *Pythium* E *Phytophthium* OBTIDOS DE HORTALIÇAS NO BRASIL

RESUMO

Espécies de *Pythium* e *Phytopythium* são importantes agentes causais de doenças em uma variedade de culturas de importância econômica. A identificação precisa das espécies é imprescindível para diagnose correta da doença e a escolha de estratégias de manejo eficientes. Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar isolados de *Pythium* e *Phytopythium* provenientes de regiões produtoras de hortaliças, determinar a prevalência e a distribuição geográfica das espécies. Inicialmente, 25 espécies olerícolas com sintomas típicos de doenças causadas por *Pythium* e *Phytopythium* foram amostradas em diferentes estados produtores de hortaliças no Brasil. Para a identificação inicial dos isolados realizou-se a extração do DNA genômico, com subsequente sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal. Em seguida, a região da citocromo oxidase II (*Cox II*) de isolados de cada espécie foi sequenciada. Por fim, árvores filogenéticas foram construídas a partir de cada região genômica e da combinação das regiões sequenciadas. Um total de 127 isolados de *Pythium* e *Phytopythium* tiveram a região ITS sequenciada. Foram identificadas dez espécies de *Pythium* (*P. acanthophoron*, *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. myriotylum*, *P. oopapillum*, *P. spinosum*, *P. splendens*, *P. sylvaticum*, *P. tracheiphilum* e *P. ultimum* var. *ultimum*) e três espécies de *Phytopythium* (*Phy. chamaehyphon*, *Phy. cucurbitacearum* e *Phy. vexans*). A espécie prevalecente neste estudo foi *P. aphanidermatum*, com 47 isolados distribuídos em todas as regiões brasileiras amostradas e associada a catorze diferentes culturas olerícolas, seguida de *P. ultimum* var. *ultimum* (26 isolados) associado a doze culturas. Algumas espécies são restritas a determinados estados, como *P. tracheiphilum* isolado apenas no Distrito Federal, *P. spinosum* em Santa Catarina e *P. sylvaticum* no Paraná. Os isolados de *Phytopythium* foram restritos ao Distrito Federal, com exceção de *Phy. cucurbitacearum* encontrado no Mato Grosso. A identificação de isolados de *Pythium* spp. e *Phytopythium* spp. provenientes de diferentes regiões produtoras de hortaliças disponibiliza informações importantes sobre a diversidade de espécies no Brasil, a respectiva distribuição geográfica e amplia a lista de hospedeiras dessas espécies.

Palavras-chaves: *Cox II*, distribuição geográfica, filogenia, ITS.

ABSTRACT

Pythium and *Phytophthium* species are important causal agents of diseases in several economically important crops. Accurate identification of species is essential for the correct diagnosis of the disease and the choice of efficient management strategies. Thus, the aim of this study was to identify *Pythium* and *Phytophthium* isolates from vegetable-producing regions, to determine the prevalence and geographic distribution of the species. Initially, 25 vegetable species with typical symptoms of diseases caused by *Pythium* and *Phytophthium* were sampled in different vegetable producing states in Brazil. For the initial identification of the isolates, extraction of genomic DNA was performed followed by sequencing of the ITS region of the ribosomal DNA. Then, the cytochrome oxidase II (*Cox* II) region of isolates of each species were sequenced. Finally, phylogenetic trees were built from each genomic region and the combination of the sequenced regions. A total of 127 isolates of *Pythium* and *Phytophthium* had the ITS region sequenced. Ten species of *Pythium* (*P. acanthophoron*, *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. myriotylum*, *P. oopapillum*, *P. spinosum*, *P. splendens*, *P. sylvaticum*, *P. tracheiphilum* and *P. ultimum* var. *ultimum*) and three species of *Phytophthium* (*Phy. chamaehyphon*, *Phy. cucurbitacearum* and *Phy. vexans*) were identified. The prevalent species in this study was *P. aphanidermatum*, with 47 isolates distributed in all Brazilian regions and associated with fourteen different vegetable crops, followed by *P. ultimum* var. *ultimum* (26 isolates) associated with twelve crops. Some species were restricted to determinate states, such as *P. tracheiphilum* isolated only in the Distrito Federal, *P. spinosum* in Santa Catarina and *P. sylvaticum* in Paraná. *Phytophthium* isolates were restricted to the Distrito Federal, with the exception of *Phy. cucurbitacearum* found in Mato Grosso. The identification of *Pythium* spp. and *Phytophthium* spp. isolates from different vegetable-producing regions provides important information on the species diversity in Brazil, the respective geographical distribution, as well as expanding the list of hosts for these species.

Keywords: *Cox* II, geographic distribution, phylogeny, ITS.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pythium* pertence à família *Pythiaceae* e engloba mais de 140 espécies reconhecidas, enquanto o gênero *Phytophthium* inclui cerca de 28 espécies, amplamente distribuídas em todo o mundo e ocupando uma variedade de habitats, entre ambientes terrestres e aquáticos (Dick, 1990; Schroeder *et al.*, 2013). Muitas dessas espécies possuem importância econômica para agricultura em razão das perdas de produção que ocasionam em diversas culturas. Possuem a habilidade de afetar tecidos jovens de plantas, como raízes secundárias, sementes e plântulas, causando sintomas conhecidos como *damping-off*, podridão de raízes ou podridão em frutos (Hendrix & Campbell, 1973). Além das espécies fitopatogênicas, o gênero também inclui patógenos de peixes (Khulbe, 2009), algas marinhas (Lee *et al.*, 2017), mamíferos e espécies micoparasitas (Mendoza *et al.*, 1996), com potencial para controle biológico de fitoparasitas (Jones & Deacon, 1995).

A identificação de espécies de *Pythium* e *Phytophthium* é considerada complexa e durante muitos anos foi baseada em características morfológicas e dimensão das estruturas reprodutivas (Waterhouse, 1967; van der Plaats-Niterink, 1981). Algumas limitações para separação de grupos taxonômicos surgiram devido à dificuldade de produção de estruturas reprodutivas em meio de cultura, sobreposição de caracteres entre diferentes espécies e condições ambientais causando variação em estruturas morfológicas dentro de uma mesma espécie. Uma das formas de contornar esses problemas é a comparação de sequências de regiões genômicas que garantem a classificação mais robusta dos isolados de *Pythium* e *Phytophthium*. Entre os marcadores moleculares mais comumente usados na taxonomia de oomicetos está a região ITS do rDNA que apresenta uma alta variabilidade interespecífica (Cooke *et al.* 2000; Matusumoto *et al.*, 2000; Lévesque & de Cock, 2004; Robideau *et al.*, 2011), assim como as regiões da citocromo oxidase I e II e β -*tubulina* que tem permitido uma identificação e classificação mais precisa, e tem permitido também esclarecer as relações evolutivas dentro do gênero (Martin 2000; Villa *et al.*, 2006; Uzuhashi *et al.*, 2010; Robideau *et al.*, 2011). Apesar da utilidade de ferramentas moleculares, espécies diferentes podem ter baixa variabilidade nessas regiões, demonstrando a necessidade da combinação da caracterização morfológica tradicional e molecular para otimizar a separação de espécies.

Informações sobre a prevalência, assim como a distribuição de espécies de *Pythium* e *Phytophthium* presentes em áreas agrícolas no Brasil, ainda são escassas (Nascimento *et al.*, 2011; 2012; Maia *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2016a,b; Jesus *et al.*, 2016). Essas informações são essenciais para a correta diagnose e o delineamento de estratégias de manejo

que consideram as peculiaridades de cada patossistema. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi identificar isolados de *Pythium* e *Phytophythium* provenientes de regiões produtoras de hortaliças, determinar a prevalência e a distribuição geográfica das espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos isolados de *Pythium* e *Phytophythium*

Para a caracterização de *Pythium* e *Phytophythium*, isolados pertencentes à coleção micológica do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças (Anexo I), assim como isolados obtidos de plantas doentes provenientes de diferentes regiões produtoras de hortaliças do Brasil, foram utilizados nesse estudo (Figura 1). Inicialmente, as amostras sintomáticas coletadas em campo foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, e após a lavagem e desinfestação inicial, porções do tecido contendo as lesões foram colocadas em placas de Petri contendo meio V8-ágar clarificado seletivo (BARPN), com antibióticos e fungicidas nas seguintes concentrações: Benomyl (40 g.mL⁻¹) (E. I. duPont De Nemours, Inc. Wilmington, DE), Ampicilina (100 g.mL⁻¹) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), Rifampicina (10 g.mL⁻¹) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Pentacloronitrobenzeno PCNB (30 g.mL⁻¹) (Uniroyal Chemical Co. Naugatuck, CT) e Nistatina (50 g.mL⁻¹) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), (Masago *et al.*, 1977). Os isolados obtidos foram preservados na coleção micológica pelo método de Castellani (Castellani, 1939), e em tubos contendo meio de cultura e óleo mineral a 10°C, sendo recuperados em meio de cultura V8-ágar clarificado.

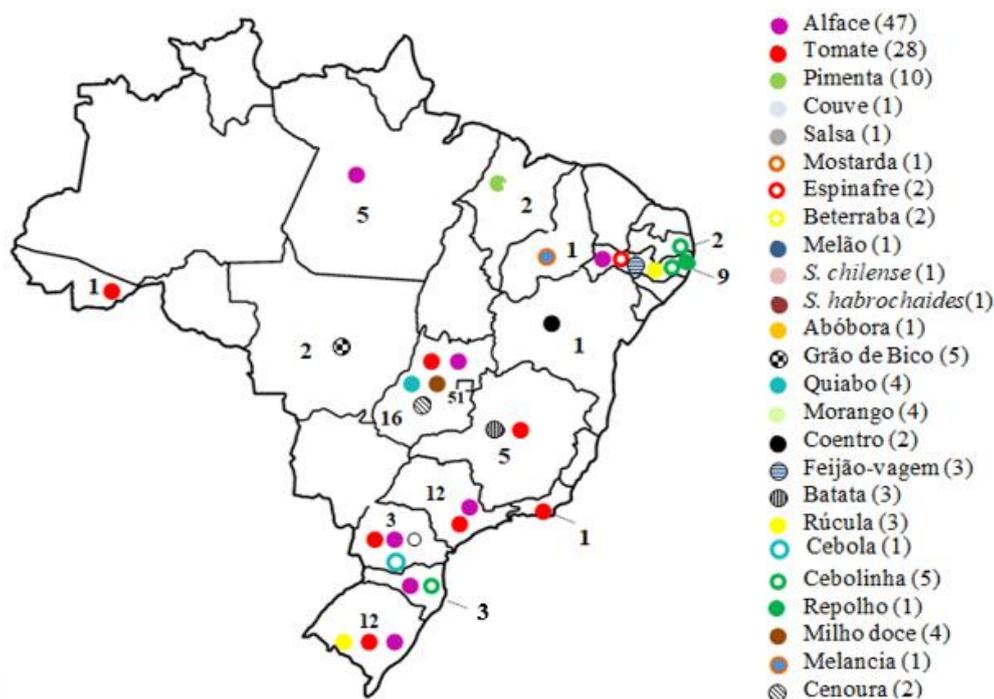


Figura 1. Distribuição geográfica e quantidade de isolados por estado. O número entre parênteses representa a quantidade de isolados para cada hospedeira.

2.2. Caracterização molecular dos isolados

Após o crescimento da colônia em V8 clarificado, uma porção do micélio foi transferida para tubos contendo *beds* que auxiliaram na lise mecânica da célula em Precellys® na presença de TE (tampão de extração). O protocolo utilizado para extração foi o descrito por **Mahuku (2004)**. Ao micélio foram adicionados 200µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCL pH 9.0, 40 mM EDTA), 30µL de SDS 10% e 10µL de proteinase K, sendo agitado vigorosamente em agitador de tubos. Em seguida, a mistura foi incubada a 65 °C por 30 minutos, e após esse período adicionou-se 250µL de acetato de amônio (7,5 M), sendo a solução novamente homogeneizada e colocada a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos contendo 400µL de isopropanol. As amostras foram incubadas por 1 a 2 horas a 4 °C e centrifugadas novamente. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado cuidadosamente com álcool a 70%. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE com RNase e armazenado a -20 °C. Para a utilização na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® (marca Lite) e a qualidade foi checada em gel de agarose (1%). A concentração final do DNA foi padronizada em 50 ng.µL⁻¹.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador MyCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc). As regiões genômicas selecionadas para sequenciamento foram a região ITS utilizando-se os *primers* universais ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS4 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') que amplificaram as regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do DNA ribossômico (**White et al., 1990**), e a região da citocromo oxidase II com a utilização dos *primers* PF34 (5'-GGCAAATGGGTTTTCAAGATCC-3') e PF35 (5'-CCATGATTAATACCACAAATTTCACTAC-3') (**Hudspeth et al., 2000**).

Para amplificação da região ITS, a PCR foi realizada com a preparação de um master mix contendo 2µL de DNA (50ng /µl); 1.5µL de MgCl₂, 1 µL de cada primer (10mM); 1.0µL de dNTPs (10mM); 0.25µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 38.25µL de água Milli-Q com volume da reação final de 5 µL (**Caixeta et al., 2013**). O ciclo da PCR constituiu-se de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; desnaturação inicial a 94 °C por 30 s, anelamento a 52 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min, e por fim, um ciclo de extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Isolados de cada espécie foram selecionados aleatoriamente para a amplificação da região *Cox II*, com o mix da reação possuindo um volume final de 2 µL, contendo 1.5µL de DNA, 1.5µL de MgCl₂, 2.0µL de dNTPs (10mM), 1.25µL de cada *primer* e 0.25µL de Taq polimerase (Promega, Madison, Wisconsin) e 14.75µL de água Milli-Q. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96 °C por 4 min; desnaturação a 96 °C por 30 s; anelamento a 50 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min, repetidas 35 vezes; extensão final a 72 C por 4 minutos.

Os produtos da reação da PCR foram visualizados em gel de agarose após eletroforese em tampão TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA) a 0,5%. Em seguida, para visualização da banda utilizou-se o GelRed[®] registrado em fotodocumentador L-Pix ST (Loccus Biotecnologia). Para a purificação dos produtos da PCR, utilizou-se o Kit de Purificação PureLink[®] (Invitrogen, Waltham–MA), sendo enviados à Macrogen, Inc. (Seul, Coréia do Sul) para sequenciamento. Após o sequenciamento, a qualidade das sequências de nucleotídeos, assim como a edição e obtenção dos consensos, foi realizada por meio do programa DNA Dragon v.1.6.0 (<http://www.dna-dragon.com/>). As sequências de nucleotídeos da região ITS do rDNA e da *Cox II* foram comparadas utilizando o algoritmo BLASTn disponível *online* para confirmar a identidade com base na similaridade com outras sequências depositadas no *GenBank* (**Altschul et al., 1990**)

2.3. Análise filogenética

As sequências de referência de *Pythium* e *Phytophthium* obtidas do *GenBank* e utilizadas na construção das árvores filogenéticas são apresentadas no anexo II. O alinhamento das múltiplas sequências foi realizado pelo programa Geneious Pro v.9.1.2 (Biomatters Ltda, Auckland, New Zeland) (Kearse *et al.*, 2012), utilizando o algoritmo MAFFT (Katoh & Standley, 2013), sendo ajustado manualmente quando necessário. Isolados que apresentaram sequências muito curtas ou outras divergências que dificultavam o alinhamento foram excluídos dessa análise. Para construção das árvores filogenéticas foram utilizados os alinhamentos de cada região isoladamente e combinação das regiões ITS e *Cox II*.

A seleção do modelo de substituição de nucleotídeos que melhor se ajusta ao conjunto de dados foi feita utilizando o critério de AKAIC (AIC, Akaike 1974; Sugiura 1978), pelo programa Mega X (Kumar *et al.* 2016). O método utilizado foi a Máxima Verossimilhança utilizando o *software* RAxML (Stamatakis, 2014), com *bootstrap* de 1000 réplicas. As árvores filogenéticas foram construídas no Geneious Pro v.9.1.2 e visualizadas e formatadas no programa FigTree versão 1.4 e Adobe Illustrator.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização molecular dos isolados

Um total de 127 isolados foram previamente comparados com sequências da região ITS disponíveis no *GenBank*. O comprimento da região ITS desses isolados, após a edição das sequências consenso, variou de 429 a 997 pares de bases. A região *Cox II* foi sequenciada para isolados representativos de cada espécie, sendo que o tamanho dos fragmentos após a edição das sequências variou de 438 a 604 pares de bases. Os isolados foram provenientes de 25 culturas olerícolas diferentes (Tabela 1), sendo identificadas dez espécies de *Pythium* (*P. acanthophoron*, *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. myriotylum*, *P. oopapillum*, *P. spinosum*, *P. splendens*, *P. sylvaticum*, *P. tracheiphilum* e *P. ultimum* var. *ultimum*) e três espécies de *Phytophthium* (*Phy. chamaehyphon*, *Phy. cucurbitacearum* e *Phy. vexans*). Doze isolados não puderam ser identificados precisamente pela comparação das regiões ITS e *Cox II* com isolados referências disponíveis no *GenBank*, com a maioria apresentando alta identidade de nucleotídeos com mais de uma espécie. As espécies encontradas são listadas abaixo, seguidas das hospedeiras e locais de origem.

Pythium acanthophoron Sideris – Mycologia 24:36. 1932.

= *Globisporangium acanthophoron* (Sideris) Uzuhashi, Tojo & Kakish., Mycoscience 51 (5): 360. 2010.

HOSPEDEIRAS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – foram encontrados três isolados coletados em coentro, pimenta e rúcula, provenientes dos estados da Bahia, Maranhão e Pernambuco, respectivamente.

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzp. – Mycologia 15.168.1923.

= *Pythium butleri* Subramaniam – Mem. Dep. Agric. India, Bot. 10:193. 1919.

= *Nematosporangium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. – Mycologia 15.168.1923.

HOSPEDEIRAS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – no total, 47 isolados foram obtidos, sendo a espécie prevalecente nesse estudo. As hospedeiras foram abóbora, alface, batata, beterraba, couve-chinesa, espinafre, feijão-vagem, quiabo, rúcula, melancia, pimenta e tomate, além de *S. chilense* e *S. habrochaides*. Os estados em que foram coletadas amostras foram: Acre (1), Distrito Federal (17), Goiás (5), Minas Gerais (3), Pará (1), Pernambuco (4), Piauí (1), Rio Grande do Sul (9), São Paulo (5) e Santa Catarina (1).

Pythium deliense Meurs - Phytopath. Z. 7: 179. 1934.

= *Pythium indicum* Balakrishnan – Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B, 27:1171. 1948.

HOSPEDEIRAS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – um total de nove isolados foram obtidos de alface, cebolinha, quiabo e tomate no Distrito Federal (2) e nos estados de Goiás (1), Pará (3), Paraíba (2) e Pernambuco (1).

Pythium myriotylum Drechsler J. Wash. Acade. Sci. 20:404.1930; Phytopathology 33:261-276. 1943.

= *Nematosporangium myriotylum* (Drechsler) Uzuhashi, Tojo & Kakish., Mycoscience 51 (5): 360. 2010.

= *Pythium polyandrum* van Hall – Meded. Inst. Plziektk. 67: 46. 1925.

HOSPEDEIRAS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – sete isolados foram coletados em pimenta e tomate no Distrito Federal (6) e no estado do Maranhão (1).

Pythium oopapillum Bala, de Cock & Lévesque, Persoonia 25: 23. 2010.

HOSPEDEIRAS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – foram coletados dois isolados em alface e mostarda provenientes de São Paulo (1) e Distrito Federal (1), respectivamente.

Pythium spinosum Sawada apud Sawada & Chen – Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa 16: 199. 1926.

= *Globisporangium spinosum* (Sawada) Uzuhashi, Tojo & Kakish., Mycoscience 51 (5): 360. 2010.

= *Pythium artotrogus* var. *macracanthum* Sideris - Mycologia 24:47. 1932.

= *Pythium betae* Takahashi – Ann. Phytopath. Soc. Japan 38: 309. 1972.

HOSPEDEIRA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – um isolado foi coletado em alface proveniente de Santa Catarina.

Pythium splendens Hans Braun – J. Agric. Res. 30:1061. 1925

= *Globisporangium spinosum* (Hans Braun) Uzuhashi, Tojo & Kakish., Mycoscience 51 (5): 360. 2010.

= *Pythium splendens* var. *hawaiianum* Sideris – Mycologia 24: 38. 1932.

HOSPEDEIRAS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – foram coletados seis isolados em feijão-vagem, cebolinha, melão quiabo e tomate no Distrito Federal (2) e nos estados do Paraná (1), Pernambuco (2) e Rio de Janeiro (1).

Pythium sylvaticum Campbell & Hendrix – Mycologia 59: 274. 1967.

= *Globisporangium sylvaticum* (Campbell & Hendrix) Uzuhashi, Tojo & Kakish., Mycoscience 51 (5): 360. 2010.

= *Pythium debaryanum* var. *pelargonii* Braun – J. Agric. Res. 30: 1060. 1925.

HOSPEDEIRA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – um isolado foi coletado em cebola no estado do Paraná.

Pythium tracheiphilum Matta – Phytopath. Medt. 4: 51. 1965.

HOSPEDEIRA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – seis isolados foram coletados em alface no Distrito Federal.

Pythium ultimum (Trow) Ann. Bot 15:300. 1901.

Pythium ultimum var. *ultimum* Deschsler (1960)

= *Globisporangium ultimum* (Trow) Uzuhashi, Tojo & Kakish., Mycoscience 51 (5): 360. 2010.

= *Pythium debaryanum* sensu de Bary – Abh. Senckenbnaturf. Ges. 12: 235. 1881.

= *Pythium haplomitrii* Liliengfeld – Bull. Int. Acad. Polon. Sci. Lett. 1911:336 (as haplomitri). [p. 165]

HOSPEDEIRAS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – *P. ultimum* foi a segunda espécie isolada com maior frequência (26 isolados) nas seguintes hospedeiras: batata, beterraba, cebolinha, coentro, espinafre, feijão-vagem, grão de bico, repolho roxo e salsa. Os estados de origem das amostras foram o Distrito Federal (11) e os estados de Goiás (3), Minas Gerais (2), Pernambuco (1), Rio Grande do Sul (1), São Paulo (6) e Santa Catarina (2).

Phytopythium chamaehyphon (Sideris) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, Persoonia34: 37. 2015.

= *Pythium chamaehyphon* Sideris – Mycologia 24:33. 1932. (as. *chamaihyphon*)

= *Ovatisporangium chamaehyphon* (Sideris) Uzuhashi, Tojo & Kakish., Mycoscience 51 (5): 360. 2010.

HOSPEDEIRA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – um isolado foi coletado em rúcula no Distrito Federal.

Phytopythium cucurbitacearum (Takimoto) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, Persoonia34: 37. 2015.

= *Pythium cucurbitacearum* Takimoto – Ann. Phytopath. /soc. Japan 11:91. 1941.

= *Ovatisporangium cucurbitacearum* (Takimoto) Uzuhashi, Tojo & Kakish., Mycoscience 51 (5): 360. 2010.

HOSPEDEIROS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – foram coletados quatro isolados em morango e grão de bico provenientes do Distrito Federal (2) e Mato Grosso (2), respectivamente.

Phytopythium vexans (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, Persoonia34: 37. 2015.

= *Pythium vexans* de Bary, J. R. Agric. Soc. Engl. 12: 255. 1876.

= *Ovatisporangium vexans* (de Bary) Uzuhashi, Tojo & Kakish., Mycoscience 51 (5): 360. 2010.

HOSPEDEIRO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA – dois isolados foram coletados em morango no Distrito Federal.

Tabela 1. Espécimes de *Pythium* e *Phytophythium* coletadas em olerícolas no Brasil, número de isolados em cada hospedeira e o local de coleta das amostras.

Hospedeira	Espécie de <i>Pythium</i>	Nº de isolados	Estados amostrados
Abobora de moita	<i>P. aphanidermatum</i>	1	DF
Alface	<i>P. aphanidermatum</i>	16	RS, PE, GO, PA, SC, SP, DF
	<i>P. deliense</i>	4	PA, DF
	<i>P. oopapillum</i>	1	SP
	<i>Pythium</i> sp.	1	RS (Pyt 482)
	<i>Pythium</i> sp.	1	GO (Pyt 493)
	<i>Pythium</i> sp.	1	PA (Pyt 529)
	<i>Pythium</i> sp.	1	RS (Pyt 485)
	<i>P. spinosum</i>	1	SC
	<i>P. tracheiphilum</i>	6	DF
	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	8	RS, SP, SC
Batata	<i>P. aphanidermatum</i>	1	DF
	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	2	MG
Beterraba	<i>P. aphanidermatum</i>	1	DF
	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	1	DF
Cebola	<i>P. sylvaticum</i>	1	PR
Cebolinha	<i>P. deliense</i>	3	PE, PB
	<i>P. splendens</i>	1	PE
	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	1	SC
Cenoura	<i>Pythium</i> sp.	1	GO
	<i>Pythium</i> sp.	1	- (Pyt 643)
Coentro	<i>P. acanthophorum</i>	1	BA
	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	1	DF
Couve-chinesa	<i>P. aphanidermatum</i>	1	DF
Espinafre	<i>P. aphanidermatum</i>	1	PE
	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	1	DF
Feijão-vagem	<i>P. aphanidermatum</i>	1	DF
	<i>P. splendens</i>	1	PE
	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	1	DF
Grão de bico	<i>Phy. cucurbitacearum</i>	2	MT
	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	3	DF
Melancia	<i>P. aphanidermatum</i>	1	PI
Melão	<i>P. splendens</i>	1	DF
Milho doce	<i>Pythium</i> sp.	4	GO (Pyt 580, Pyt 581, Pyt 582 e Pyt 583)
Morango	<i>Phy. cucurbitacearum</i>	2	DF
	<i>Phy. vexans</i>	2	DF
Mostarda	<i>P. oopapillum</i>	1	DF
Pimenta	<i>P. acanthophorum</i>	1	MA
	<i>P. aphanidermatum</i>	2	DF
	<i>P. myriotylum</i>	6	DF, MA
	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	1	DF

	<i>P. aphanidermatum</i>	2	GO
Quiabo	<i>P. deliense</i>	1	DF
	<i>P. splendens</i>	1	DF
Repolho roxo	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	1	PE
Rúcula	<i>P. acanthophoron</i>	1	PE
	<i>P. aphanidermatum</i>	1	RS
	<i>P. chamaeophyon</i>	1	DF
Salsa	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	1	DF
<i>Solanum chilense</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	1	DF
<i>Solanum habrochaides</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	1	DF
Tomate	<i>P. aphanidermatum</i>	17	MG, RS, SP, DF, AC, GO, PR
	<i>P. deliense</i>	1	GO
	<i>P. myriotylum</i>	1	DF
	<i>P. splendens</i>	2	RJ, PR
	<i>Pythium</i> sp.	2	DF, GO (Pyt 438, Pyt 450)
	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	5	SP, GO

Um maior número de isolados foi recuperado de alface (41 isolados), seguido de tomate (28 isolados) e pimenta (10 isolados) (Tabela 1). Em alface foram encontradas as espécies *P. aphanidermatum*, com distribuição em todas as regiões brasileiras, e *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. deliense*, *P. oopapillum*, *P. spinosum* e *P. tracheiphilum*. Sob sistemas de cultivo hidropônico, 4 dos 5 isolados recuperados foram identificados como *P. aphanidermatum* (Pyt 492, Pyt 590, Pyt 591 e Pyt 592). Quatro isolados não puderam ser identificados em nível de espécie por comparação das regiões genômicas analisadas nesse estudo.

Em tomate foram predominantes as espécies *P. aphanidermatum* (17 isolados) e *P. ultimum* var. *ultimum* (5 isolados). Além dessas, foram recuperadas as espécies *P. deliense*, *P. splendens*, *P. myriotylum* e dois isolados não identificados em nível de espécie.

Em contrapartida, a espécie predominante em pimenta foi *P. myriotylum* (6 isolados), seguido por *P. aphanidermatum* (2 isolados), *P. ultimum* var. *ultimum* e *P. acanthophorum* (1 isolado para cada espécie). Em batata, beterraba e espinafre foram isoladas as espécies *P. aphanidermatum* e *P. ultimum* var. *ultimum*.

Pythium aphanidermatum foi a espécie prevalecente (47 isolados) considerando o total de isolados, seguido por *P. ultimum* var. *ultimum* (26 isolados), que foram associados a 14 e 12 culturas, respectivamente (Figura 2).

As espécies *P. tracheiphilum* e *P. spinosum* foram isolados apenas de alface, enquanto *P. oopapillum* de alface e mostarda. Entre as espécies de *Phytophythium*, *Phy. cucurbitacearum*

foi recuperado de grão de bico proveniente do Mato Grosso e morangueiro do DF, *Phy. vexans* e *Phy. chamaehyphon* apenas de morango e rúcula no DF, respectivamente.

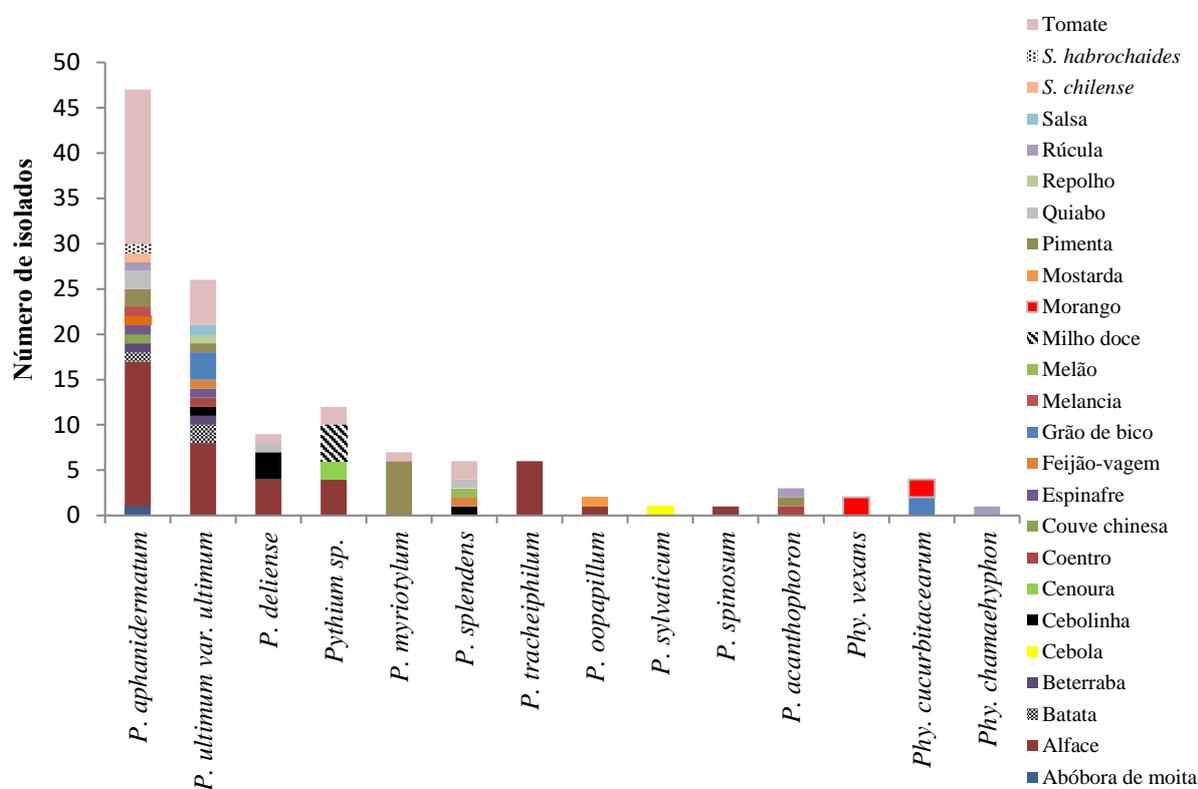


Figura 2. Número de isolados obtidos de cada espécie de *Pythium* e *Phytopythium* em áreas de produção de hortaliças. As cores representam as diferentes hospedeiras de origem dos isolados.

Com relação à distribuição geográfica, a maioria dos isolados de *Pythium* e *Phytopythium* foram provenientes do Distrito Federal (51 isolados), sendo encontradas as espécies *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. deliense*, *P. tracheiphilum*, *P. splendens*, *P. myriotylum*, *P. oopapillum*, *Phy. chamaehyphon*, *Phy. cucurbitacearum* e *Phy. vexans*. No estado de Goiás (16 isolados), *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* var. *ultimum* e *P. deliense* foram recuperados de diferentes hospedeiras. Os outros estados com maior número de isolados foram São Paulo e Rio Grande do Sul, ambos com 12 isolados, onde foram identificadas as espécies *P. aphanidermatum* e *P. ultimum* var. *ultimum* em ambos e *P. oopapillum* apenas em São Paulo.

3.2. Análise filogenética

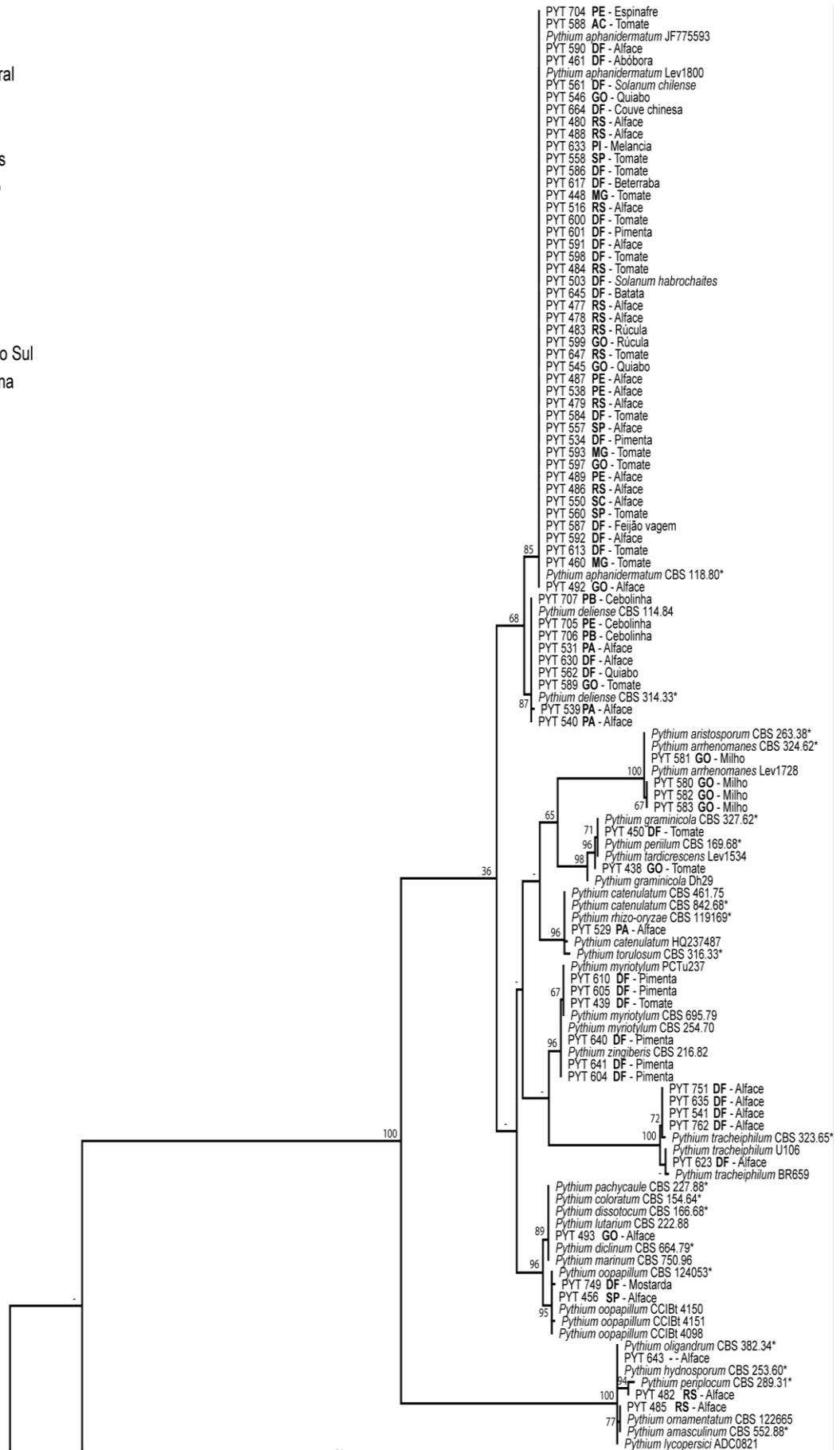
As topologias das árvores filogenéticas com valores de suporte de *bootstrap* são apresentadas nas Figuras 3-8. Para os isolados de *Pythium*, o alinhamento da região ITS consistiu em um total de 692 caracteres, dos quais 323 foram conservados, 324 caracteres foram variáveis e 300 caracteres foram informativos para parcimônia. Para a região *Cox II*, o alinhamento consistiu em um total de 320 caracteres, dos quais 206 foram conservados, 113 caracteres foram variáveis e 95 caracteres foram informativos para parcimônia. O conjunto de dados combinados contendo a região ITS e região *Cox II* compreendeu um alinhamento com 1092 caracteres, sendo 575 conservados, 499 caracteres variáveis e 439 caracteres informativos para parcimônia. Os clados contém isolados de diferentes hospedeiras e diferentes regiões geográficas do Brasil, agrupando segundo a espécie a que pertencem e sem correlação com a hospedeira de origem ou a respectiva região geográfica (Figura 2). Analisando a árvore filogenética da região ITS (Figura 3), há um grande clado formado por isolados identificados como *P. aphanidermatum* que representam a maioria dos isolados recuperados e todos àqueles selecionados como referências com valor de *bootstrap* de 85%. Os isolados identificados como *P. deliense* agruparam em um clado com valor de *bootstrap* de 87%. Os isolados identificados como *P. myriotylum* formaram um clado com isolados de referência com suporte alto (96%), porém *P. zingiberis* também foi inserido nesse clado. Para a região *Cox II* e para a concatenada, os clados formados por isolados de *P. aphanidermatum* e *P. deliense* apresentaram a mesma topologia da região ITS, com alto valor de *bootstrap* (99% e 100%, respectivamente) (Figuras 4 e 5). Os isolados Pyt 456 e Pyt 749 agruparam com *P. oopapillum* com mais de 95% de *bootstrap* assim como os isolados identificados como *P. tracheiphilum* todos provenientes de alface (>97%) para todas as árvores filogenéticas analisadas.

Entre os isolados com esporângios globosos, outro grande clado contendo isolados identificados como *P. ultimum* var. *ultimum* apresentou 99% de *bootstrap* e incluiu todos os isolados utilizados como referência para a região ITS. Na árvore filogenética resultante da combinação de ITS/*Cox II*, isolados de *P. ultimum* foram agrupados em um clado com alto suporte (100%), enquanto o clado gerado a partir da região *Cox II* apresentou menor suporte filogenético (88%). Isolados de *P. splendens* formaram um clado com alto suporte (100%) para todas as regiões analisadas, assim como o isolado identificado como *P. spinosum* que agrupou apenas com o isolado de referência da espécie (AY598701) com alto valor de *bootstrap* em ITS e ITS/*Cox II* (>99%) e 92% para região *Cox II*. Da mesma forma, o isolado Pyt 692 agrupou com alto valor de *bootstrap* (100%) no clado contendo as espécies de *P. sylvaticum* (AY598645,

HQ643852 e MK795052) para *Cox II* (KJ595383) e concatenada, e *bootstrap* de 96% para a região ITS. Os isolados Pyt 440 e Pyt 690 agruparam com 100% de *bootstrap* em todas as árvores com o isolado de referência de *P. acanthophoron* (AY598711 e KJ595376).

Os isolados que não puderam ser identificados pela comparação com sequências do *GenBank* (Pyt 438, Pyt 450, Pyt 482, Pyt 485, Pyt 493, Pyt 529, Pyt 580, Pyt 581, Pyt 582, Pyt 583, Pyt 643 e Pyt 665), também agruparam com mais de uma espécie nas árvores geradas pelas análise da região ITS, *Cox II* e ITS/*Cox II* (Figura 5). Para a região ITS e *Cox II*, o isolado Pyt 493 está incluído em um clado com as espécies, *P. coloratum* (AY598633 e KJ595346), *P. diclinum* (AY598690 e KJ595394), *P. dissotocum* (AY598634 e KJ595351), *P. lutarium* (HQ643682 e KJ595359), *P. marinum* (AY598689 e KJ595398) e *P. pachycaule* (AY598687 e KJ595362) (89% e 68% de *bootstrap*, respectivamente). Os isolados Pyt 580, Pyt 581, Pyt 582 e Pyt 583 de milho doce agruparam em um clado com as espécies *P. aristoporum* (AY598627) e *P. arrhenomanes* (AY598628 e HQ643450) com 100% de *bootstrap* para a região ITS, demonstrando a necessidade da caracterização morfológica desses isolados para separar as espécies. Da mesma forma, Pyt 438 e 450 foram mais relacionados filogeneticamente às espécies *P. tardicrescens*, *P. perillum* e *P. graminicola*. Para ITS, Pyt 529 foi mais próximo a *P. catenulatum* (AY598675 e AY598675), *P. rhizo-oryzae* (HQ643757) e *P. torulosum* (AY598624) com 96% de suporte de *bootstrap*, porém na árvore da região *Cox II* e combinação das duas regiões, esse isolado foi filogeneticamente mais próximo à *P. catenulatum* (KJ595404) com suporte de 91% e 97%, respectivamente. O isolado Pyt 482 foi mais próximo a *P. periplocum* na árvore de ITS, concatenada (94% em ambas) e *Cox II* (<60%). Apesar de Pyt 485 agrupar com *P. amasculinum* (AY598671 e KJ595390) na árvore concatenada, tanto esse isolado quanto Pyt 643 agruparam em um clado com várias espécies de *Pythium*, apresentando baixo suporte filogenético nas demais árvores analisadas.

- AC - Acre
- DF - Distrito Federal
- GO - Goiás
- MA - Maranhão
- MG - Minas Gerais
- MT - Mato Grosso
- PA - Pará
- PB - Paraíba
- PE - Pernambuco
- PI - Piauí
- PR - Paraná
- RS - Rio Grande do Sul
- SC - Santa Catarina
- SP - São Paulo



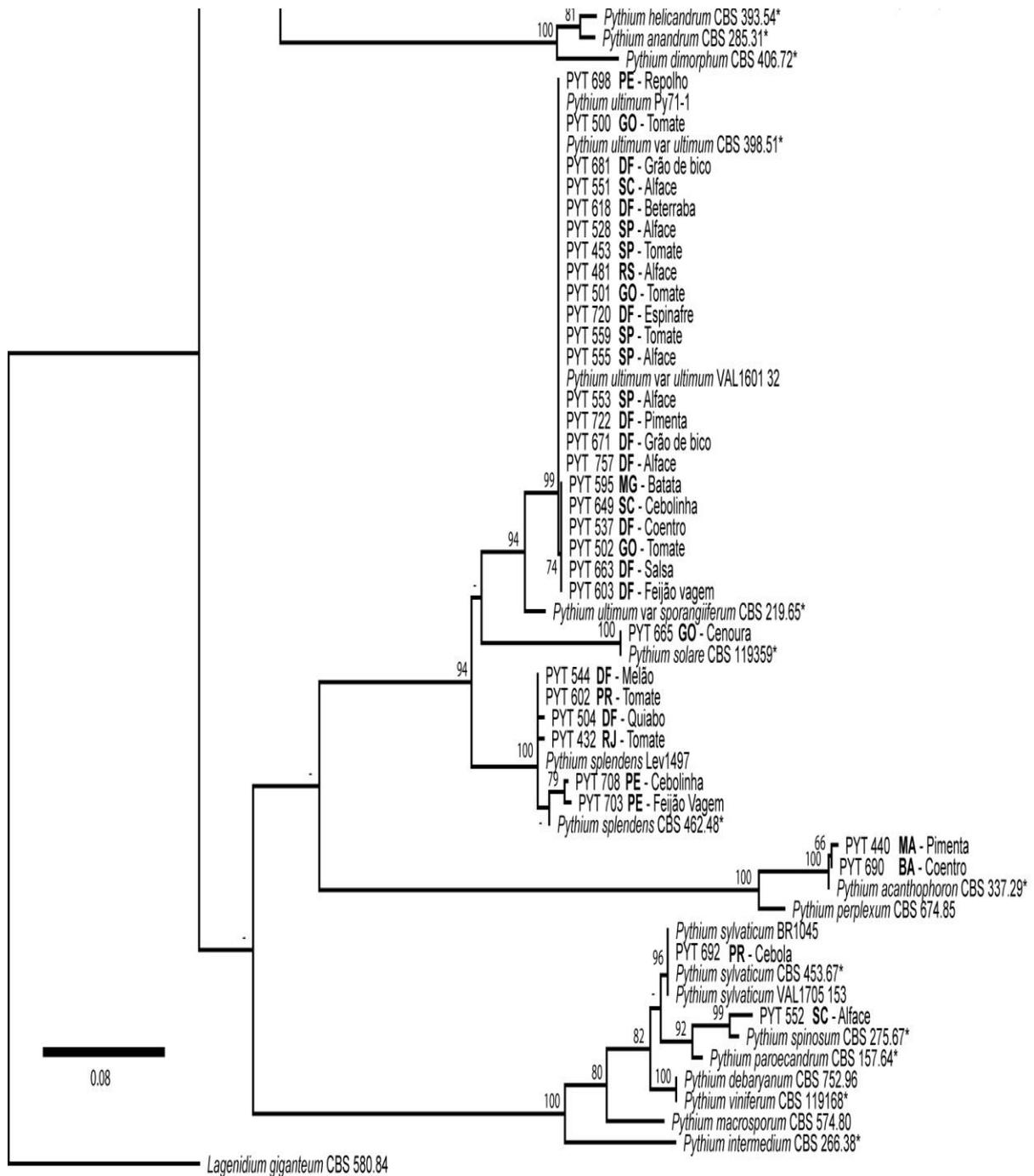


Figura 3. Árvore filogenética da região ITS, com 173 isolados de *Pythium*, 111 coletados de hortaliças e 62 isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G+I escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. Um isolado de *Lagenidium giganteum*, acesso KJ716868, foi usado como *outgroup*. *Isolados-tipo da espécie.

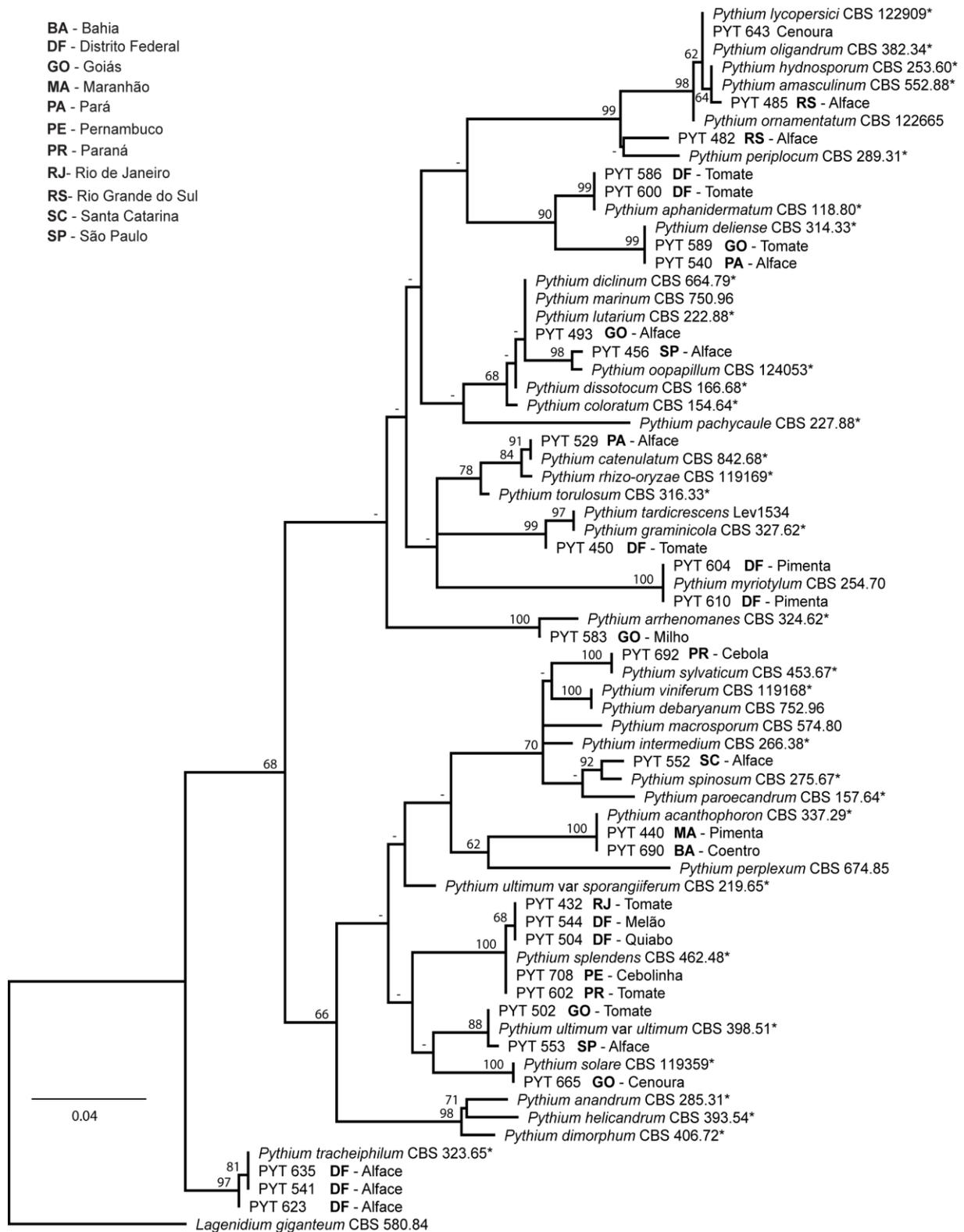


Figura 4. Árvore filogenética da região *Cox II*, com 69 isolados de *Pythium*, 29 coletados de hortaliças e 40 isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G+I escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. Um isolado de *Lagenidium giganteum*, acesso KJ595392, foi usado como *outgroup*. *Isolados-tipo da espécie.

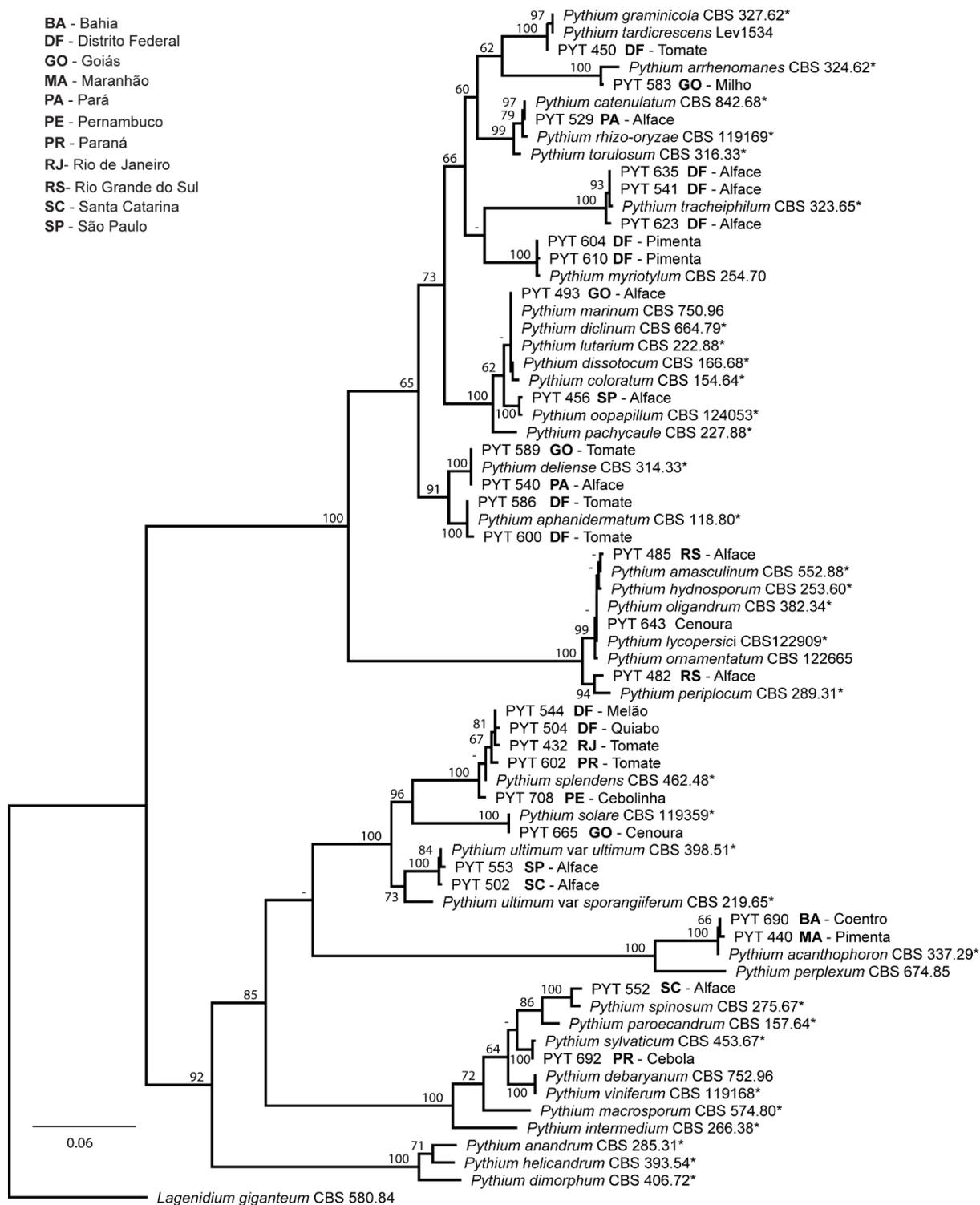


Figura 5. Árvore filogenética das regiões ITS e Cox II, com 69 isolados de *Pythium*, 29 coletados de hortaliças e 40 isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G+I escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. A espécie *Lagenidium giganteum* foi usada como *outgroup*. *Isolados-tipo da espécie.

As árvores filogenéticas das espécies de *Phytopythium* são apresentadas abaixo (Figuras 6-8). Para a região ITS, o alinhamento consistiu em um total de 622 caracteres, dos quais 243 foram conservados, 367 foram caracteres variáveis e 267 caracteres foram informativos para parcimônia. Para a região *Cox II*, o alinhamento consistiu em um total de 504 caracteres, dos quais 387 foram conservados, 115 caracteres foram variáveis e 60 caracteres foram informativos para parcimônia. O conjunto de dados combinados contendo a região ITS e região *Cox II* compreendeu um alinhamento com 1466 caracteres, sendo 828 conservados, 546 caracteres variáveis e 293 caracteres informativos para parcimônia. Os isolados encontrados nesse estudo agruparam com as espécies correspondentes àquelas com maior identidade de nucleotídeos após comparação com sequências de referência disponíveis no *GenBank* para as regiões ITS e *Cox II*, assim como para a árvore resultante da combinação dessas duas regiões. Em todas as árvores analisadas, o isolado Pyt 650 agrupou em um clado com os demais isolados de referência de *Phy. chamaehyphon*, com valor de *bootstrap* de 93% para a região ITS, 57% para região *Cox II* e 100% para as duas regiões ITS/*Cox II*. Os isolados de *Phy. cucurbitacearum*, Pyt 626 e Pyt 627 provenientes de grão de bico agruparam juntos em um subclado para ITS. Apesar disso, esses isolados foram incluídos em um clado maior em que todas as sequências de referência de *Phy. cucurbitacearum*, assim como os isolados Pyt 585 e Pyt 594 foram inseridas com alto suporte (99%) para região ITS e para as duas regiões analisadas em conjunto, porém para *Cox II*, o *bootstrap* foi de 78%. Os isolados Pyt 508 e Pyt 535, provenientes de morangueiro no DF e identificados como *Phy. vexans*, agruparam juntos para todas as regiões genômicas analisadas, sendo que o isolado de referência de *Phy. vexans* (STE-6712) foi mais próximo filogeneticamente na árvore resultante da combinação das regiões ITS/ *Cox II*. Dessa forma, foi possível observar que a árvore resultante da análise da região *Cox II* permitiu a separação dos isolados segundo as espécies encontradas, porém com valores de *bootstrap* mais baixo que a árvore da região ITS e concatenada. Nestas árvores também não houve separação dos isolados segundo hospedeira ou localização geográfica. A árvore filogenética obtida pela combinação das duas regiões genômicas permitiu separar as espécies com valores de *bootstrap* mais altos que a árvore obtida pela análise isolada de cada região genômica, com 99% para isolados identificados com *Phy. chamaehyphon* e *Phy. cucurbitacearum*, e 93% para isolados identificados como *Phy. vexans*.

DF - Distrito Federal

MT - Mato Grosso

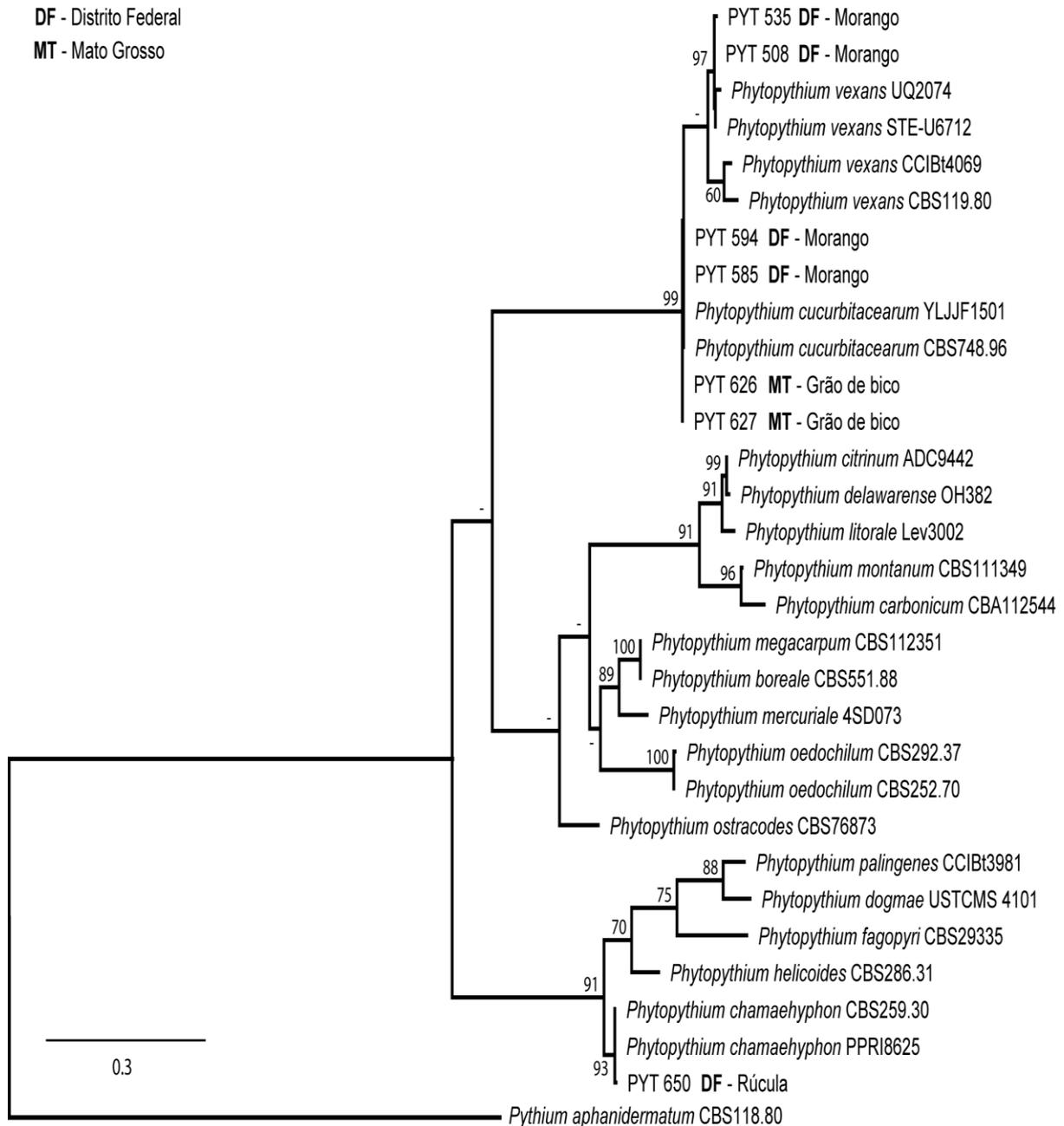


Figura 6. Árvore filogenética da região ITS, com 30 isolados de *Phytophthium* obtidos de hortaliças e isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G+I escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. Um isolado de *Pythium aphanidermatum*, acesso AY598622, usado como *outgroup*.

DF - Distrito Federal

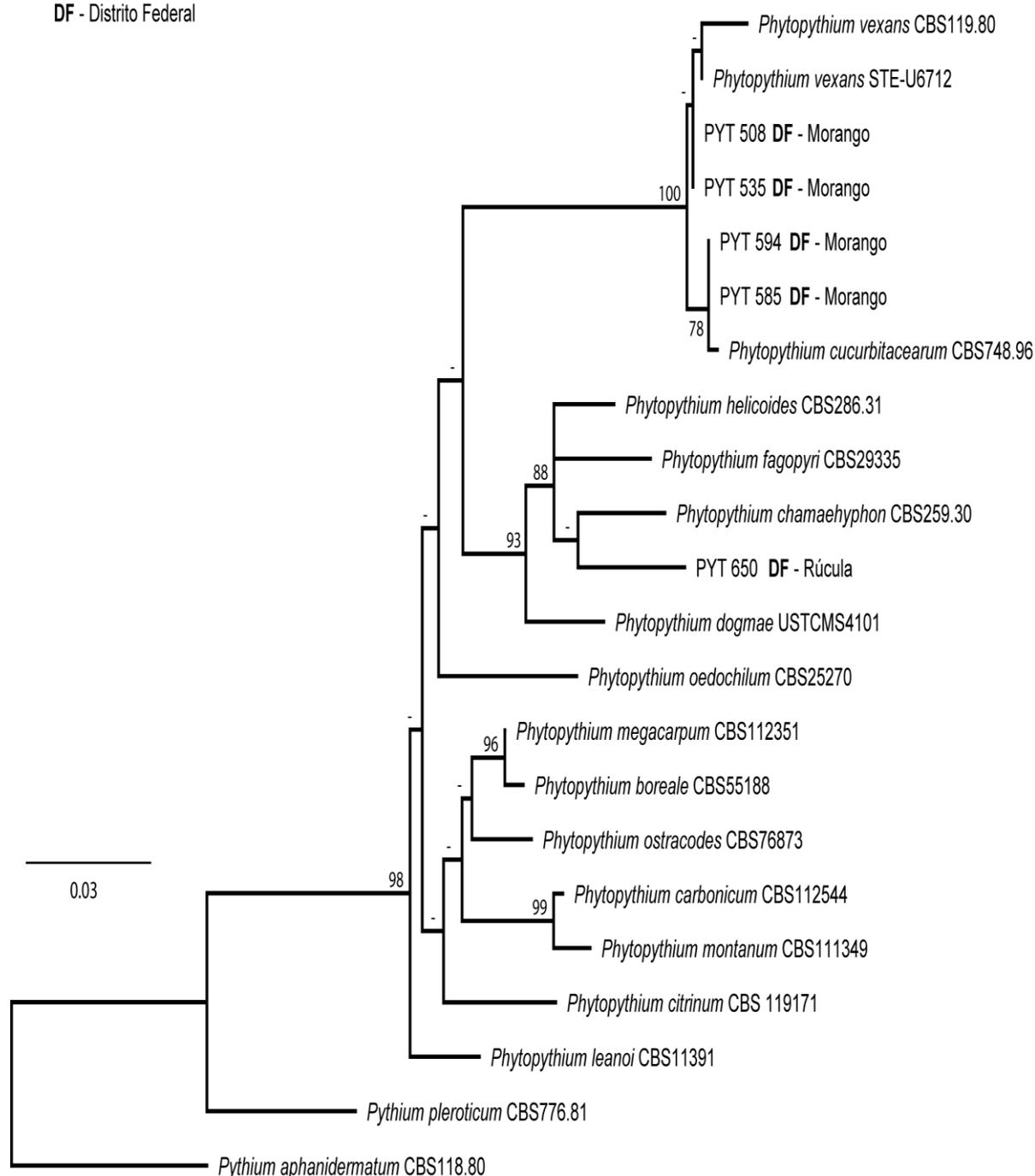


Figura 7. Árvore filogenética da região *Cox II*, com 20 isolados de *Phytophthium* obtidos de hortaliças e isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G+I escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. Os isolados *Pythium aphanidermatum*, acesso KJ595344, e usado *Pythium pleroticum*, acesso AB362321, foram usados como *outgroup*.

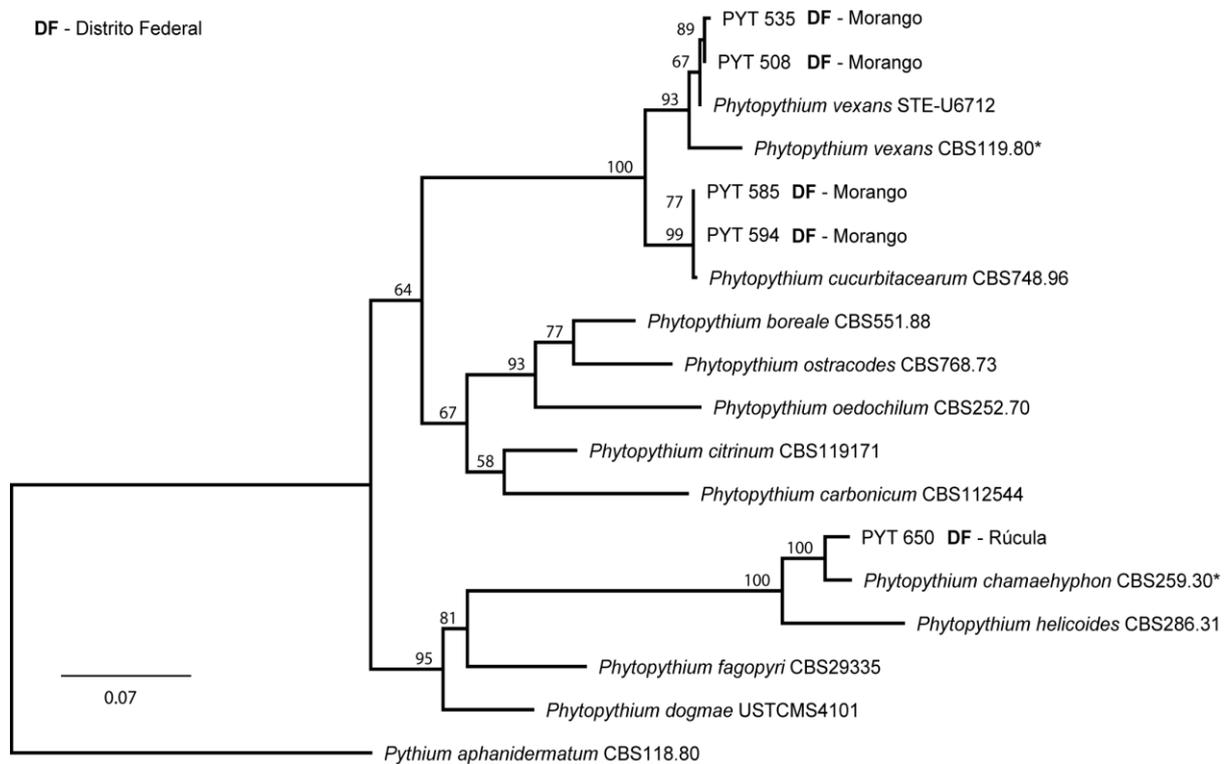


Figura 8. Árvore filogenética da região ITS e *Cox II*, com 17 isolados de *Phytophthium* obtidos de hortaliças e isolados de referência, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Modelo GTR+G escolhido no MEGA X usando o critério de Akaike. A espécie *Pythium aphanidermatum* foi usada como *outgroup*. *Isolados-tipo da espécie.

4. DISCUSSÃO

A presença de grande diversidade de espécies de *Pythium* e *Phytophthium* em solos de áreas agrícolas no Brasil não é novidade, sendo que o manejo das doenças que estes oomicetos causam ainda é um desafio. A abundância dessas espécies em solos cultivados é em grande parte explicado pelo cultivo intenso de plantas suscetíveis e pela a incorporação de resíduos de plantas no solo, criando condições favoráveis à decomposição de matéria orgânica e à disponibilidade de substrato (Hendrix *et al.*, 1971).

Nesse estudo, foi possível identificar dez espécies de *Pythium* e três de *Phytophthium*, sendo *P. aphanidermatum* a espécie predominante, estando presente em todas as regiões amostradas e representando cerca de 36% dos isolados caracterizados. *Pythium ultimum* var. *ultimum* foi a segunda espécie com maior frequência, representando 20% do total de isolados. Como já relatado em trabalhos anteriores, *P. aphanidermatum* e *P. ultimum* predominam em solos cultivados, estando entre as espécies com maior frequência em plantas sintomáticas (Trigianoet *al.*, 2004). Essa alta frequência de *P. aphanidermatum* pode ser devida à sua

adaptação a altas temperaturas, sendo comum sua ocorrência em regiões tropicais e/ou épocas mais quentes, condição que favorece a reprodução, assim como ocorre com *P. irregulare*, *P. sylvaticum* e *P. myriotylum* (25-36 °C). Apesar de *P. ultimum* var. *ultimum* predominar em regiões e/ou épocas mais frias esta espécie já foi detectada em regiões que apresentam temperaturas mais elevadas (Thomson *et al.*, 1971; Baptista *et al.*, 2004; Owen-Going *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2011; Miyake *et al.*, 2014; Rios & Rocha, 2018). Neste trabalho, esta espécie foi coletada de plantas provenientes de locais com macroclima ou microclima subtropical ou tropical de altitude (amenos) como os estados das regiões Sul e Sudeste e locais de elevadas altitudes das regiões Centro Oeste e Nordeste. Este fato pode explicar a alta frequência com que este patógeno foi isolado de hortaliças sintomáticas no Brasil.

A espécie *P. aphanidermatum* foi encontrada com maior frequência infectando a maior parte das culturas amostradas, confirmando seu potencial patogênico (Rios & Rocha, 2018) e grande distribuição geográfica, principalmente em regiões tropicais. Essa espécie já foi relatada nos estados de Amazonas, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro e São Paulo (Milanez *et al.*, 2007; Pereira, 2008; Forzza *et al.*, 2010; Mendes & Urben, 2020). Esse estudo permitiu a confirmação da presença dessa espécie nos três estados da região Sul e nos estados do Acre e Pará, onde ainda não tinha sido relatada. A espécie *P. ultimum* var. *ultimum* já foi registrada no Distrito Federal e nos estados de Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro e São Paulo (Pereira, 2008; Forzza *et al.*, 2010), porém esse é o primeiro relato da ocorrência dessa espécie na região Sul do Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e no estado de Goiás. Essas espécies têm sido descritas como patógenos comuns de solo, atacando uma grande variedade de hortaliças, sendo que *P. ultimum* já foi relatado em mais de 719 plantas hospedeiras (Hendrix & Campbell, 1973; Farr & Rossman, 2020) e *P. aphanidermatum* em plantas das famílias Alliaceae, Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae e Solanaceae, as quais englobam a maioria das espécies de hortaliças (Alexander, 1931; van der Plaats-Niterink, 1981; Pagoch *et al.*, 2015; Mendes & Urben, 2020; Farr & Rossman, 2020).

Pythium ultimum é dividido em duas variedades: *P. ultimum* var. *ultimum* que é mais comum e mais ataca um maior número de espécies cultivadas, produzindo oósporos, mas raramente esporângio e zoósporos, enquanto *P. ultimum* var. *sporangiiferum* é mais raro, apresentando tanto oósporo quanto esporângio (Lévesque & de Cock, 2004). Neste estudo, todos os isolados identificados como *P. ultimum* apresentaram alta identidade com *P. ultimum* var. *ultimum*.

A espécie *P. deliense* possui registro nos estados de Goiás e Minas Gerais, sendo possível ampliar sua ocorrência às regiões Norte e Nordeste do Brasil, especificamente nos estados do Pará, Paraíba e Pernambuco. Da mesma forma, *P. myriotylum* ainda não tinha sido registrado no estado do Maranhão, enquanto a ocorrência no DF e em SP é conhecida (**Maia et al., 2015**). Por sua vez, *P. splendens* possui relato nas regiões Norte (Amazonas e Pará) e Nordeste (Ceará), e neste estudo a sua distribuição foi estendida para outras unidades federativas do Brasil, como o Distrito Federal, Pernambuco, Paraná e Rio Janeiro. A espécie *P. spinosum* foi encontrada apenas em Santa Catarina, sendo que até o momento sua ocorrência no Brasil era restrita ao estado de São Paulo, onde foi relatado em amostras de solo coletadas no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (**Pires-Zotarelli et al., 1995**).

Os isolados identificados como *Phy. vexans* foram encontrados apenas no DF, mas já apresentava registro na região Nordeste (PE e PI) e região Sudeste (MG, RJ e SP) (**Maia et al., 2015**). Neste estudo os isolados desta espécie foram obtidos apenas de morangueiro, mesmo essa espécie já sendo descrita como patógeno de diversas espécies de plantas (**van der Plaats-Niterink, 1981; Ivors et al., 2008; Farr & Rossman, 2020**).

Uma vez que grande parte dos isolados caracterizados foi obtida de alface neste estudo, a maior diversidade de espécies foi encontrada nesta hospedeira. Todas elas já tinham sido registradas anteriormente como patógenos de alface por **Van der Heyden et al. (2019)** e por **Stanghellini & Rasmussen (1994)**, sendo que neste último, as principais espécies também foram *P. aphanidermatum* e *P. ultimum*. **Van der Heyden et al. (2019)** encontraram nove espécies de *Pythium* (*P. tracheiphilum*, *P. sylvaticum*, *P. irregulare*, *P. ultimum*, *P. torulosum*, *P. violae*, *P. rostratum*, *P. monospermum* e *P. graminicola*) infectando raízes de alface, constatando, no entanto, a predominância de *P. tracheiphilum*, que não foi encontrado em solo sem histórico de plantio de alface. A espécie *P. tracheiphilum* é um exemplo de espécies de *Pythium* com gama de hospedeiras restrita, sendo isolado apenas de alface no Distrito Federal. Outra espécie isolada de alface foi *P. oopapillum* encontrado em plantas provenientes de São Paulo (Pyt 456), sendo essa espécie já relatada em raízes de alface nesse mesmo estado (**Gonçalves et al., 2016a,b**). Além de alface, *P. oopapillum* também foi isolado de mostarda no Distrito Federal (Pyt 749), sendo esse o primeiro relato dessa espécie no DF. *Pythium oopapillum* também já tinha sido relatado em rúcula, que pertence à mesma família botânica da mostarda, no Brasil (**Gonçalves et al., 2016a,b**). Assim como *P. tracheiphilum*, as espécies *P. acanthophoron* e *P. sylvaticum* estão sendo registradas, pela primeira vez no Brasil, neste trabalho.

Em sistemas hidropônicos de produção a presença de diversas espécies de *Pythium* no Brasil já foi confirmada (**Gonçalves et al., 2016a**), porém nesse estudo, apenas *P. aphanidermatum* foi recuperado de cultivos hidropônicos de alface e tomate, sendo a adaptação dessa espécie a ambientes aquáticos já comprovada anteriormente (**Zagade et al., 2013**). Mesmo sendo uma espécie muito polífaga e comum em regiões tropicais, *P. aphanidermatum* não foi detectado em alface hidropônico por **Gonçalves et al. (2016a)**.

Em pimenta, foram encontradas as espécies *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* var. *ultimum* e *P. myriotylum*, que já haviam sido relatadas nessa cultura (**Hyder et al., 2018; Rai et al., 2020**). Em um estudo prévio, *P. aphanidermatum* foi responsável por uma mortalidade de 62% em mudas de pimenta em campo e casa de vegetação, sendo uma grande limitação à produção (**Majeed et al., 2018**). A espécie *P. acanthophoron*, também encontrada em pimenta neste estudo, tem sido relatada como micoparásita e um fitopatógeno muito fraco (**van der Plaats-Niterink, 1981**), no entanto, o isolado Pyt 690 teve alta identidade de nucleotídeos da região ITS e *Cox II* com isolados referência desta espécie presentes no *GenBank*. Em alguns casos, essa espécie não ataca os tecidos dessas culturas, ocorrendo na superfície de raízes utilizando exsudatos ou parasitando hifas de fungos fitopatogênicos presentes na rizosfera (**Brožová, 2002**).

Em batata, a ocorrência das espécies *P. aphanidermatum* e *P. ultimum* já foi relatada para essa cultura (**Wale et al., 2008**), como também em beterraba (**Leach, 1986; Brantner & Windels, 1998; Garibaldi et al., 2013**), espinafre (**Garibaldi et al., 2015**) e feijão (**Gilardi et al., 2018**).

Um total de 12 isolados não puderam ser identificados em nível de espécie pela comparação das sequências das regiões ITS e *Cox II* com sequências disponíveis no *GenBank*. Dentro do gênero *Pythium* é muito comum espécies distintas apresentarem alta similaridade em regiões genômicas. Um exemplo disso é *P. aphanidermatum* e *P. deliense* que são espécies muito próximas, apresentando uma diferença de apenas 3% na região ITS, no entanto, exibem várias diferenças em características morfológicas que são consistentes entre as duas espécies (**Herrero et al., 1998**). Outra demonstração de especiação ocorre com *P. attrantheridium* que é descrito como patógeno de cenoura e plântulas de maçã e cereja em várias regiões do Canadá e EUA (**Allain-Boulé et al., 2004**). Estes autores demonstraram que *P. attrantheridium* possui somente 5% de divergência na região ITS em comparação com *P. intermedium*, mas essas duas espécies são morfológicamente distintas.

Um dos isolados que não foi identificado (Pyt 493) apresentou identidade de nucleotídeos de 100% com as espécies *P. dissotocum*, *P. diclinum* e *P. coloratum* para as

regiões ITS e *Cox II*. Da mesma forma, **Zitnick-Anderson & Nelson (2015)** encontraram isolados com 100% de identidade de sequências com *P. dissotocum*, *P. diclinum*, e *P. coloratum* de acordo como banco de dados do NCBI, porém morfológicamente idênticos à *P. coloratum*, confirmando que identificação de isolados com base apenas em dados moleculares pode ser problemática, podendo haver necessidade de caracterização morfológica para a identificação correta da espécie.

Os isolados recuperados de milho doce (Pyt 580 a Pyt 583) apresentaram identidade de nucleotídeos maior que 99% na região ITS com as espécies *Pythium aristosporum* e *P. arrhenomanes*, não sendo possível separá-los entre as duas espécies também pela comparação da região *Cox II*. Essas espécies são caracterizadas pela limitada gama de hospedeiras, estando associados a culturas gramíneas assim como a espécie *P. graminicola* (**van der Plaats-Niterink, 1981; Schroeder et al., 2013**).

A filogenia molecular do gênero *Pythium* tem demonstrado a divisão em 11 clados distintos, nomeados de A a K, usando sequências da Subunidade maior (LSU) e da região ITS do rRNA (**Lévesque & de Cock, 2004**). Tanto na filogenia da região ITS quanto *Cox II*, nossos isolados agruparam juntos com as sequências das espécies correspondentes à comparação com o banco de dados. A filogenia molecular dentro do gênero *Pythium* correlaciona o agrupamento das espécies em dois grupos segundo a morfologia do esporângio: um grupo monofilético composto por espécies com esporângios filamentosos nos clados A a D, e outro grupo monofilético formado pelos clados E a J que contém espécies com esporângios globosos (**Lévesque & de Cock, 2004**). Como já mencionado anteriormente, o clado K é filogeneticamente mais distante dos demais clados, e engloba as espécies do gênero *Phytophthium*, como já reportado em outros trabalhos (**Bala et al., 2010; de Cock et al., 2015; Jesus et al., 2016**). No nosso estudo, a topologia das árvores filogenéticas geradas a partir das análises das regiões ITS e *Cox II* são similares àquelas descritas por **Lévesque & de Cock (2004)**, com o agrupamento das espécies segundo a morfologia do esporângio para a maioria dos isolados analisados (**Matsumoto et al., 2000; Villa et al., 2006**). A análise filogenética demonstrou que os isolados associados a hortaliças no Brasil estão distribuídos nos clados A, B1 e B2, D, F, I, J e K. A maioria dos isolados analisados pertence ao clado A, em que são encontradas as espécies *P. aphanidermatum* e *P. deliense* caracterizadas por possuírem esporângios filamentosos e inflados e rápido crescimento micelial (**van Der Plaats-Niterink, 1981**). Essas espécies apresentam alta similaridade na região ITS, e sempre agruparam em clados próximos nas três árvores analisadas (ITS, *Cox II* e ITS/ *Cox II*).

O isolado Pyt 529 agrupou com espécies pertencentes ao clado B1, tais como *P. catenulatum* e *P. torulosum*, que são caracterizados pela presença de esporângios filamentosos inflados. A separação entre as espécies *P. catenulatum* e *P. torulosum* é muito difícil pela comparação das sequências da região ITS em razão da alta similaridade (Martin, 2000; Lévesque & de Cock, 2004; Villa *et al.*, 2006). Porém, isso é possível com uma caracterização morfológica precisa, pois *P. catenulatum* é heterotático, possuindo oogônio maior e espessamento de hifas em cadeia (van Der Plaats-Niterink, 1981). Em um subclado distinto estão os isolados identificados como *P. tracheiphilum*, espécie que apresenta esporângios globosos em contraste com as outras espécies desse clado, oósporo plerótico e clamidósporos. Os isolados identificados como *P. myriotylum* agruparam em um clado que engloba *P. zingiberis* para a região ITS, como já reportado por Lévesque & de Cock (2004) em que as sequências dessa região diferem apenas em 1 pb entre essas duas espécies. Apesar disso, a morfologia é distinta com diferenças no número de anterídios e tamanho do oogônio (Ichitani & Shinsu, 1980) e preenchimento do oogônio (plerótico em *P. zingiberis*) (van Der Plaats-Niterink, 1981). Da mesma forma, não conseguimos identificar com precisão o isolado Pyt 583, que apresentou alta identidade de nucleotídeos com as espécies *P. aristosporum* e *P. arrhenomanes* nas regiões ITS e *Cox II*. Villa *et al.* (2006) demonstraram que essas espécies sempre agrupam juntas em árvores filogenéticas geradas a partir da análise das regiões ITS, *Cox II* e β -*tubulina*. Porém, elas apresentam morfologia distinta pela menor quantidade de anterídios monóclinos ou díclinos e oósporo applerótico (van Der Plaats-Niterink, 1981). Os isolados Pyt 438 e Pyt 450 não puderam ser identificados com precisão pois agruparam em um clado com as espécies *P. graminicola*, *P. periillum* e *P. tardicrescens*, sendo que as sequências da região ITS são idênticas entre as duas primeiras espécies. O isolado Pyt 493, obtido de alface hidropônica no estado do Goiás, agrupou em um clado filogeneticamente bem suportado para a região ITS com as espécies *P. coloratum*, *P. diclinum*, *P. dissotocum*, *P. lutarium*, *P. marinum* e *P. pachycaule*, pertencentes ao clado B, sendo essa alta similaridade das sequências da região ITS já reportada (Lévesque & de Cock, 2004; Robideau *et al.*, 2011). Essas espécies possuem esporângio filamentoso e não inflado, diferindo das anteriores por esse último aspecto.

O isolado Pyt 482 agrupou com a espécie *P. periplocum* com alto suporte, apesar da identidade de nucleotídeos desse isolado também ser muito alta com *Pythium* sp. (KF831235). Mais uma vez fica comprovada a necessidade da comparação das estruturas reprodutivas entre as espécies presentes nas principais chaves taxonômicas, já que *P. periplocum* apresenta morfologia bem característica com presença de oogônio ornamentado e esporângio filamentoso

inflado tornando mais confiável a identificação desse isolado (**Sideris, 1932; Middleton, 1943; Waterhouse, 1967; van der Plaats-Niterink, 1981**).

No clado F, o isolado identificado como *P. spinosum* agrupou com sequência de referência dessa espécie com alto suporte em todas as árvores filogenéticas analisadas. A característica morfológica mais marcante dessa espécie é a presença de oogônio ornamentado com estruturas em formato digitado e não agudo como nas demais espécies com oogônio ornamentado (**van der Plaats-Niterink, 1981**). Neste mesmo clado são incluídos os isolados de *P. sylvaticum*, identificados com alto suporte filogenético.

O segundo maior clado foi formado por espécies pertencentes ao clado I de **Lévesque & de Cock (2004)**. Esse clado inclui os isolados identificados como *P. ultimum* e *P. splendens*, espécies com ampla distribuição mundial e que apresentam esporângios globosos. O último clado foi o clado J, representando apenas por isolados identificados como *P. acanthophoron* com alto suporte filogenético.

O isolado Pyt 665 obtido de cenoura agrupou nas árvores filogenéticas com a espécie *Pythium solare*. Essa espécie foi relatada por **De Cock et al. (2008)** causando podridão na raiz e no hipocótilo de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) na Espanha. Apesar disso, o isolado foi identificado como *Pythium* sp. por ter alta identidade de nucleotídeos com outros isolados de *Pythium* (AM706351) não identificados em nível de espécie. A confirmação desse isolado como *Pythium solare* pode ser facilmente obtida a partir da caracterização morfológica, já que essa espécie apresenta oogônio com ornamentações diferentes de outras espécies de *Pythium* descritas.

A maioria dos isolados apresentou a mesma distribuição entre as árvores filogenéticas, com isolados agrupados em clados próximos àqueles com a mesma morfologia do esporângio. As principais exceções foram o clado contendo as espécies de *P. tracheiphilum*, que apesar de possuírem esporângio globoso, é filogeneticamente mais próximo a espécies com esporângios filamentosos (**Lévesque & de Cock, 2004**) como observado também na árvore filogenética da região ITS. Na análise da região *Cox II*, a posição filogenética dessa espécie foi basal às demais espécies de *Pythium*. Os clado contendo as espécies de *P. aphanidermatum* e *P. deliense* ocuparam uma posição intermediária nas árvores filogenéticas de *Cox II* e ITS/*Cox II*.

Para as espécies de *Phytophythium*, inicialmente identificadas como *Phy. chamaehyphon*, *Phy. cucurbitacearum* *Phy. vexans*, a topologia da árvore apresentou a mesma separação em três clados já observada anteriormente por **Baten et al. (2014)**. Nenhum dos isolados pertencia ao clado 1, porém no clado 2 está incluído o isolado Pyt 650 que agrupou com sequências da espécie *Phy. chamaehyphon* disponíveis no *GenBank* com alto valor de

bootstrap. Essa espécie é muito próxima filogeneticamente e morfológicamente a *P. helicoides* e *P. fagopyri*, como já demonstrado anteriormente (de Cock *et al.*, 2015; Jesus *et al.*, 2016). Da mesma forma, o clado correspondente aos isolados de *Phy. vexans* agrupou muito próximo ao clado contendo os isolados de *Phy. cucurbitacearum*, confirmando a proximidade filogenética dessas duas espécies. Para *Phy. vexans*, não houve correlação com a origem geográfica pois os isolados já registrados anteriormente no Brasil (KR092140 e KR092142) não foram mais próximos filogeneticamente dos nossos isolados, assim como ocorreu com os isolados de *P. oopapillum* brasileiros (Gonçalves *et al.*, 2016b). As características morfológicas das espécies do clado 3 são distintas das descritas para as demais espécies de *Phytophthium*, já que os esporângios não apresentam papila e não ocorre proliferação interna do esporângio como nas espécies dos demais clados (de Cock *et al.*, 2015)

Dessa forma, é possível concluir que árvores filogenéticas geradas com a maioria dos isolados utilizados nesse estudo, para as regiões ITS e *Cox II*, apresentaram topologia correspondente a trabalhos anteriores, com espécies que possuem esporângios globosos agrupados em clados próximos e àqueles com esporângios filamentosos em clados mais distantes. A análise filogenética permitiu também uma alta confiabilidade na separação da maioria das espécies encontradas.

5. CONCLUSÕES

A partir desse estudo foi possível confirmar a presença de *Pythium* e *Phytopythium* em solos no Brasil e a ampla distribuição da maioria das espécies. A distribuição das espécies de *Pythium* foi estendida a regiões brasileiras onde ainda não haviam sido descritas. *Pythium aphanidermatum* e *P. ultimum* var. *ultimum* foram as espécies mais comuns, sendo associadas a maioria das hospedeiras amostradas. Além disso, *P. tracheiphilum* que ainda não havia sido descrito no país, foi uma das espécies associadas ao sintoma de podridão foliar em alface no DF. De forma semelhante, para as espécies *P. acanthophoron*, *P. sylvaticum* e *Phy. chamaeophyon* não foram encontrados registros de ocorrência no Brasil.

As árvores filogenéticas permitiram uma alta confiabilidade na identificação dos isolados provenientes de hortaliças, com a topologia das árvores filogenéticas semelhante entre as duas regiões analisadas (ITS e *Cox II*) assim como para a árvore filogenética gerada pela combinação das duas regiões genômicas. Assim como nos trabalhos clássicos de filogenia de *Pythium*, neste estudo espécies com esporângios filamentosos agruparam em clados próximos, assim como espécies com esporângios globosos.

Um total de 12 isolados não identificados nesse estudo apresentam alta similaridade das sequências com mais de uma espécie de *Pythium*. Em razão das diferenças marcantes na morfologia dessas espécies, deduz-se que a caracterização das estruturas reprodutivas pode auxiliar na identificação desses isolados.

Por fim, esse estudo disponibiliza informações importantes sobre diversidade de *Pythium* e *Phytopythium* presentes em áreas produtoras de hortaliças no Brasil, amplia sua distribuição geográfica, bem como a gama de hospedeiras para as espécies encontradas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* 19:716–723.

ALLAIN-BOULÉ N. *et al.*, 2004. *Pythium attrantheridium* sp. nov.: taxonomy and comparison with related species. *Br. Mycol. Soc. Mycol. Res.* 108:795-805.

ALEXANDER, L.J. 1931. The causes and control of damping-off of tomato, brinjal and chilli seedlings. *Ohio Agric Exp Stat Bull* 496:57–61.

ALTSCHUL, S.F. 1990. BLAST algorithm. In: eLS.

BALA, K.; ROBIDEAU, G.P.; DESAULINERS, N.; DE COCK, A.W.A.M. & LEVESQUE, C.A. 2010. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia* 25:22-31.

BATEN, M.A.; ASANO, T.; MOTOHASHI, K.; ISHIGURO, Y.; RAHMAN, M.Z.; INABA, S.; SUGA, H. & KAGEYAMA, K. 2014. Phylogenetic relationships among *Phytopythium* species, and re-evaluation of *Phytopythium fagopyri* comb. nov., recovered from damped-off buckwheat seedlings in Japan. *Mycological Progress* 13:4.

BRANTNER, J.R. & WINDELS, C.E. 1998. Variability in sensitivity to metalaxyl in vitro, pathogenicity, and control of *Pythium* spp. on sugar beet. *Plant Disease* 82:896-899.

BROŽOVÁ, J. 2002. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Prot. Sci.* 38:29-35.

CAIXETA, M.P.; CARVALHO NUNES, W.M.; SANTOS, A.F.; TESSMANN, D.J. & VIDA, J.B. 2013. Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil. *Summa Phytopathologica* 39: 242-247.

CASTELLANI, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene.* 24:270-276.

COOKE, D.E.L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J.M.; WAGELS, G. & BRASIER, C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetic Biology* 30:17–32.

DE COCK, A.W.; LODHI, A.M.; RINTOUL, T.L.; BALA, K.; ROBIDEAU, G.P.; ABAD, Z.G.; COFFEY, M.D.; SHAHZAD, S. & LÉVESQUE, C.A. 2015. *Phytopythium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia - Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 34:25–39.

DE COCK, A.W.A.M.; LÉVESQUE, C.A.; MELERO-VARA, J. M.; SERRANO, Y.; GUIRADO, M.L. & GÓMEZ, J. 2008. *Pythium solare* sp. nov., a new pathogen of green beans in Spain. *Mycological Research* 112:1115–1121.

DICK, M.W. 1990. *Keys to Pythium*. College of Estate Management, Whiteknights, Reading, UK.

- DUBEY, M.K.; ZEHRA, A.; AAMIR, M.; YADAV, M.; SAMAL, S. & UPADHYAY, R.S. 2020. Isolation, identification, carbon utilization profile and control of *Pythium graminicola*, the causal agent of chilli damping-off. *Journal of Phytopathology* 168:88-102.
- FARR, D.F. & ROSSMAN, A.Y. 2020. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>. Consultado em 18/04/2020.
- FORZZA, R.C *et al.* 2010. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Vol. 1. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; ORTU, G. & GULLINO, M.L. 2015. Root Rot of Spinach in Southern Italy Caused by *Pythium aphanidermatum*. *Plant Disease* 99:159.
- GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; ORTU, G. & GULLINO, M.L. 2013. First report of damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* on leaf beet (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) in Italy. *Plant disease* 97:292-292.
- GILARDI, G.; MATIC, S.; GULLINO, M. L. & GARIBALDI, A. 2018. First report of damping off caused by *Pythium aphanidermatum* on bean (*Phaseolus vulgaris*) in Italy. *Plant disease* 102:687.
- GONÇALVES, D.R.; JESUS, A.L. & PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2016a. *Pythium* and *Phytophythium* species associated with hydroponically grown crops around the City of São Paulo, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 41:397–405.
- GONÇALVES, D.R.; JESUS, A.L.; ROCHA, S.C.O.; MARANO, A.V. & PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2016b. New records of *Pythium* (Oomycetes, Straminipila) for South America based on morphological and molecular data. *Nova Hedwigia* 103:1–12.
- HENDRIX, F.F.J.R.; CAMPBELL, W.A. & CHIEN, C.Y., 1971. Some Phycomycetes indigenous to soils of old growth forests. *Mycologia*, 63, 283-289.
- HENDRIX, F.F. & CAMPBELL, W.A. 1973. *Pythium* as plant pathogens. *Annual review of Phytopathology* 11:77-98.
- HERRERO, M.L. & KLEMSDAL, S.S., 1998. Identification of *Pythium aphanidermatum* using the RAPD technique. *Mycol. Research* 102:136-140.
- HUDSPETH, D.S.; NADLER, S.A. & HUDSPETH, M.E. 2000. A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia* 92:674-684.
- HYDE, K.D.; NILSSON, R.H.; ALIAS, S.A.; ARIYAWANSA, H.A.; BLAIR, J.E.; CAI, L.; ... & GORCZAK, M. 2014. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity* 67:21-125.
- HYDER, S.; INAM-UL-HAQ, M.; ASHFAQ, M.; AHMAD, A.; GONDAL, A.S. & IQBAL, M. 2018. First Report of *Pythium myriotylum*, causing damping off and root rot in chili pepper (*Capsicum annum* L.) from Punjab, Pakistan. *Plant Disease* 102:687-687.
- ICHITANI, T. & SHINSU, T. 1980. *Pythium zingiberum* causing rhizome rot of ginger plant and its distribution (in Japanese). *Annals of Phytopathological Society of Japan* 46:435–441

- IVORS, K.L.; ABAD Z.G. & BENSON, D.M. 2008. Evaluating the pathogenicity of *Pythium vexans* isolates from Fraser Fir in North Carolina. *Plant Health Progress* 9:8.
- JONES, E.E. & DEACON, J.W. 1995. Comparative physiology and behavior of the mycoparasites *Pythium acanthophoron*, *P. oligandrum* and *P. mycoparasiticum*. *Biocontrol Sci & Technol* 5: 27- 40.
- JESUS, A.L. DE; GONÇALVES, D.R.; ROCHA, S.C.O.; MARANO, A.V.; JERÔNIMO, G.H.; SOUZA, J.I.D.; CASTILHO BORO, M. & PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2016. Morphological and Phylogenetic Analyses of Three *Phytopythium* Species (Peronosporales, Oomycota) from Brazil. *Cryptogamie Mycologie* 37:117–128.
- KATOH, K. & STANDLEY, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution* 30:772-780.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; ...& THIERER, T. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- KHULBE, R.D. 2009. Pathogenicity of some species of *Pythium* Pringsheim on certain fresh water temperate fishes. *Mycoses* 26: 273-275.
- KUMAR, S.; STECHER, G. & TAMURA, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- LEACH, L.D. 1986. Seedling diseases. Pages 4-8 in: *Compendium of Beet Diseases and Insects*. E. D. Whitney and J. E. Duffus, eds. APS Press, St. Paul, MN.
- LEE, S.J.; JEE, B.Y.; SON, M.H. & LEE, S.R. 2017. Infection and *cox2* sequence of *Pythium chondricola* (Oomycetes) causing red rot disease in *Pyropia yezoensis* (Rhodophyta) in Korea. *Algae* 32:155-160.
- LÉVESQUE, C.A. & COCK, A.W.A.M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108:1363–1383.
- MAHUKU, G.S. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:71-81.
- MAIA, L.C.; CARVALHO JÚNIOR, A.A.D.; CAVALCANTI, L.D.H.; GUGLIOTTA, A.D.M.; DRECHSLER-SANTOS, E.R.; SANTIAGO, A.L.D.A. ...& SOARES, A.M.D.S. 2015. Diversity of Brazilian fungi. *Rodriguésia* 66:1033-1045.
- MAJEED, M.; MIR, G.H.; HASSAN, M.; MOHUIDDIN, F.A.; PASWAL, S. & FAROOQ, S. 2018. Damping Off in Chilli and Its Biological Management-A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7:2175-2185.
- MARTIN, F.N. 2000. Phylogenetic relationships of some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia* 92:711–727.

- MASAGO, H.; YOSHIKAWA, M.; FUKADA, M. & NAKANISHI, N. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. from soils and plants. *Phytopathology* 67:425-428.
- MENDES, M.A.S. & URBEN, A.F. 2020. Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Consultado em: 18/4/2020.
- MENDOZA, L.; AJELLO, L. & MCGINNIS, M.R. 1996 Infections caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med* 6:151-164.
- MIDDLETON, J.T. 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Mem. Torrey Bot. Club* 20:1-171.
- MILANEZ, A.I.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. & GOMES, A.L. 2007. Brazilian Zoosporic Fungi. São Paulo.
- MIYAKE, N.; NAGAI, H. & KAGEYAMA, K. 2014. Wilting and root rot of poinsettia caused by three high-temperature-tolerant *Pythium* species in ebb-and-flow irrigation systems. *Journal of General Plant Pathology*, *In press* *Phytopathol.* 11:77-98.
- NASCIMENTO, C.A.; GOMES, E.P.C. & PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2011. Occurrence and distribution of zoosporic organisms in water bodies from Brazilian Cerrado. *Mycologia*, 103:261-272.
- NASCIMENTO, C.A.; SOUZA, J.I.; GOMES, E.P.C. & PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2012. Zoosporic true fungi and heterotrophic straminipiles assemblages from soil of Brazilian Cerrado areas. *Fungal Ecology* 5:114-123.
- OWEN-GOING, T.N.; BENINGER, C.W.; SUTTON, J.C. & HALL, J.C. 2008. Accumulation of phenolic compounds in plants and nutrient solution of hydroponically-grown peppers inoculated with *Pythium aphanidermatum*. *Can. J. Plant Pathol.* 30:214-225.
- PAGOCH, K.; SRIVASTAVA, J.N. & SINGH, A.K. 2015. Damping-Off Disease of Seedlings in Solanaceous Vegetables: Current Status and Disease Management. *Recent Advances in the Diagnosis and Management of Plant Diseases* 35–46.
- PEREIRA, A.A. 2008. Oomicetos (Oomycota) no campo agrícola de Nazária, Piauí-Sustentabilidade na prevenção e controle dos fitopatógenos em agricultura familiar. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí. Piauí, Brasil
- PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; MILANEZ, A.I.; SCHOENLEINCRUSIUS, I.H. & LOHMANN, L.G. 1995. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Fungos, 3: Peronosporales (Pythiaceae). *Hoehnea* 22:125-133.
- PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2015. Pythiales in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB94878>. Consultado em 28/03/2020.

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

RIOS, T.L. & ROCHA, J.R.S. 2018. Potencial patogênico de espécies do complexo *Pythium* (Oomycota) para a agricultura familiar no estado do Piauí. *Pesquisas, Botânica* 71:147-158.

ROBIDEAU, G.P.; DE COCK, A.W.A.M.; COFFEY, M.D.; VOGLMAYR, H.; BROUWER, H.; BALA, K.; CHITTY, D.W.; DESAULNIERS, N.; EGGERTSON, Q.A.; GACHON, C.M.M.; HU, C.H.; KUPPER, F.C.; RINTOUL, T.L.; SARHAN, E.; VERSTAPPEN, E.C.P.; ZHANG, Y.; BONANTS, P.J.M.; RISTAINO, J.B. & LEVESQUE, C.A. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol Ecol Resour* 11:1002–1011.

SCHROEDER, K.L.; MARTIN, F.N.; DE COCK, A.W.; LÉVESQUE, C.A.; SPIES, C.F.; OKUBARA, P.A. & PAULITZ, T.C. 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Disease* 97: 4-20.

STAMATAKIS, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312-1313.

STANGHELLINI, M.E. & RASMUSSEN, S.L. 1994. Hidroponics: a solution for zoosporic pathogens. *Plant Disease* 78:1129-1138.

THOMSON, T.B.; ATHOW, K.L. & LAVIOLLETE, F.A. 1971. The effect of temperature on the pathogenicity of *Pythium aphanidermatum*, *P. debaryanum* and *P. ultimum* on soybean. *Phytopathology* 61:933-935.

TRIGIANO, R.N.; WINDHAM, M.T. & WINDHAM, A.S. 2004. *Plant Pathology. Concepts and Laboratory Exercises*. Boca Raton, CRC.

UZUHASHI, S.; TOJO, M.; KOBAYASHI, S. & KAKISHIMA, M. 2009. *Pythium apinafurcum*: its morphology, molecular phylogeny, and infectivity for plants. *Mycoscience* 50:281–290

VAN DER HEYDEN, H.; WALLON, T.; LÉVESQUE, C. A. & CARISSE, O. 2019. Detection and Quantification of *Pythium tracheiphilum* in Soil by Multiplex Real-Time qPCR. *Plant disease* 103: 475-483.

VAN DER HEYDEN, H.; WALLON, T.; LÉVESQUE, C. A. & CARISSE, O. 2019. Detection and quantification of *Pythium tracheiphilum* in soil by multiplex real-time qPCR. *Plant disease* 103: 475-483.

VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Stud Mycol* 21:1-242.

VILLA, N.O.; KAGEYAMA, K.; TAKAHIRO, A. & SUGA, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia* 93:410-422.

WALE, S.; PLATT, B. & CATTILIN, N.D. 2008. *Diseases, pests and disorders of potatoes: a colour handbook*. CRC Press.

WATERHOUSE, G.M. 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. Mycol Pap 109:1-15.

WEI, L.; XUE, A.G.; COBER, E.R.; BABCOCK, C.; ZHANG, S.; LI, W.; WU, J. & LIU, L. 2011. Pathogenicity of *Pythium* species causing seed rot and damping-off in soybean under controlled conditions. Phytoprotection 91:3-10.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. eds. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press .315-322.

ZAGADE, S.N.; DESHPANDE, G.D.; GAWADE, D.B. & ATNOORKAR, A. A. 2013. Studies on Pre-and Post Emergence Damping off of Chilli Caused by *Pythium ultimum*. Indian Journal of Plant Protection: 41:332-337.

ZITNICK-ANDERSON, K.K. & NELSON JR, B.D. 2015. Identification and pathogenicity of *Pythium* on soybean in North Dakota. Plant Disease 99:31-38.

CAPÍTULO 2

SENSIBILIDADE *IN VITRO* A MEFENOXAM E GAMA DE HOSPEDEIRAS DE ISOLADOS DE *Pythium* E *Phytopythium* OBTIDOS DE HORTALIÇAS NO BRASIL

RESUMO

O manejo de espécies de *Pythium* e *Phytophthium* baseia-se principalmente em medidas preventivas, evitando a entrada destes patógenos em áreas livres da doença. Outra medida de controle é a rotação com culturas não hospedeiras, já que determinadas espécies apresentam gama de hospedeiras restrita, enquanto outras apresentam uma gama de hospedeiras ampla, o que dificulta a rotação. O controle biológico e a aplicação de fungicidas químicos também são medidas de controle eficientes para *Pythium* e *Phytophthium*. Apesar dos principais ingredientes ativos registrados para *Pythium* e *Phytophthium* serem efetivos, relatos de resistência a metalaxil ou mefenoxam em populações dessas espécies são recorrentes. Determinar a sensibilidade dos isolados a esses fungicidas, evitando aplicações que não surtem efeito sobre populações resistentes pode reduzir os custos e evitar perdas de produção causadas pelo uso de fungicidas pouco efetivos. Dessa forma, os objetivos desse capítulo foram avaliar a sensibilidade *in vitro* de isolados de *Pythium* e *Phytophthium* ao fungicida mefenoxam e determinar a sua patogenicidade em diferentes espécies olerícolas. A sensibilidade ao mefenoxam de 65 isolados foi testada para as concentrações de 5, 10 e 100 g.mL⁻¹. Os isolados foram classificados segundo a porcentagem do diâmetro da colônia em cada concentração comparada à testemunha sem fungicida da seguinte forma: i) muito sensível se o diâmetro da colônia for <50% do diâmetro da testemunha a 5 g.mL⁻¹, ii) intermediária se o diâmetro da colônia for maior que 50% a 10 g.mL⁻¹ e iii) resistente se o diâmetro da colônia for maior ou igual a 50% do diâmetro da colônia do isolado em meio sem fungicida na concentração de 100 g.mL⁻¹. Para a avaliação da gama de hospedeiras de *Pythium* e *Phytophthium*, espécies de diferentes famílias botânicas de hortaliças foram selecionadas, para cultivo em vasos contendo solo infestado. Como resultado, apenas dois isolados de *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 481 e Pyt 553) apresentaram reação intermediária ao mefenoxam, com crescimento micelial nas concentrações de 5 e 10 g.mL⁻¹ praticamente igual à testemunha sem fungicida. Os demais isolados foram muito sensíveis à menor concentração de mefenoxam (5 g.mL⁻¹). Na avaliação da gama de hospedeiras, *P. myriotylum* (Pyt 604), *P. deliense* (Pyt 589), *P. aphanidermatum* (Pyt 586 e Pyt 600) e *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 502) afetaram mais da metade das dezessete cultivares avaliadas, confirmando a ampla gama de hospedeiras destes patógenos. Por fim, vale ressaltar que mefenoxam ainda pode ser alternativa para o controle de *Pythium* em áreas produtoras de hortaliças, ao contrário da rotação de culturas que é limitada, considerando que as espécies prevalentes no Brasil são polífagas.

Palavras-chave: controle químico, cultivares, patogenicidade

ABSTRACT

The management of *Pythium* and *Phytophthium* species is based mainly on preventive measures, that avoid their introduction in disease-free areas. Other control measure is the crop rotation with non-host crops, since some species presented restricted host range, while others have wide host range, what makes difficult the crop rotation. The biological control and the use of chemical fungicides are efficient control measures for *Pythium* and *Phytophthium*. Although the main active ingredients registered for *Pythium* and *Phytophthium* are effective, registers of resistance to metalaxyl or mefenoxam in populations of these species are recurrent. To determine the sensitivity of the isolates to these fungicides, avoiding applications that have no effect on resistant populations, will help to reduce the costs and avoid production losses caused by the adoption of ineffective fungicides. Thus, the aim of this chapter were to evaluate the in vitro sensitivity of *Pythium* and *Phytophthium* isolates to the fungicide mefenoxam and verify their pathogenicity in different vegetable species. The sensitivity to mefenoxam of 65 isolates was tested at 5, 10 and 100 g.mL⁻¹ concentrations. The isolates were classified according to the percentage of the colony diameter at each concentration compared to the control at 0 g.mL⁻¹ as follows: i) very sensitive if the colony diameter is <50% of the control diameter at 5 g.mL⁻¹, ii) intermediate if the colony diameter is greater than 50% at 10 g.mL⁻¹ and iii) resistant if the colony diameter is greater than or equal to 50% of the colony diameter of the isolate in medium without fungicide in the concentration of 100 g.mL⁻¹. For the evaluation of the host range of *Pythium* and *Phytophthium*, species from different botanical families of vegetables were selected, and their seedlings were grown in pots filled with infested soil. As a result, only two isolates of *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 481 and Pyt 553) showed an intermediate reaction to mefenoxam, with mycelial growth at concentrations of 5 and 10 g.mL⁻¹ practically equal to the control at 0 g.mL⁻¹. The other isolates were very sensitive to a lower concentration of mefenoxam (5 g.mL⁻¹). Regarding the host range, *P. myriophyllum* (Pyt 604), *P. deliense* (Pyt 589), *P. aphanidermatum* (Pyt 586 and Pyt 600) and *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 502) affected more than half of the seventeen cultivars evaluated, confirming their wide range of hosts. Finally, it is worth mentioning that mefenoxam is still an alternative for the *Pythium* and *Phytophthium* control in vegetable-producing areas, in contrast to crop rotation that is a limited measure, considering the polyphagous nature of prevalent species in Brazil.

Keywords: chemical control, cultivars, pathogenicity

1. INTRODUÇÃO

O manejo de doenças causadas por patógenos habitantes do solo tem sido um desafio ao longo dos anos. Espécies de *Pythium* e *Phytophthium*, uma vez estabelecidos, são capazes de sobreviver por tempo indefinido no solo, de forma saprofítica na matéria orgânica ou infectando diferentes hospedeiras. Na ausência de hospedeiras ou matéria orgânica sobrevivem por meio de estruturas de resistência que suportam condições ambientais adversas (Lamichhane *et al.*, 2017).

O manejo de doenças causadas por *Pythium* e *Phytophthium* consiste, na maioria dos casos, na combinação de métodos de controle, incluindo principalmente métodos preventivos, como o uso de mudas sadias para evitar a entrada do patógeno em áreas livres e a escolha de locais com condições ambientais desfavoráveis ao desenvolvimento da doença, especialmente solos com boa drenagem (Grijalba & Ridaio, 2017). Além dessas estratégias, práticas culturais como rotação de culturas para espécies com gama de hospedeiras restrita, plantio direto e manejo da água (Sutton *et al.*, 2006; Nzungize *et al.*, 2012), assim como o controle biológico com a utilização de *Trichoderma* spp., *Pseudomans fluorescens*, rizobactérias ou produtos comerciais a base de *Bacillus* spp. também são exemplos de alternativas de controle (El-Mohamedy, 2012; Gupta *et al.*, 2013; Elshahawy & El-Mohamedy, 2019; AGROFIT, 2020).

O controle químico de doenças causadas por *Pythium* spp. e *Phytophthium* spp. é geralmente realizado pela aplicação de vários fungicidas como estrubilurinas e fenilamidas. Este último grupo de fungicidas é o mais utilizado para o controle de *damping-off*, incluindo metalaxil, metalaxil-M (mefenoxam) e benalaxil, sendo mefenoxam o mais comum no tratamento de sementes para controle de *Pythium* no Brasil (Agrofit, 2020). Estes fungicidas atuam na inibição da síntese de RNA por meio da modificação da polimerase que está envolvida na produção de rRNA (Davidse, 1995; Hermann & Gisi, 2012).

A resistência ao grupo das fenilamidas já foi registrada em vários oomicetos, sendo esse grupo de fungicidas considerado como de alto risco para surgimento de população resistente em razão de ser caracterizado como sítio-específico (FRAC, 2019). As espécies de *Pythium* e *Phytophthium* que já tiveram relatos de resistência incluem *P. aphanidermatum*, *P. dissotocum*, *P. heterothallicum*, *P. irregulare*, *P. cylindrosporium*, *P. splendens*, *P. torulosum*, *P. ultimum*, *Phy. cucurbitacearum*, *Phy. chamaehyphon*, *Phy. helicoides*, *Phy. litorale* e *Phy. vexans* (Sanders, 1984; Brantner & Windels, 1998; Moorman *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Weiland *et al.*, 2014; Williams-Woodward & De Mott, 2014). A ampla distribuição

geográfica dessas espécies faz com que a frequência da resistência varie de ano a ano ou ainda entre estações sazonais. No Brasil, existe pouca informação sobre a sensibilidade da população de *Pythium* e *Phytophythium* ao mefenoxam no Brasil, sendo os resultados obtidos por **Yañes (2000)** um indicativo da efetividade de metalaxil em inibir o crescimento micelial de *Pythium*. Esses dados são relevantes para compreender a efetividade desse fungicida em campo ao longo do tempo, embasando futuros registros desse produto para uso em culturas olerícolas. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a sensibilidade *in vitro* de isolados de *Pythium* e *Phytophythium* ao fungicida mefenoxam e determinar a sua patogenicidade em diferentes espécies olerícolas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Avaliação da sensibilidade *in vitro* a mefenoxam

Para avaliação da sensibilidade *in vitro* ao fungicida mefenoxam, foram selecionados isolados de forma proporcional à quantidade total de cada espécie de *Pythium* e *Phytophythium* encontrada no capítulo 1. O ensaio de sensibilidade ao mefenoxam foi realizado em placas de Petri (90 mm) contendo meio V8 (Campbell®) clarificado. Inicialmente o fungicida mefenoxam foi diluído em água destilada esterilizada para a manutenção de uma solução estoque, para posterior diluição no meio de cultura nas concentrações de 5, 10 e 100 g.mL⁻¹ (**Del Castillo-Múnera & Hausbeck, 2016**). Placas com meio de cultura V8, sem fungicida foram utilizadas como controle. Neste meio, foi colocado no centro da placa um disco de micélio de 10 mm retirado da borda da colônia de isolados representativos das espécies caracterizadas anteriormente. As placas foram mantidas em câmaras de crescimento tipo BOD, no escuro a 25°C, com avaliações realizadas a partir do segundo dia após o plaqueamento. A reação ao fungicida foi avaliada por meio de medições do diâmetro da colônia de cada isolado nas diferentes concentrações do fungicida com o auxílio de um paquímetro. As medições ocorreram até a estabilização do crescimento micelial ou o preenchimento da placa no meio sem fungicida. Os isolados foram classificados da seguinte forma: i) muito sensível se o diâmetro da colônia for menor que 50% do diâmetro da testemunha a 5 g.mL⁻¹ ii) intermediária se o diâmetro da colônia for maior que 50% a 10 g.mL⁻¹ e iii) resistente se o diâmetro da colônia for maior ou igual a 50% do diâmetro do isolado em meio sem fungicida na concentração de 100 g.mL⁻¹ (**Olson & Benson, 2011**). A porcentagem do diâmetro da colônia em cada concentração (5, 10 e 100 g.mL⁻¹) em relação ao diâmetro da testemunha foi obtido pela seguinte fórmula: $P_d =$

$(D/T) \times 100$, onde P_d é a porcentagem do diâmetro da colônia de cada isolado, D = diâmetro da colônia em cada concentração, T = diâmetro da colônia na testemunha (0 g.mL^{-1}). As placas foram distribuídas aleatoriamente em incubadora, com três repetições de cada concentração para cada isolado. O experimento foi conduzido duas vezes.

Os dados de diâmetro da colônia representados em porcentagem foram utilizados para comparação das diferentes concentrações de mefenoxam e dos isolados de *Pythium* e *Phytophthium* pela análise de variância (ANOVA) e pela comparação das médias no teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância ($P \leq 0,05$), utilizando o programa SISVAR v. 5.6 (Ferreira, 2011).

2.2. Determinação da gama de hospedeiras e teste de patogenicidade em casa de vegetação

Para o ensaio de gama de hospedeiras, foi selecionado um isolado de cada espécie encontrada no capítulo anterior, com exceção de *P. aphanidermatum* e *P. deliense* em que dois isolados foram utilizados nesse ensaio. Espécies de diferentes famílias botânicas de hortaliças foram selecionadas para a avaliação da gama de hospedeiras de *Pythium* spp. e *Phytophthium* spp. (Tabela 1): tomateiro cv. Santa Clara e Viradoro (*Solanum lycopersicum* L.), batata cv. Camila e Ágatha (*Solanum tuberosum*), Pimentão cv. Tico (*Capsicum annum* L.), Pimenta Biquinho (*Capsicum chinense* Jacq.), Cebola cv. Alfa tropical e Riva (*Allium cepa* L.), Cenoura cv. Brasília e Planalto (*Daucus carota* L.), Coentro cv. Verdão (*Coriandrum sativum* L.), Quiabo cv. Santa Cruz (*Abelmoschus esculentus* Moench), Melão cv. Araguaia (*Cucumis melo* L.), Abobrinha var. brasileirinha (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir), Abóbora cv. Jabras (*Cucurbita moschata* x *maxima*), Rúcula cv. Rococó (*Eruca sativa* L.), Repolho cv. União (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), Alface cv. Vanda (*Lactuca sativa* L.). As sementes foram semeadas em bandejas de isopor com 128 células preenchidas com substrato estéril Plantmax®. Apenas as batatas-semente foram plantadas diretamente em vasos de 0,5L com solo esterilizado. Para preparo do inóculo, quatro a cinco discos de 10 mm de diâmetro contendo micélio foram retirados de colônias crescidas em meio cultura V8 (Campbell®) clarificado e transferidos para frascos Erlenmeyer (1L) contendo 300g de sementes de arroz autoclavadas com 200mL de água destilada e esterilizada (Holmes & Benson, 1994). Os frascos foram agitados diariamente para permitir a uniforme colonização do arroz. Após a incubação por cinco a sete dias a 25°C, 5g de arroz colonizado foram misturados ao solo esterilizado presente em vasos de plástico com capacidade de 0,5 L (pH 6,5, composta de 85% de subsolo do cerrado

(LVE) peneirado, 5% de casca de arroz seca e 10% de casca de arroz carbonizada, enriquecida com 100 g de calcário dolomítico, 200 g de superfosfato simples e 60 g de sulfato de amônio para cada 100 L de substrato). A inoculação ocorreu de 35 a 40 dias após semeadura de pimenta biquinho e batata, 25 a 30 dias após a semeadura de cebola, cenoura e pimentão, 20 a 25 dias para alface, coentro, quiabo, rúcula e tomate, e de 7 a 13 dias para abobrinha, melão, repolho e abóbora. As mudas apresentavam aproximadamente 5 a 7 cm quando foram transplantadas para os vasos contendo solo infestado, sendo mantidas em casa de vegetação com temperatura máxima durante o dia de 38°C. A irrigação ocorreu diariamente, duas vezes ao dia durante a condução do ensaio. Solo não inoculado foi utilizado como controle.

As plantas foram avaliadas semanalmente durante um mês para observação dos sintomas na parte aérea, como tombamento, clorose, murcha e subdesenvolvimento que podem ser consequência da podridão radicular causada por *Pythium* spp. e *Phytophthium* spp. Assim que as plantas apresentaram algum desses sintomas, foram retiradas para que as raízes e o colo pudessem ser examinados para a presença de podridão. A patogenicidade dos isolados de *Pythium* e *Phytophthium* foi comprovada com o reisolamento em meio seletivo BARPN e observação das estruturas em microscópio de luz, completando os Postulados de Koch.

Para a comprovação da patogenicidade dos isolados na hospedeira de origem, a metodologia para obtenção de mudas e preparo do inóculo seguiu o mesmo padrão já descrito anteriormente. A diferença que os discos de micélio de cada isolado foi transferido para frascos Erlenmeyer (250mL) contendo 25 g de sementes de arroz autoclavadas com 18 mL de água destilada e esterilizada (**Holmes & Benson, 1994**). Para a inoculação de folhas de alface com isolados associados ao sintoma de podridão foliar, folhas de alface destacadas foram colocadas em caixas de acrílico transparente 11 x 11 x 3,5 cm tipo “Gerbox” e discos de 10 mm contendo micélio de colônias crescidas em V8 clarificado foram colocados na parte abaxial de cada lado da nervura da folha. Foram utilizadas três folhas como repetições para cada isolado e folhas inoculadas apenas com discos sem micélio foram utilizados como controle. Apenas um isolado representativo de cada espécie foi inoculado em sua hospedeira original. A avaliação da doença foi realizada da mesma forma descrita acima e a confirmação da patogenicidade feita somente após o isolamento em meio V8 clarificado seletivo e observação das estruturas típicas de *Pythium* spp. e *Phytophthium* spp. em microscópio ótico. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com três repetições para cada isolado avaliado com duas plantas por vaso (**Lookabaugh et al., 2015**).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da sensibilidade *in vitro* a mefenoxam

Um total de 65 isolados foi testado quanto à capacidade de crescimento micelial em meio de cultura na presença de diferentes concentrações de mefenoxam (Figura 1-3). A ANOVA foi significativa para os efeitos de concentrações e isolados. Dos 21 isolados de *P. aphanidermatum* testados, o isolado Pyt 480 apresentou um crescimento micelial de 37% a 5 g.mL⁻¹ em relação à testemunha diferindo estatisticamente dos outros isolados nessa concentração ($P \leq 0,05$). Os demais isolados apresentaram acentuada sensibilidade a 5 g.mL⁻¹, porém diferiram estatisticamente em quatro grupos. Nas concentrações de 10 g.mL⁻¹ e 100 g.mL⁻¹, os isolados formaram quatro e três grupos que diferiram estatisticamente entre si, respectivamente. Os isolados Pyt 590, Pyt 591 e Pyt 592, provenientes de alface hidropônica no DF, foram altamente sensíveis, não apresentando crescimento micelial em nenhuma concentração testada. Apenas dois isolados de *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt481 e Pyt 553) apresentaram reação intermediária à concentração de 10 g.mL⁻¹ de mefenoxam no meio de cultura, crescendo mais de 50% em relação ao crescimento micelial no meio sem fungicida e diferindo estatisticamente dos demais isolados nas concentrações de 5 e 10 g.mL⁻¹ ($P \leq 0,05$). Esses isolados são associados à podridão foliar na cultura da alface no Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente. Na concentração de 100 g.mL⁻¹, apenas os isolados Pyt 553 e Pyt 554 diferiram estatisticamente entre si e entre os demais isolados. De forma semelhante, isolados de *P. deliense* foram muito sensíveis ao mefenoxam, com crescimento menor que 20% do crescimento micelial da testemunha. Os isolados Pyt 539 e Pyt 589 diferiram estatisticamente dos demais isolados ($P \leq 0,05$), apresentando um diâmetro da colônia maior que os demais em todas as concentrações avaliadas. Os outros isolados de *P. deliense* mostraram-se muito sensíveis à adição de mefenoxam ao meio de cultura, com uma acentuada redução do diâmetro da colônia em relação à testemunha (0 g.mL⁻¹) na menor concentração do fungicida (5 g.mL⁻¹). Na concentração de 100 g.mL⁻¹, todos os isolados apresentaram alta sensibilidade com crescimento micelial menor que 30% em relação à testemunha (Figura 1).

Porcentagem (%) do diâmetro da colônia em cada concentração

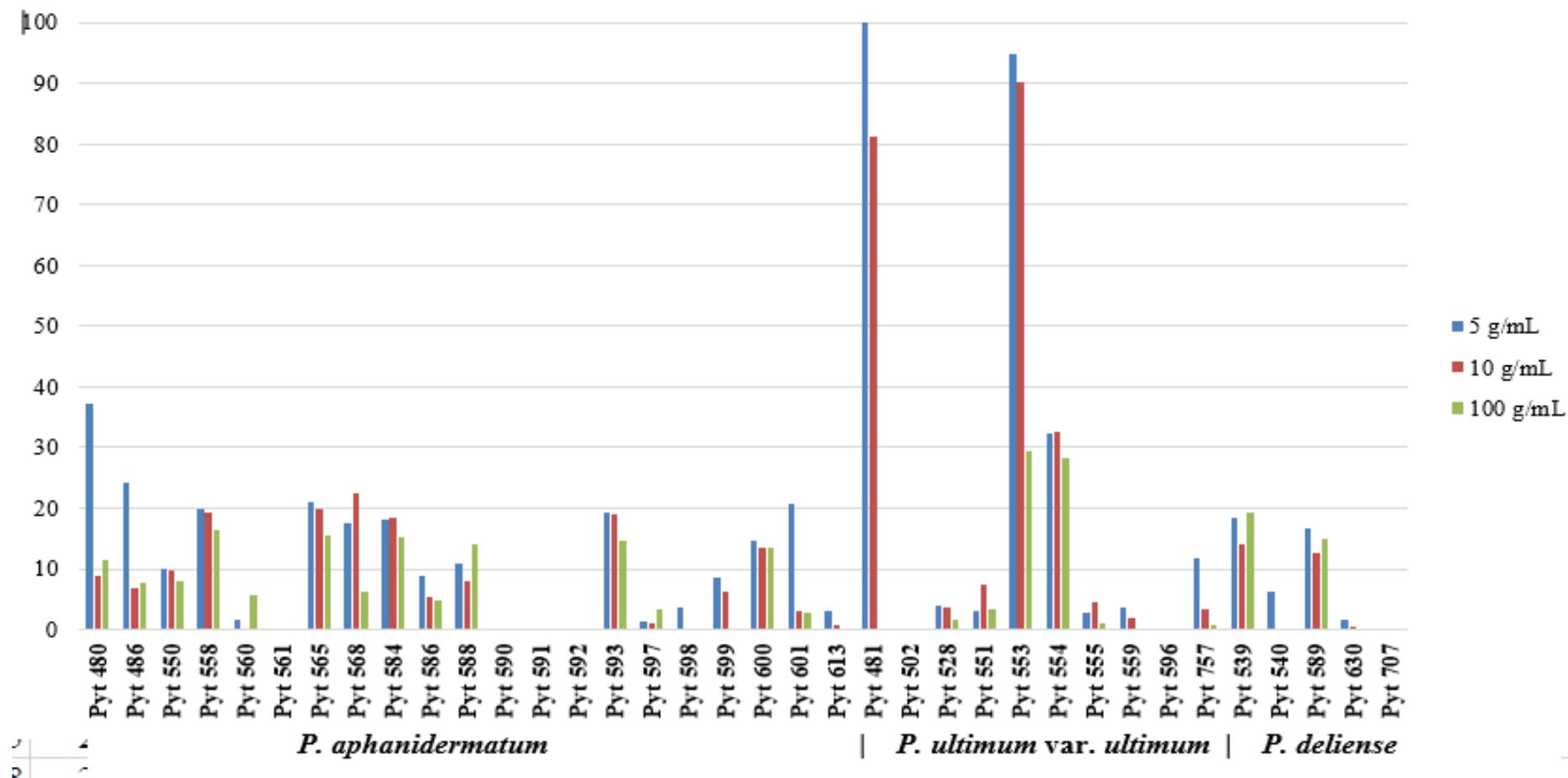


Figura 1. Crescimento micelial dos isolados de *P. aphanidermatum* (Pyt 480 a Pyt 613), *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 481 a Pyt 757) e *P. deliense* (Pyt 539 a Pyt 707) nas concentrações de 5, 10 e 100 g.mL⁻¹ de mefenoxam em meio de cultura comparados à testemunha sem fungicida (%). Valores representam as médias das repetições e dos dois experimentos. CV (%) = 7,98.

Entre os isolados de *P. splendens*, o isolado Pyt 504 cresceu 30% na concentração de 100 g.mL⁻¹, 31% na concentração de 10 g.mL⁻¹ e 35% na concentração de 5 g.mL⁻¹ e diferiu estatisticamente de todos os isolados em todas as concentrações ($P \leq 0,05$). Os demais isolados dessa espécie, assim como os isolados de *P. myriotylum*, *P. sylvaticum*, *P. spinosum* e *P. acanthophoron*, apresentaram alta sensibilidade ao mefenoxam, com diâmetro do micélio menor que 5% do diâmetro da testemunha na concentração de 5 g.mL⁻¹ (Figura 2A). Apesar dos isolados de *P. tracheiphilum* também apresentarem alta sensibilidade ao mefenoxam, houve um crescimento micelial maior que os demais isolados, com diâmetro da colônia maior que 20% nas concentrações de 5 e 10 g.mL⁻¹ para os isolados Pyt 623 e Pyt 635 que diferiram estatisticamente dos demais ($P \leq 0,05$). Entre os isolados que não foram identificados em nível de espécie, os isolados Pyt 482, Pyt 580 e Pyt 643 não apresentaram crescimento micelial em nenhuma concentração, sendo os demais isolados classificados também como muito sensíveis, porém com diferença estatística que permitiu a formação de cinco grupos estatisticamente diferentes na concentração de 5 g.mL⁻¹ e quatro grupos nas concentrações de 10 e 100 g.mL⁻¹ ($P \leq 0,05$). Entre os isolados pertencentes ao gênero *Phytophthium*, os isolados Pyt 535 (*Phy. vexans*) e Pyt 650 (*Phy. chamehyphon*) foram altamente sensíveis em todas as concentrações de mefenoxam, não diferindo estatisticamente entre si em nenhuma concentração ($P > 0,05$). Apesar dos isolados de *Phy. cucurbitacearum* (Pyt 585 e Pyt 594) e *Phy. vexans* (Pyt 508) apresentarem algum crescimento micelial e diferirem estatisticamente entre si, também foram classificados como altamente sensíveis (Figura 2B).

**Porcentagem (%) do diâmetro da colônia
em cada concentração**

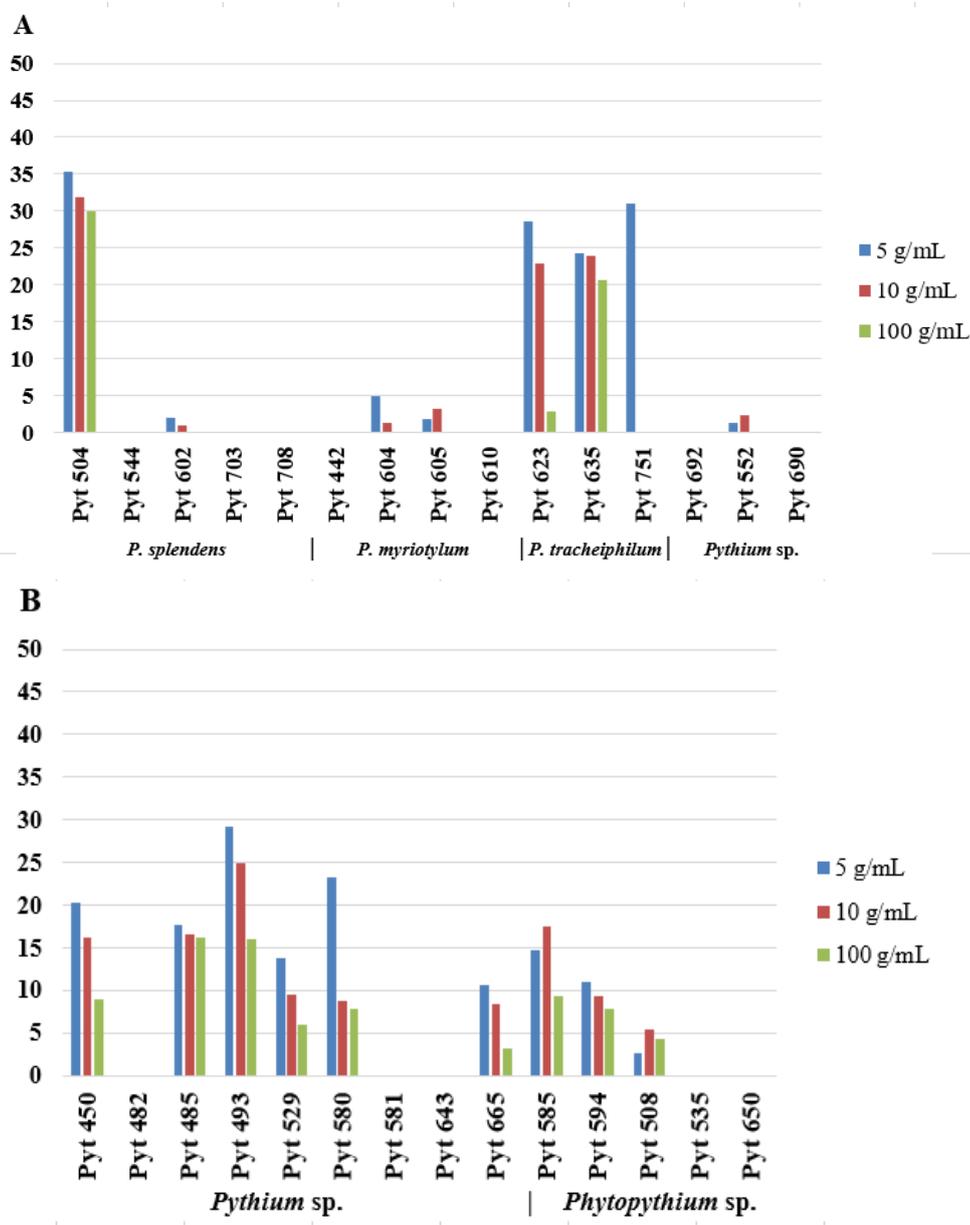


Figura 2. Crescimento micelial dos isolados nas concentrações de 5, 10 e 100 g.mL⁻¹ de mefenoxam em meio de cultura comparados à testemunha sem fungicida (%). **A.** *P. splendens* (Pyt 504 a Pyt 708); *P. myriotylum* (Pyt 442 a Pyt 610); *P. tracheiphilum* (Pyt 623, Pyt 635 e Pyt 751); *P. sylvaticum* (Pyt 692); *P. spinosum* (Pyt 552) e *P. acanthophoron* (Pyt 690). **B.** Isolados de *Pythium sp.* e isolados de *Phytophthium*, *Phy. cucurbitacearum* (Pyt 585 e Pyt 594), *Phy. vexans* (Pyt 508 e Pyt 535) e *Phy. chamaeophyon* (Pyt 650). Valores representam as médias das repetições e dos dois experimentos. CV (%) = 7,25 e CV (%) = 9,28, respectivamente.

3.2. Determinação da gama de hospedeiras e teste de patogenicidade em casa de vegetação

Os isolados que apresentaram gama de hospedeiras mais ampla, entre as cultivares avaliadas foram *P. myriotylum* (Pyt 604), *P. deliense* (Pyt 589), *P. aphanidermatum* (Pyt 586 e Pyt 600) e *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 502) (Tabela 1). *Pythium myriotylum* (isolado Pyt 604) infectou um maior número de plantas dentre as avaliadas, causando tombamento ou podridão da raiz em dez das 17 cultivares testadas. Entre eles, as duas cv. de tomate (incidência de 50% e 66% para cv. Santa Clara e cv. Viradoro, respectivamente), todas as plantas de batata cv. Camila, pimentão e pimenta (100%), as cvs. Brasília (83%) e Planalto (66%) de cenoura, o quiabo (16%), o melão (16%) e a rúcula (50%). Já *P. deliense* (Pyt 589), isolado do colo/raízes de tomate, causou sintomas em nove culturas, com incidência de 100% na cv. Santa Clara de tomate, na pimenta e no melão. Para as demais culturas, a incidência foi de 83% no tomate cv. Viradoro e na cv. Verdão de coentro, de 66% na cv. Planalto de cenoura e no quiabo, 33% na cv. Brasília de cenoura e 16% na Abóbora Jabras. O isolado Pyt 540 (*P. deliense*) afetou apenas o pimentão (33%), a cv. Brasília (83%) e o melão (66%). O isolado Pyt 586 (*P. aphanidermatum*) causou podridão no colo e na raiz das duas cvs. de tomate e da cv. Santa Cruz de quiabo (100% de incidência), na batata cv. Ágatha 66% das plantas apresentam sintomas e no melão cv. Araguaia 83%. Já o isolado Pyt 600 (*P. aphanidermatum*) foi capaz de afetar as mesmas hospedeiras que o isolado Pyt 586, além do pimentão (66%) e das duas cultivares de cenoura, 50% das plantas da cv. Brasília e 100% das plantas da cv. Planalto. O isolado de *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 502) também afetou as duas cultivares de tomate, com incidência de 66% na cv. Santa Clara e 50% na cv. Viradoro. Em cenoura, tanto a cv. Brasília (16%) e a cv. Planalto (33%) apresentaram sintomas, no quiabo a incidência foi de 100%, melão de 83% e rúcula de 50% (Tabela 1).

Entre os isolados com gama de hospedeiras mais restrita, o isolado de *P. spendens* (Pyt 544) causou podridão em todas as plantas de pimentão (100%), na batata (83%), na rúcula (66%) e no melão (16%). *P. acanthophoron* foi patogênico as duas cultivares de cenoura (66% na cv. Brasília e 50% na cv. Planalto) e ao coentro (83%) enquanto *P. spinosum* (Pyt 552) afetou apenas a cv. Viradoro de tomate (83%) e a cv. Camila de batata (66%). Já *P. sylvaticum* afetou apenas pimentão (83%), assim como *P. tracheiphilum* (Pyt 635) foi patogênico apenas a alface (16%).

Entre os isolados de *Phytophthora*, *Phy. chamaeophyon* (Pyt 650) foi reisolado da pimenta cv. Biquinho (66%) e da hospedeira de origem, rúcula cv. Rococó (33%). *Phy. vexans*

(Pyt 535) causou podridão na cv. Brasília (66%), no coentro (83%) e na rúcula (50%). O isolado de *Phy. cucurbitacearum* (Pyt 594) não foi patogênico a nenhuma das cultivares avaliadas.

Dentre os isolados que não puderam ser identificados apenas com dados moleculares, a cultivar Camila de batata foi suscetível aos isolados Pyt 450, Pyt 485 e Pyt 583, com incidência de 83% para o primeiro e 33% para os dois últimos isolados. O coentro apresentou sintomas após a inoculação de Pyt 485, Pyt 493, Pyt 583 (incidência de 50%), Pyt 643 e Pyt 665 (incidência de 66%). A cv. Planalto de cenoura apresentou sintomas quando inoculada com os isolados Pyt 493, Pyt 529 (incidência de 33% para os ambos), e além dessa a cv. Brasília após ser inoculada com Pyt 665. O isolado Pyt 583 afetou a cv. Riva de cebola e o isolado Pyt 450 foi patogênico ao repolho (16%), além da batata (cv. Camila). Rúcula (66%) e alface (33%) apresentaram sintomas após a inoculação do isolado Pyt 493.

Tabela 1. Porcentagem de plantas de hortaliças com sintomas pelo total de plantas inoculadas com isolados de *Pythium* e *Phytophthium*.

	Hospedeiras																		
	<i>Solanum lycopersicon</i>		<i>Solanum tuberosum</i>		<i>Capsicum annuum</i>	<i>Capsicum chinense</i>	<i>Allium cepa</i>		<i>Daucus carota</i>		<i>Coriandrum sativum</i>	<i>Abelmoschus esculentus</i>	<i>Cucumis melo</i>	<i>Cucurbita moschata</i>	<i>Cucurbita moschata x maxima</i>	<i>Eruca sativa</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	<i>Lactuca sativa</i>	
	cv. Santa Clara	cv. Viradoro	cv. Camila	cv. Ágatha	cv. Tico	cv. Biquinho	cv. Alfa Tropical	cv. Riva	cv. Brasília	cv. Planalto	cv. Verdão	cv. Santa Cruz	cv. Araguaia	var. brasileira	cv. Jabras	cv. Rocoó	cv. União	cv. Vanda	
<i>P. acanthophorum</i> (Pyt.690)	-	-	-	NA	-	-	-	-	66	50	83	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. aphanidemmatum</i> (Pyt.586)	100	100	NA	66	-	-	-	-	-	-	-	100	83	-	-	-	-	-	
<i>P. aphanidemmatum</i> (Pyt.600)	83	100	NA	33	66	-	-	-	50	100	-	83	83	-	-	-	-	-	
<i>P. deliense</i> (Pyt.589)	100	83	NA	-	-	100	-	-	33	66	83	66	100	-	16	-	-	-	
<i>P. deliense</i> (Pyt.540)	-	-	-	NA	33	-	-	-	83	-	-	-	66	-	-	-	-	-	
<i>P. myriophyllum</i> (Pyt.604)	50	66	100	NA	100	100	-	-	83	66	-	16	16	-	-	50	-	-	
<i>P. spinosum</i> (Pyt.552)	-	83	66	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. splendens</i> (Pyt.544)	-	-	83	NA	100	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	66	-	-	
<i>P. sylvaticum</i> (Pyt.692)	-	-	-	NA	83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. tracheiphilum</i> (Pyt.635)	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	
<i>P. ultimum</i> (Pyt.502)	66	50	NA	-	-	-	-	-	16	33	-	100	83	-	-	50	-	-	
<i>Pythium</i> sp. (Pyt.450)	-	-	83	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	
<i>Pythium</i> sp. (Pyt.485)	-	-	33	NA	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pythium</i> sp. (Pyt.493)	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	33	50	-	-	-	-	66	-	33	
<i>Pythium</i> sp. (Pyt.529)	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pythium</i> sp. (Pyt.583)	-	-	33	NA	-	-	-	16	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pythium</i> sp. (Pyt.643)	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	66	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pythium</i> sp. (Pyt.665)	-	-	-	NA	-	-	-	-	100	66	66	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Phy. chamaelyphon</i> (Pyt.650)	-	-	-	NA	-	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-	
<i>Phy. cucurbitacearum</i> (Pyt.594)	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Phy. vexans</i> (Pyt.535)	-	-	-	NA	-	-	-	-	66	-	83	-	-	-	-	50	-	-	

NA: Não avaliado
 - : planta sem sintomas

Na avaliação da patogenicidade na hospedeira de origem (Figura 3), em tomate, os isolados de *P. aphanidermatum* (Pyt 586 e Pyt 600) causaram tombamento e podridão radicular nas duas cultivares avaliadas (cv. Santa Clara e cv. Viradoro). Os isolados Pyt 439 (*P. myriotylum*) e Pyt 450 (*Pythium* sp.) causaram podridão radicular apenas na cv. Santa Clara. Os isolados de *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 502) e de *P. deliense* (Pyt 589) foram testados no ensaio de gama de hospedeiras, sendo capaz de causar sintomas nas duas cultivares de tomate. Em alface, os isolados associados ao sintoma de podridão foliar, pertencente à espécie *P. tracheiphilum* (Pyt 635) e *Pythium* sp. (Pyt 493) também causaram podridão de colo de plantas de alface, assim como *P. deliense* (Pyt 630) que foi encontrado causando podridão na raiz nessa cultura. Entre os isolados inoculados em folhas de alface, *P. aphanidermatum* (Pyt 590), *P. ultimum* (Pyt 553), *P. spinosum* (Pyt 552), *P. deliense* (Pyt 540) e *P. tracheiphilum* (Pyt 635) causaram sintomas de podridão foliar de alface destacadas. Entre os isolados não identificados em nível de espécie (Pyt 493 e Pyt 529), apenas Pyt 529 não causou queima das folhas inoculadas.

Para as demais hospedeiras, os isolados de *P. aphanidermatum* (Pyt 483, Pyt 545, Pyt 633, Pyt 645, 664, Pyt 698 e Pyt 704) causaram podridão no colo e/ou na raiz de rúcula, quiabo, melancia, batata, couve chinesa e espinafre, respectivamente. Os isolados de *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 595, Pyt 618, Pyt 663 e Pyt 698) foram patogênicos à batata, beterraba, salsa e repolho. Em coentro, o isolado Pyt 690 (*P. acanthophoron*) também causou sintomas, assim como o isolado Pyt 604 (*P. myriotylum*) causou sintomas em pimenta e Pyt 544 (*P. splendens*) em melão. O isolado Pyt 665 (*Pythium* sp.) foi patogênico às duas cultivares de cenoura, cv. Planalto e a cv. Brasília e o isolado Pyt 581 (*Pythium* sp.) foi capaz de induzir sintomas de podridão no colo em milho doce.

Entre os isolados de *Phytophythium*, o isolado *P. chamaehyphon* (Pyt 650) foi capaz de causar sintomas de podridão no colo da hospedeira de origem, a rúcula, entretanto os isolados Pyt 594 (*Phy. cucurbitacearum*) e Pyt 535 (*Phy. vexans*) provenientes de morangueiro não foram patogênicos a essa cultura (cv. Oso Grande). Os demais isolados que após a inoculação não foram observados sintomas característicos de doenças causadas por *Pythium*, foram os isolados Pyt 627 (*Phy. cucurbitacearum*) e Pyt 681 (*P. ultimum* var. *ultimum*) em grão de bico, Pyt 692 (*P. sylvaticum*) em cebola e Pyt 583 (*P. aphanidermatum*) em milho doce. O isolado Pyt 643 (*Pythium* sp.) também não causou doença nas cultivares de cenoura avaliadas.

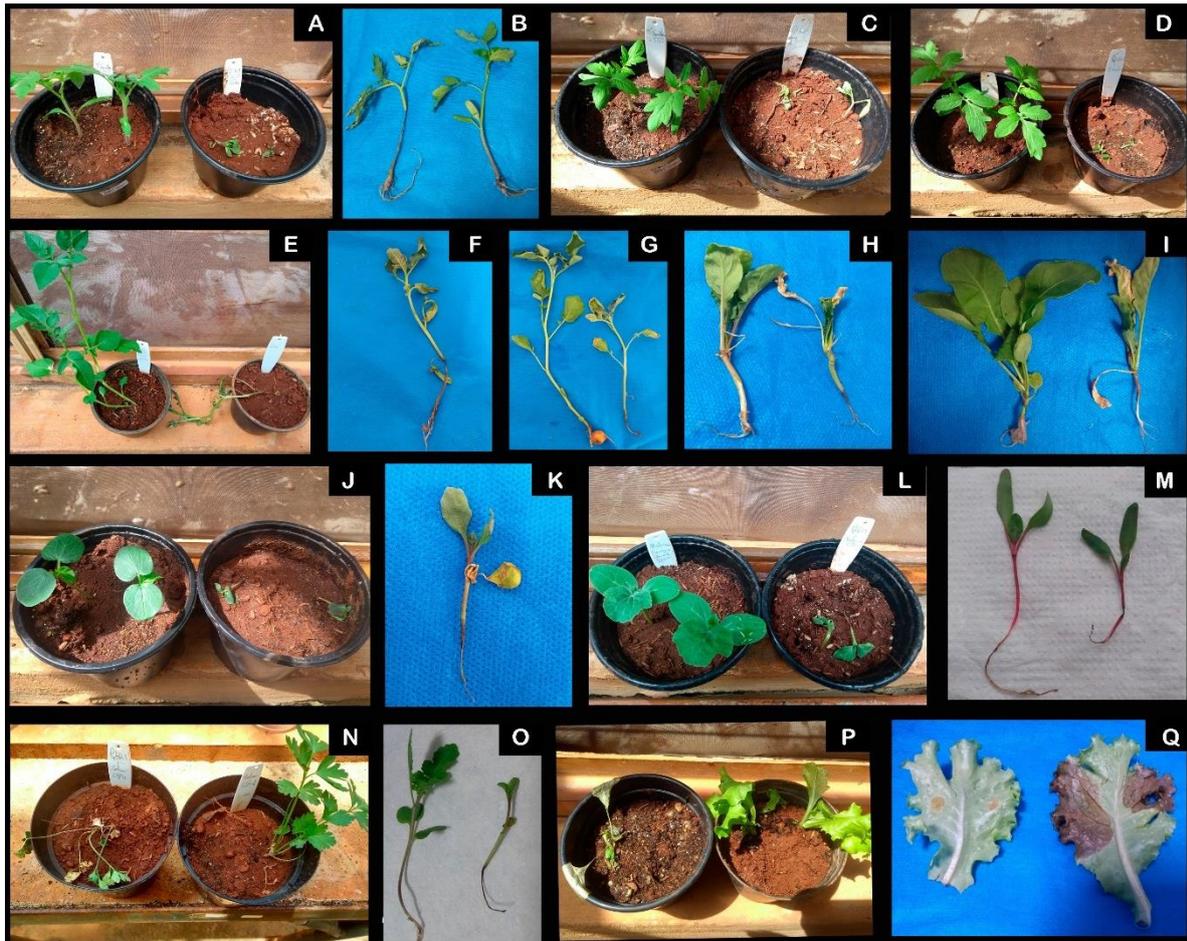


Figura 3. Sintomas de tombamento e podridão no colo nas hospedeiras de origem inoculadas com isolados de *Pythium* e *Phytophthium*: **A-D**. Tomate (*Solanum lycopersicon*) inoculado com os isolados, **A**. *P. deliense* (Pyt 439) x cv. Santa Clara, **B**. *Pythium* sp. (Pyt 450) x cv. Santa Clara, **C**. *P. splendens* (Pyt 602) x cv. Santa Clara e **D**. *P. splendens* (Pyt 602) x cv. Viradoro; **E-G**. Batata (*Solanum tuberosum*) cv. Camila **E-F**. *P. aphanidermatum* (Pyt 645), **G**. *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 595); **H-I**. Rúcula (*Eruca vesicatoria*) cv. Rococó **H**. *Phy. chamaehyphon* (Pyt 650) e **I**. *P. aphanidermatum* (Pyt 483). **J**. Quiabo (*Abelmoschus esculentus*) x *P. splendens* (Pyt 504) **K**. Repolho (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) cv. União x *P. aphanidermatum* (Pyt 698); **L**. Melancia (*Citrulus lanatus*) Crimson Sweet x *P. aphanidermatum* (Pyt 633). **M**. Beterraba (*Beta vulgaris*) cv. Maravilha x *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 618). **N**. Salsa lisa (*Petroselinum crispum*) x *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 663). **O**. Mostarda (*Brassica juncea*) cv. Gisilba x *P. oopapillum* (Pyt 749). **P-Q**. Alface (*Lactuca sativa*) cv. Vanda **P**. *P. deliense* (Pyt 630) e **Q**. *P. tracheiphilum* (Pyt 635).

4. DISCUSSÃO

Durante os testes de sensibilidade ao mefenoxam foi possível observar uma variação na inibição do crescimento micelial entre as espécies e entre isolados da mesma espécie. A maioria dos isolados avaliados foi muito sensível à menor concentração do fungicida ($5 \mu\text{g/L}^{-1}$). Embora a resistência tenha sido descoberta há mais de duas décadas, a frequência de isolados de *Pythium* e *Phytophythium* resistentes encontradas em diversos estudos ainda é baixa, comparado com patógenos foliares (**Reuveni et al., 1980; Goodwin et al., 1996; Pintore et al., 2016**). **Taylor et al. (2002)** analisaram durante 4 anos (1997-2000) isolados de *Pythium* obtidos em 16 estados americanos e duas províncias canadenses, e encontraram apenas 4% de isolados de *P. ultimum* resistentes à mefenoxam. Da mesma forma, **Lu et. al. (2012)** ao analisar 169 isolados de *Pythium* spp. associados à cenoura, observaram a presença de 7% de isolados resistentes. Mais recentemente, o trabalho de **Radmer et al. (2017)** confirmou a eficiência de mefenoxam na redução do crescimento micelial de isolados de *Pythium* associados à soja.

Fungicidas usados no tratamento de sementes, como o mefenoxam, apresentam menor risco de desenvolvimento de resistência, uma vez que as quantidades utilizadas são baixas, o tempo em que permanecem ativos no solo é limitado e sua área de efeito é localizada (**Brantner & Windels, 1998**). Além disso, a baixa frequência de isolados resistentes pode refletir a pouca exposição dos isolados ao fungicida. No Brasil, poucos produtores de hortaliças usam o mefenoxam para controle de doenças causadas por *Pythium* spp e *Phytophythium* spp., assim como o registro desse ingrediente ativo para controle deste patógeno em hortaliças não é observado (**AGROFIT, 2020**).

O isolado de *P. sylvaticum* (Pyt 692) foi muito sensível ao mefenoxam, não apresentando crescimento micelial na menor concentração desse fungicida ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$), em contrapartida a outros trabalhos em que isolados dessa espécie foram resistentes à maior dose do fungicida (**Martinez et al., 2005; Del Castillo Múnera & Hausbeck, 2016**). Da mesma forma que os resultados obtidos por **Williams-Woodward & De Mott (2014), Lookabaugh et al. (2015)** e **Mufunda et al., (2017)**, os isolados de *P. myriotylum* e *P. aphanidermatum* testados foram muito sensíveis ao fungicida.

Ao contrário dos demais, dois isolados de *P. ultimum* apresentaram reação intermediária (Pyt 481 e Pyt 553) apresentando um crescimento micelial na concentração de $10 \mu\text{g/L}^{-1}$ de mefenoxam em meio de cultura próximo àquele observado em placas sem adição de fungicida, resultado corroborado por **Weiland et al. (2014)** que encontrou dois isolados de *P. ultimum* resistentes em viveiros de plantas arbóreas. Esses isolados foram provenientes de

plantas de alface com sintomas de podridão foliar nos estados do Rio Grande do Sul (Pyt 481) e São Paulo (Pyt 553). Como os produtores de alface destas regiões utilizam o mefenoxam com frequência para controle do míldio, doença foliar causada por outro oomiceto (*Bremia lactucae* Regel), isto pode explicar a presença de isolados de *Pythium* resistentes ou parcialmente resistentes ao fungicida infectando folhas de alface. Da mesma forma, outros estudos confirmaram a presença de isolados de *Pythium* com resistência ao mefenoxam em baixas proporções (Moorman *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Allain-Boulé *et al.*, 2004). Apesar de ser baixa a proporção desses isolados, a detecção de resistência pode ser um alerta para necessidade de rotação de ingredientes ativos, evitando-se desta forma exercerem uma pressão de seleção sobre estas populações do patógeno. Isto evitaria o surgimento de populações com menor sensibilidade ao fungicida, dificultando o controle da doença no futuro.

Todos os isolados avaliados das espécies de *Phytophthora* encontradas nesse estudo foram sensíveis à menor concentração do fungicida em meio de cultura (5 g.mL^{-1}), em contraste ao resultado obtido por Williams-Woodward & De Mott (2014), em que todos os isolados de *Phytophthora* coletados de plantas ornamentais na Geórgia (EUA) foram resistentes ao mefenoxam.

A maioria das espécies avaliadas nesse estudo, entre elas *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. myriophyllum* e *P. ultimum* var. *ultimum*, são espécies com um grande número de relatos causando doenças em diversas espécies de plantas (Hendrix & Campbell, 1973; van der Plaats-Niterink, 1981; Farr & Rossman, 2020; Mendes & Urban, 2020). Dessa forma, os isolados representativos dessas espécies foram patogênicos à maioria das culturas olerícolas avaliadas no ensaio de gama de hospedeiras.

Os dois isolados de *P. aphanidermatum* apresentaram patogenicidade diferencial, sendo que o isolado Pyt 600 afetou oito cultivares, enquanto Pyt 586 não afetou pimentão e as duas cultivares de cenoura. Da mesma forma os dois isolados de *P. deliense* (Pyt 589 e Pyt 540) apresentaram diferenças quanto à patogenicidade nas diferentes cultivares avaliadas. Essa variação em patogenicidade observada pode estar relacionada à forte diferença em virulência e agressividade encontrada entre isolados de *Pythium* (Grover & Dutt, 1973; van der Plaats-Niterink, 1981; Owen-Going *et al.*, 2003; Patekoski & Zottarelli, 2009), e à diferença em suscetibilidade observada entre espécies hospedeiras e suas variedades (Utkhede *et al.*, 2000). Esta circunstância explica em parte o motivo do emprego de diferentes isolados de cada espécie e diferentes culturas vegetais apresentarem resultados divergentes em ensaios de patogenicidade (Higginbotham *et al.*, 2004; Zitnick-Anderson & Nelson Jr., 2015; Sauvageau *et al.*, 2019). A temperatura é um dos fatores ambientais de maior influência sobre

o potencial patogênico de *Pythium* (Sutton *et al.*, 2006). Isso explica em parte o fato de *P. myriotylum*, *P. deliense* e *P. aphanidermatum* terem afetado mais espécies, já que a infecção é mais severa entre 30 e 35°C, condição corriqueira na casa de vegetação onde o ensaio foi realizado. Apesar de temperaturas abaixo de 23°C serem mais favoráveis à infecção por *P. ultimum* (Thomson *et al.*, 1971), nesse ensaio os isolados avaliados causaram sintomas em 7 cultivares entre as 17 testadas, confirmando estudos prévios em que a agressividade de isolados de *P. ultimum* não foi afetada pela temperatura (Wei *et al.*, 2011).

Pythium myriotylum afetou a maioria das culturas testadas para gama de hospedeiras, entre elas batata, cenoura, melão, pimentão, pimenta, quiabo, rúcula e tomate. Anteriormente, esta espécie de oomiceto foi relatada como patógeno de amendoim (*Arachis hypogaea*), berinjela (*Solanum melongena*), chuchu (*Sechium edule*), cenoura (*Daucus carota*), batata (*Solanum tuberosum*), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), pepino (*Cucurbita pepo*) quiabo (*Abelmoschus esculentus*), rabanete (*Raphanus sativus*), soja (*Glycine max* L.) e tomate (*Solanum lycopersicon*) (van der Plaats-Niterink, 1981; Mendes & Urben, 2020).

O isolado de *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 502) também afetou as duas cultivares de tomate e cenoura, quiabo, melão e rúcula. No Brasil, essa espécie já foi associado a doenças em amendoim (*Arachis hypogaea*), grão de bico (*Cicer arietinum* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), *Poinsettia* sp., cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), jiló (*Solanum gilo* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), soja (*Glycine max* Merr.) e tomate (*Solanum lycopersicon*) (Mendes & Urben, 2020).

Apesar do isolado de *P. sylvaticum* ter sido isolado de cebola com podridão de raiz, não foi constatado o desenvolvimento de doença nas duas cultivares de cebola inoculadas, sendo *P. sylvaticum* patogênico apenas ao pimentão cv. Tico, podendo outro patógeno estar associado ao sintoma de podridão em raízes de cebola.

Em alface, apenas os isolados de *P. tracheiphilum* (Pyt 635) e *Pythium* sp. (Pyt 493) foram patogênicos no teste de gama de hospedeiras. Apesar desse resultado, mais de 14 espécies de *Pythium* já foram encontradas em campos de produção de alface, sendo associadas a sintomas como podridão radicular, podridão de folhas, murcha e *damping-off* (Blancard *et al.*, 2003). Apesar de Van der Heyden *et al.* (2019) ter encontrado nove espécies diferentes de *Pythium* infectando raízes de alface, esses autores constataram que *P. tracheiphilum* é considerada a espécie de *Pythium* predominante na cultura da alface, chegando a causar perda de produtividade maiores que 50%. Neste trabalho, *P. tracheiphilum* foi associado à podridão foliar, sintoma descrito por Matta (1965) como podridão que se inicia no colo e necrose vascular, já que o xilema é local onde essa espécie passa maior parte do seu ciclo de vida

(Jacquet, 1979). A espécie *P. tracheiphilum* já foi encontrado infectando alface na Holanda (Blok & van der Plaats-Niterink 1978), na América do Norte, Reino Unido e Austrália (Hall 1989; Kumar *et al.* 2007; Nordskog *et al.* 2008). No Brasil, ainda não foi catalogada a presença de *P. tracheiphilum* em nenhuma cultura (Maia *et al.*, 2015; Farr & Rossman, 2020; Mendes & Urben, 2020).

A espécie *P. tracheiphilum* é uma das poucas que apresenta uma gama de hospedeiras restrita, sendo a rotação de culturas uma alternativa em áreas onde são predominantes (Bebegal *et al.* 2012; Van der Heyden *et al.*, 2019). Outra alternativa para o controle em campos de produção convencional de alface é o controle químico com metalaxil-M. Os isolados de *Pythium* provenientes de alface apresentaram alta sensibilidade ao fungicida mefenoxam, da mesma forma que outros estudos já constataram anteriormente (Martinez *et al.*, 2005; Radmer *et al.*, 2017).

A espécie *P. spinosum* foi patogênico a batata e tomate, sendo apenas esta última hospedeira já reconhecida dessa espécie que ataca uma grande variedade de plantas (Yamamoto & Maeda, 1961; van Der Plaats-Niterink, 1981). O isolado dessa espécie foi associado ao sintoma de podridão foliar em alface, e mesmo já sendo reconhecido como patógeno dessa cultura (Ellis & Cox, 1951), *P. spinosum* não causou sintomas no colo e na raiz de alface. *P. acanthophoron* é considerado um patógeno fraco de abacaxi (*Ananas sativus*), afetando as folhas dessa cultura (Sideris, 1932). No ensaio de gama de hospedeiras, foi patogênico apenas à cenoura e ao coentro.

Entre as espécies de *Phytophythium* testadas, *Phy. cucurbitacearum* não foi reisolado de nenhuma das culturas testadas e também não causou sintomas em morangueiro e grão de bico, hospedeiros de origem. Apesar disso, essa espécie já foi isolada de plantas sintomáticas de melão, melancia, batata, tomate, *Hibiscus* sp., *Ipomoea* sp. (van der Plaats-Niterink, 1981). Já *Phy. chamaeophyon* foi patogênico à pimenta e rúcula, sendo a patogenicidade dessa espécie pouco conhecida. *Phy. vexans*, apesar de não ser patogênico à hospedeira de origem (morangueiro), no teste de gama de hospedeiras foi reisolado de cenoura cv. Brasília e coentro cv. Verdão. No Brasil, *Phy. vexans* já foi associada a plantas de *Strelitzia* sp. (Carvalho, 1965), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) (Valdebenito-Sanhueza *et al.* 1984), berinjela (*Solanum melongena* L.) e jiló (*Solanum gilo*) (Zambolim *et al.* 1996).

As espécies *P. ultimum* (Pyt 649) isolada de cebolinha, *P. deliense* (Pyt 562) isolada de quiabo e *P. aphanidermatum* (Pyt 461 e Pyt 537), isoladas de abóbora e coentro, respectivamente, assim como *P. oopapillum* (Pyt 456) de alface, não foram avaliadas para gama de hospedeiras e patogenicidade na hospedeira de origem, já que todas as tentativas de recuperar

os isolados não tiveram sucesso. Como já relatado, para algumas espécies de *Pythium*, entre elas *P. oopapillum*, já tem sido reportada a dificuldade de recuperação após preservação em coleção por longos períodos (Bala *et al.*, 2010).

5. CONCLUSÕES

Os resultados de sensibilidade *in vitro* de *Pythium* spp. e *Phytophythium* spp. a mefenoxam demonstram que esse fungicida é uma alternativa viável para o controle de doenças causadas por esses oomicetos em campos de produção de hortaliças no Brasil. Entretanto, são necessários mais estudos para analisar a eficiência de mefenoxam tanto em casa de vegetação, durante a produção de mudas, quanto em campo, nos estágios iniciais de desenvolvimento das culturas, condição em que são mais suscetíveis a esse patógeno, dando mais suporte a futuros registros desse fungicida para hortaliças no Brasil.

As espécies prevaletentes nesse estudo, *P. aphanidermatum*, *P. deliense* e *P. ultimum* var. *ultimum*, além de apresentarem distribuição em várias regiões produtoras de hortaliças do Brasil, possuem uma gama de hospedeiras ampla entre as cultivares das principais culturas, dificultando a adoção de rotação de culturas. Apesar dos isolados de *P. myriotylum* terem sido encontrados apenas em pimenta e tomate, o isolado (Pyt 604) avaliado no ensaio de gama de hospedeira foi patogênico a grande parte das cultivares selecionada.

Mesmo sendo necessários futuros ensaios para comprovar a patogenicidade de isolados de *Pythium* e *Phytophythium* nas diferentes culturas olerícolas, as espécies *P. acanthophoron*, *P. spinosum*, *P. sylvaticum*, *P. tracheiphilum*, *Phy. cucurbitacearum*, *Phy. chamaehyphon* e *Phy. vexans* apresentaram gama de hospedeiras muito restrita entre as culturas avaliadas, sendo um indício da possibilidade de rotação com culturas não hospedeiras nas regiões em que ocorrem.

Dessa foram, esse estudo disponibiliza a reação das principais espécies de hortaliças frente às espécies de *Pythium* e *Phytophythium* presentes nos principais estados produtores de hortaliças no Brasil, e indica a viabilidade de uso de mefenoxam, após registro, para essas culturas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Consultado em 12/01/2020.

ALLAIN-BOULÉ, N.; LÉVESQUE, C.A.; MARTINEZ, C.; BÉLANGER, R.R. & TWEDDELL, R.J. 2004. Identification of *Pythium* species associated with cavity spot lesions on carrots in eastern Quebec. *Can. J. Plant Pathol.* 26:365-370.

BALA, K.; ROBIDEAU, G.P.; DESAULINERS, N.; DE COCK, A.W.A.M. & LEVESQUE, C.A. 2010. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia* 25:22-31.

BERBEGAL, M.; ALVAREZ, L.A.; PEREZ-SIERRA, A. & ARMENGOL, J. 2012. Identification of *Pythium tracheiphilum* as the causal agente of vascular necrosis of endive (*Cichorium endivia*) in Spain. *Phytoparasitica* 40:1-4.

BLANCARD, D.; LOT, H. & MAISONNEUVE, B. 2003. Diseases of lettuces: identification, detection and control. INRA Editions, Paris.

BLOK, I. & VAN DER PLAATS-NITERINK, A. J. 1978. *Pythium uncinulatum* sp. nov. and *P. tracheiphilum* pathogenic to lettuce. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 84:135-147.

BRANTNER, J.R. & WINDELS, C.E. 1998. Variability in sensitivity to metalaxyl in vitro, pathogenicity, and control of *Pythium* spp. on sugar beet. *Plant Disease* 82:896-899.

CARVALHO, P.C.T. 1965. Ocorrência no Brasil de algumas espécies de *Pythium* Pringsheim de interesse à olericultura. *Rickia* 2:89-106.

DAVIDSE, L.C.; HOFFMAN, A.E. & VELTHUIS, G.C.M.1983. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nucleic from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Experimental Mycology* 7:344-361.

DEL CASTILLO MÚNERA, J. & HAUSBECK, M.K. 2016. Characterization of *Pythium* species associated with greenhouse floriculture crops in Michigan. *Plant Disease* 100: 569:576.

ELLIS, D.E. & COX, R.S. 1951. The etiology and control of lettuce damping-off. *Tech. Bull. N. Carol. Agric. Exp. Stn* 94: 1-33.

EL-MOHAMEDY, R.S.R. 2012. Biological control of *Pythium* root rot of broccoli plants under greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Technology* 8: 1017-1028.

ELSHAHAWY, I.E. & EL-MOHAMEDY, R.S. 2019. Biological control of *Pythium* damping-off and root-rot diseases of tomato using *Trichoderma* isolates employed alone or in combination. *Journal of Plant Pathology* 101: 597-608.

FARR, D.F. & ROSSMAN, A.Y. 2012. Fungal nomenclature database, systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA.

FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)* 35:1039-1042.

FRAC INTERNACIONAL. 2019. FRAC CodeList ©*2019: Fungal control agentes sorted by cross resistance pattern and mode of action <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019.pdf> Consultado em: 11/01/2020.

GOODWIN, S.B.; SUJKOWSKI, L.S. & FRY, W. E. 1996. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathology* 86:793–800.

GRIJALBA, P.E. & RIDAO, A.D.C. 2017. Controle químico de *Pythium* spp. en plántulas de soja. *RIA. Revista de investigaciones agropecuárias* 43: 67-71.

GROVER, R.K. & DUTT, S. 1973 Morphological and pathological variability in *Pythium aphanidermatum*. *Indian Phytopathology* 26:237-244.

GUPTA, S.L.; PAIJWAR, M.S. & RIZVI, G. 2013. Biological management of rot disease of ginger (*Zingiber officinale* Rosc). *Trends Biosci* 6:302.

HALL, G. 1989. Unusual or interesting records of plant pathogenic oomycetes. *Plant Pathology* 38:604-611.

HENDRIX, F.F. & CAMPBELL, W.A. 1973. *Pythium* as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 11:77-98.

HERMANN, D.& GISI, U. 2012. Fungicide resistance in oomycetes with special reference to *Phytophthora infestans* and phenylamides. In: THIND, T.S. Fungicide resistance in crop protection: risk and management. CABO, Wallingford, pp 133-140.

HIGGINBOTHAM, R.W.; PAULITZ, T.C., & KIDWELL, K.K. 2004. Virulence of *Pythium* species isolated from wheat fields in eastern Washington. *Plant Disease* 88:1021-1026.

HOLMES, K.A.; BENSON, D.M.; TALBERT, L.E.; BLAKE, N.K.; CHEE, P.W.; BLAKE, T.K. & MAGYAR, G.M. 1994. Evaluation of *Phytophthora parasítica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasítica* on *Catharanthus roseus*. *Plant Disease* 78:193-199.

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

KUMAR, S.; RAY, E.J.; DAVISON, E.M.; CUNNINGTON, J.H. & DE ALWIS, S. 2007. First record of *Pythium tracheiphilum* associated with lettuce wilt and leaf blight in Australia. *Australasian Plant Disease Notes* 2:7-9.

LAMICHHANE, J.R.; DÜRR, C.; SCHWANCK, A.A.; ROBIN, M.H.; SARTHOU, J.P.; CELLIER, V.; MESSÉAN, A. & AUBERTOT, J.N. 2017. Integrated management of damping-off diseases. A review. *Agronomy for sustainable development* 37:10.

LOOKABAUGH, E.C. IVORS, K.L. & SHEW, B.B. 2015. Mefenoxam sensitivity, aggressiveness, and identification of *Pythium* species causing root rot on floriculture crops in North Carolina. *Plant Disease*. 99:1550-1558.

LU, X.H.; MICHAEL DAVIS, R.; LIVINGSTON, S.; NUNEZ, J. & HAO, J.J. 2012. Fungicide sensitivity of *Pythium* spp. associated with cavity spot of carrot in California and Michigan. *Plant Disease*. 96:711-727.

MAIA, L.C.; CARVALHO JÚNIOR, A.A.D.; CAVALCANTI, L.D.H.; GUGLIOTTA, A.D.M.; DRECHSLER-SANTOS, E.R.; SANTIAGO, A.L.D.A.; ...& SOARES, A.M.D.S. 2015. Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia* 66:1033-1045.

MARTINEZ, C.; LÉVESQUE, C.A.; BÉLANGER, R.R. & TWEDDELL, R.J. 2005. Evaluation of fungicides for the control of carrot cavity spot. *Pest Manag Sci* 61:767-771.

MATTA, A. 1965. Una malattia della lattuga prodotta da una nuova specie di *Pythium*. *Phytopatologia Meditteranea* 4, 48–53.

MENDES, M.A.S. & URBEN, A.F. 2020. Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Consultado em: 18/4/2020.

MOORMAN, G.W.; KANG, S.; GEISER, D.M & KUM, S.H. 2002. Identification and characterization of *Pythium* species associated with green house floral crops in Pennsylvania. *Plant Disease* 86:1227-1231.

MUFUNDA, F.; MUZHINJI, N.; SIGOBODHLA, T.; MARUNDA, M.; CHINHEYA, C.C. & DIMBI, S. 2017. Characterization of *Pythium* spp. associated with root rot of tobacco seedlings produced using the float tray system in Zimbabwe. *Journal of Phytopathology* 165:737-745.

NORDSKOG, B.; NÆRSTAD, R.; HERRERO, M.L.; SUNDHEIM, L. & HERMANSEN, A. 2008. Fungal pathogens in Norwegian lettuce fields. *Acta Agricultura e Scandinavica, Section B Soil & Plant Science* 58:230-235.

NZUNGIZE, J.R.; LYUMUGABE, F.; BUSOGORO, J.P. & BAUDOIN, J.P. 2012. *Pythium* root rot of common bean: biology and control methods. A review. *Biotechnol Agron Soc Environ* 16:405–413.

OLSON, H. & BENSON, D. 2011. Characterization of *Phytophthora* spp. on floriculture crops in North Carolina. *Plant Disease* 95:1013-1020.

OWEN-GOING, N.; SUTTON, J.C. & GRODZINSKI, B. 2003. Relationships of *Pythium* isolates and weevil plants in single-plant hydroponic units. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25:155-167.

PATEKOSKI, K.S. & ZOTTARELLI, C.L.A.P. 2009. Patogenicidade *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* e *Pythium dissotocum* em variedades de alface (*Lactuca sativa* L.). *Hoehnea* 36:161-172.

- PINTORE, I.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2016. Detection of mefenoxam-resistant strains of *Peronospora belbahrii*, the causal agent of basil downy mildew, transmitted through infected seeds. *Phytoparasitica* 44: 563-569.
- PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2015. Pythiales in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB94877>. Consultado em 15/04/2020.
- RADMER, L.; ANDERSON, G.; MALVICK, D.M.; KURLE, J.E.; RENDAHL, A. & MALLIK, A. 2017. *Pythium*, *Phytophthora*, and *Phytopythium* spp. Associated with soybean in Minnesota, their relative aggressiveness on soybean and corn, and their sensitivity to seed treatment fungicides. *Plant Disease* 101:62-72.
- REUVENI, M.; EYAL, H. & COHEN, Y. 1980. Development of resistance to metalaxyl in *Pseudoperonospora cubensis* *Plant Disease* 64: 1108-1109.
- SANDERS, P.L. 1984. Failure of metalaxyl to control *Pythium* blight on turfgrass in Pennsylvania. *Plant Disease* 68:776-777.
- SAUVAGEAU, A.; GRAVEL, V. & VAN DER HEYDEN, H. 2019. Soilborne inoculum density and environmental parameters influence the development of *Pythium* stunt caused by *Pythium tracheiphilum* in head lettuce crops. *Plant Disease* 103:1685-1692.
- SIDERIS, C.P. 1932. Taxonomic studies in the Family Pythiaceae. 2. *Pythium*. *Mycologia* 24: 14-61.
- SUTTON, J.C.; SOPHER, C.R.; OWEN-GOIN, T.N.; LIU, W.; GRODZINSK, B.; HALL, J.C. & BENCHIMOL, R.L. 2006. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathologica* 32:307-321.
- TAYLOR, R.; SALAS, B.; SECOR, G.; RIVERA, V. & GUDMESTAD, N. 2002. Sensitivity of North American isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefenoxam (metalaxyl). *Plant Disease* 86:797-802.
- THOMSON, T.B.; ATHOW, K.L. & LAVIOLETTE, F.A. 1971. The effect of temperature on the pathogenicity of *Pythium aphanidermatum*, *P. dearyanum* and *P. ultimum* on soybean. *Phytopathology* 61:933-935.
- UTKHEDE, R.S.; LEVESQUE, C.A. & DINH, D. 2000. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22:138-144.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; MILANEZ, A.I.; BALMER, E. & TOKESHI, H. 1984. *Pythium* spp. associadas à podridão de raízes de cultivares de cana-de-açúcar em Campos, Estado do Rio de Janeiro. *Rickia* 11:65-75.
- VAN DER HEYDEN, H.; WALLON, T.; LÉVESQUE, C. A., & CARISSE, O. 2019. Detection and quantification of *Pythium tracheiphilum* in Soil by Multiplex Real-Time qPCR. *Plant Disease* 103:475-483.

- VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Stud Mycol 21:1-242.
- WEI, L.; XUE, A.G.; COBER, E.R.; BABCOCK, C.; ZHANG, J.; ZHANG, S.; LI, W.; WU, J. & LIU, L. 2011. Pathogenicity of *Pythium* species causing seed rot and damping-off in soybean under controlled conditions. Phytoprotection 91:3-10.
- WEILAND, J.E.; SANTAMARIA, L. & GRUNWALD, N.J. 2014. Sensitivity of *Pythium irregulare*, *P. sylvaticum*, and *P. ultimum* from forest nurseries to mefenoxam and fosetyl-Al, and control of *Pythium* damping-off with fungicide. Plant Disease 98:937-942.
- WILLIAMS-WOODWARD, J.L. & DEMOTT, M.E. 2014. Fungicide resistance in *Pythium* and *Phytophthora* from ornamentals in Georgia. Acta Horticulturae 1055:453-456.
- YAMAMOTO, W & MAEDA, M. 1961. Studies on *Pythium spinosum* causing the damping-off to the seedling root rot of cultivated plants with special reference to the host range and geographic distribution. Scient. Rep. Hyogo Univ. Agric. 5:13-25.
- YAÑEZ, L.D.T. 2000. Identificação, patogenicidade e sensibilidade a produtos químicos in vitro de espécies de *Pythium* de cultura hidropônica de alface (*Lactuca sativa* L.). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F.X.; COSTA, H. & PAULA JUNIOR, T.J. 1996. Doenças causadas por fungos e por bactérias em beringela e jiló. Informativo Agropecuário 18:81-84.
- ZITNICK-ANDERSON, K.K. & NELSON JR, B.D. 2015. Identification and pathogenicity of *Pythium* on soybean in North Dakota. Plant Disease 99:31-38.

CHAPTER 3

***Pythium* AND *Phytophthium* SPECIES ASSOCIATED WITH
WEEDS COLLECTED IN VEGETABLE PRODUCTION
FIELDS**

***Pythium* and *Phytophthium* species associated with weeds collected in vegetable production fields**

Barboza, E.A.¹; Cabral, C.S²; Rossato, M. ¹; Martins, F.H.S.R³; Reis, A.

3

E.A. Barboza, Universidade de Brasília (UnB), Dept. Fitopatologia, Brasília–DF, Brazil, ORCID 0000-0003-3888-9485;

C. S. Cabral, Departamento de Agronomia, Unidesc, GO, Brazil, ORCID 0000-0003-1316-367X;

M. Rossato, Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brazil, ORCID 0000-0002-0064-8849.

F.H.S.R. Martins, CNPH/Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, Brazil, ORCID 0000-0003-3728-0379.

A. Reis, CNPH/Embrapa Hortaliças, Brasília–DF, Brazil, ORCID 0000-0002-5705-3002.

Corresponding author:

Ailton Reis

ailton.reis@embrapa.br

ABSTRACT

The presence of weeds in cultivated areas is a limitation on vegetable production in Brazil. Beyond their competition for water, nutrients and light, weeds may be alternative hosts of plant pathogens, favoring their survival in the soil, representing potential sources of inoculum for vegetable crops. Thus, the aim of this study was to identify *Pythium* and *Phytophthium* species from weeds usually found in vegetable production fields, and prove their pathogenicity according to the Koch's postulates. Initially, weeds with symptoms of damping-off, root rot, stunting, chlorosis or wilt were sampled in the Brazilian states of Ceará, Goiás and Pernambuco, as soon as in the Distrito Federal, for identification of the causal agents. The weed species found with typical symptoms of diseases caused by *Pythium* and *Phytophthium* were *Ageratum conyzoides*

L., *Amaranthus viridis* L., *Amaranthus lividus* L., *Amaranthus spinosus* L., *Bidens pilosa* L., *Galinsoga parviflora* (Lag.) Less, *Portulaca oleracea* L., *Solanum americanum* Mill., *Solanum lycocarpum* L. and *Sonchus oleraceus* L. In isolations made from root lesions, colonies with typical *Pythium* and *Phytophythium* characteristics grew in the selective V8 (Campbell®) medium. Procedures for species identification included amplification of the ITS and *Cox II* regions, further compared with reference sequences available at *GenBank*. Finally, the phylogenetic relationships among the isolates and pathogenicity to their original hosts were evaluated. Four *Pythium* species were identified in weeds: *P. aphanidermatum* (12 isolates), *P. ultimum* var. *ultimum* (8 isolates), *P. myriotylum* (2 isolates) and *P. sylvaticum* (1 isolate), and two species of *Phytophythium*, *Phy. chamaehyphon* and *Phy. oedochilum* (1 isolate from each). Nine isolates were not identified by molecular data alone. In the pathogenicity tests, the weed hosts showed symptoms of damping-off or root rot after inoculation, with exception of *P. oleraceae* in which none of the isolates was pathogenic. Therefore, it is noteworthy that common weed plants in vegetable production areas can host different *Pythium* and *Phytophythium* species, and play an important role in the epidemiology of vegetables diseases, regarding the multiplication and inoculum survival.

keywords: oomycetes, alternative host, pathogenicity, phylogeny.

1. INTRODUCTION

Species of the genus *Pythium* and *Phytophythium* are considered important etiological agents of plant diseases because they are ubiquitous in the soil, with a wide geographical distribution and rapid infectious processes of their hosts. Species of these genera are constantly associated with seed rot, damping-off, root rot and decay of plant tissues in contact with the soil (Schroeder *et al.* 2013; Amorim *et al.* 2018). *Pythium* spp. and *Phytophythium* spp. are considered opportunistic pathogens that infect mainly seedling tissues. Plant pathogenic species within these genera can survive saprophytically in cultural residues or remain dormant through oospores or chlamydospores in the absence of hosts. Another way of long-lasting persistence in the soil is through the infection of alternative hosts, such as weeds. Weeds have a common distribution in agricultural areas in Brazil and eventually, may have perennial growth habit (Dissanayake *et al.* 1997; Amorim *et al.* 2018).

Several weed species are found in vegetable production fields in Brazil, with most of them belonging to the Amaranthaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Poaceae and Solanaceae botanical families. Some of these families include vegetable species (Moreira and Bragança 2011). Amaranthaceae comprises the genus *Amaranthus* which includes plants generally named as amaranth or “caruru” in Brazil. Species of this genus are found throughout the Brazilian territory and some of them can be also used as human or animal food (Lima *et al.* 2019). Asteraceae includes the most common weed species present in agricultural areas in Brazil, including *Ageratum conyzoides* L., *Bidens pilosa* L., *Galinsoga parviflora* Cav., *Jaegeria hirta* (Lag.) Less., *Sonchus oleraceus* L. and *Tagetes minuta* L. Portulacaceae, on the other hand, includes the species *Portulaca oleraceae* L., popularly known as purslane, the single weed species with economic importance in this family. Within the Solanaceae there are many weed species including *Solanum lycocarpum* L. and *Solanum americanum* Mill. (Lorenzi 2014). These weeds share common traits such as the short life cycle, early flowering, high seed dispersal, and high adaptation to different climatic conditions. Their competitive behavior includes the high reproductive rate and high capacity of nutrients and water uptake from the soil, favoring their growth throughout the year in tropical and subtropical climates (Lorenzi 2014; Braz *et al.* 2016).

Although many weeds have been reported as natural hosts for plant pathogens, such as bacteria, virus, nematodes, fungi and other oomycetes (Black *et al.* 1996; Hollowell *et al.* 2003; French-Monar *et al.* 2006; Rich *et al.* 2009; Barreto *et al.* 2013; Araujo *et al.* 2015), minimal information exists regarding the role of weeds as reservoirs of *Pythium* and *Phytophythium* (Kalu *et al.* 1976; Dissanayake *et al.* 1997; Lopez *et al.* 2018; Lodhi *et al.* 2020). This knowledge is fundamental for understanding the epidemiology of diseases caused by these plant pathogens in vegetable crops. These weeds are a potential source of inoculum, allowing plant pathogens to remain and multiply in cropped fields in the absence of cultivated host plants. Thus, the aim of this paper was to identify *Pythium* and *Phytophythium* species associated with weeds in Brazilian vegetable production fields.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Sampling of the weeds

Weeds presenting symptoms of damping-off, root rot, stunting, leaf chlorosis or wilting, were collected from 2017 to 2019 in vegetable producing areas in the Brazilian states of Ceará, Goiás, Pernambuco and in the Distrito Federal (Table 3). The sampled weed species were *Ageratum conyzoides* L., *Amaranthus viridis* L., *Amaranthus lividus* L., *Amaranthus spinosus* L., *Bidens pilosa* L., *Galinsoga parviflora* (Lag.) Less, *Portulaca oleracea* L., *Solanum americanum* Mill., *Solanum lycocarpum* L. and *Sonchus oleraceus* L. (Table 1). These plants were sent to the plant pathology laboratory of Embrapa Hortaliças and the symptoms of root and/or crown rot was confirmed. Symptomatic tissues were cut, disinfested and distributed on Petri dishes containing selective clarified V8 (Campbell®) medium (Masago *et al.* 1977). After one to three days, typical colonies of *Pythium* spp. and *Phytophthium* spp. were observed and plugs with hyphal tips were transferred to clarified V8 medium. The isolates were preserved by the Castellani method (Castellani 1939) and in mineral oil at 10°C, and recovered again in V8-clarified culture medium for the following research steps.

2.2. Molecular characterization of the isolates

Samples of mycelium produced on clarified V8 medium were transferred to tubes containing TE extraction buffer and glass beads that enhance mechanical cell lysis in a Precellys® homogenizer. DNA extraction followed the Mahuku (2004) protocol while quantification was performed in a NanoDrop Lite® spectrophotometer (Thermo Scientific) and the quality was checked in 1% agarose gel. The final DNA concentration was standardized at 50 ng.µl⁻¹. The genomic regions selected for sequencing were the ITS region (ITS1, 5.8S rRNA e ITS2), amplified using the universal primers ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS4 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.* 1990) and the cytochrome oxidase II (*Cox II*) region, amplified with primers PF34 (5'-GGCAAATGGGTTTTCAAGATCC-3') and PF35 (5'-CCATGATTAATACCACAAATTTCACTAC-3') (Hudspeth *et al.* 2000).

The PCR was performed in a thermal cycler MyCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc). For amplification of the ITS region, PCR was performed with a master mix

containing 2 μL of DNA (50ng/ μl); 5 μL of 10X buffer (100mM Tris-HCL, 500mM KCl, pH8.3), 1.5 μL of MgCl_2 (50mM), 1 μL of each primer (10mM); 1.0 μL of dNTPs (10 mM); 0.25 μL of Taq DNA polymerase (5U/ μL) and 38.25 μL of Milli-Q water (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) with a final reaction volume of 50 μL (Caixeta *et al.* 2013). The PCR cycle consisted of initial denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 45 s, extension at 72 °C for 2 min, and a final extension cycle at 72 °C for 7 min.

The *Cox II* region amplification reaction mix had a final volume of 25 μL containing 1.5 μL of DNA, 2.5 μL of 10Xbuffer (100mM Tris-HCL, 500mM KCl, pH8.3), 1.5 μL of MgCl_2 , 2.0 μL of dNTPs (10 mM), 1.25 μL of each primer, and 0.25 μL of Taq polymerase (Promega, Madison, Wisconsin) and 14.75 μL of Milli-Q water. Amplification occurred after initial denaturation at 96 °C for 4 min; 35 cycles of denaturation at 96 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s and extension at 72 °C, 1 min; final extension at 72 C for 4 min.

PCR products were purified using the PureLink® Purification Kit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts) and sent to Macrogen, Inc. (Seoul, South Korea) for sequencing. The nucleotide sequences of the ITS region of rRNA and *Cox II* were compared using the BLASTn algorithm available online to confirm identity based on similarity with other sequences deposited in *GenBank* (Altschul *et al.* 1990). After sequencing, the quality of the nucleotide sequences and the construction of the consensus was accomplished through the program DNA Dragon v.1.6.0 (<http://www.dna-dragon.com/>).

2.3. Phylogenetic analysis

The *Pythium* and *Phytopythium* reference sequences selected from the GenBank and used to assemble phylogenetic trees are shown in annex II. The sequences alignment was carried out using Geneious Prime 2020 software (Biomatters Ltda, Auckland, New Zealand) (Kearse *et al.* 2012), with MAFFT algorithm (Kato and Standley 2013), sequences were manually adjusted with extremities trimmed when needed. To assemble phylogenetic trees, the alignments of ITS and *Cox II* regions were used individually or combined.

The best-fit model for nucleotide substitution followed the Akaike Information Criterion (Akaike 1974; Sugiura 1978), and was carried out by Mega X software (Kumar

et al. 2016) The method used for assembling the phylogenetic tree was the Maximum Likelihood, done with the RAxML software (Stamatakis 2014), with 1000 bootstrap replicates with Geneious Prime 2020. The phylogenetic trees were visualized and formatted in the program FigTree version 1.4.

2.4. Pathogenicity tests

To confirm the pathogenicity of *Pythium* and *Phytophthium* isolates, representative isolates of each species were selected and inoculated in their original host. Weed seeds were sown in 0.5 L pots containing sterilized soil. To prepare the inoculum, four to five discs containing mycelium were removed from colonies grown in clarified V8 (Campbell®) culture medium and transferred to Erlenmeyers flasks (250mL) containing 25 g of autoclaved rice seeds with 18 mL of distilled and sterilized water (Holmes and Benson 1994). The flasks were manually shaken daily to allow uniform colonization of the substrate. After incubation for five to seven days at 25 °C, 5 g of colonized rice were added to the sterilized soil in the 0.5 L pots. The weed seedlings, with approximately 5 cm high, were transplanted into pots containing infested soil. Weed seedlings transplanted to non-infested soil were used as control. The experimental design was completely randomized, with three replications, two plants per pot (Lookabaugh *et al.* 2015).

The plants were evaluated weekly regarding visible symptoms in the stems and leaves such as damping-off, chlorosis, wilting and stunting that could be caused by root or crown rot caused by *Pythium* spp. and *Phytophthium* spp. Thirty days after transplanting, the plants were carefully uprooted to verify rot symptoms in the roots and stems. The pathogenicity of each isolate was endorsed after re-isolation in selective V8 clarified medium and observation of morphological characteristics under an optical microscope, to verify whether the isolate had the same traits as the original culture.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Molecular characterization of the isolates

The ITS region of thirty-four isolates recovered from weeds was sequenced. The length of the ITS region of these isolates after editing the consensus sequences ranged from 377 to 912 base pairs. The *Cox II* region of twenty-six isolates was sequenced, and

their fragments size after sequences edition ranged from 505 to 628 base pairs. After comparison of the sequences with database, four species of *Pythium* (*P. aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *P. sylvaticum* and *P. ultimum* var. *ultimum*) and two species of *Phytopyhtium* (*Phy. chamaehyphon* and *Phy. oedochilum*) were identified.

Nine isolates were not identified with the sequencing of the ITS and *Cox* II regions. These isolates may be later characterized by morphological tools and other molecular markers. Among these isolates, Pyt 675 and Pyt 725 isolates had more than 99% similarity with *P. middletonii* (JQ898468) and *P. orthogonon* (JQ898470) for the ITS region. For the *Cox* II region, the nucleotide identity was 98% and 99% with *Pythium* sp. (AB468914) for Pyt 675 and Pyt 725 isolates, respectively. Likewise, Pyt 715 and Pyt 724 isolates also showed high similarity with several *Pythium* species for both the ITS and the *Cox* II regions. *Pythium* sp. (Pyt 677, Pyt 678, Pyt 679, Pyt 773 and Pyt 726 isolates) were also not identified at the species level and they showed high similarity with the species *P. coloratum*, *P. diclinum*, *P. dissotocum*, *P. lutium* and *P. pachycaule* for both the ITS and *Cox* II regions.

The most frequent species found infecting weeds were *P. aphanidermatum* (12 isolates) and *P. ultimum* var. *ultimum* (8 isolates). *Pythium aphanidermatum* was found attacking all the weed species evaluated, except *A. conyzoides* and *A. viridis*, while *P. ultimum* var. *ultimum* was isolated from *A. viridis*, *A. lividus*, *G. parviflora*, *P. oleracea* and *B. pilosa*. The *P. aphanidermatum* species were found in most samples from the states of Ceará and Pernambuco, and from the Distrito Federal. In these Brazilian regions high temperatures year round (Ceará and Pernambuco) and in most months (Distrito Federal) can favor the pathogenicity of this species. *Pythium ultimum* var. *ultimum* was found in Distrito Federal and Pernambuco state, where its occurrence have already been reported (Pires-Zotarelli 2015; Mendes and Urben, 2020). These two species have been described as common soilborne plant pathogens, infecting a wide variety of crops, with *P. ultimum* being pathogenic to more than 719 host plants (Hendrix and Campbell 1973; Farr and Rossman 2020) and *P. aphanidermatum* to more than 305 plant species from different botanical families, such as Alliaceae, Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae and Solanaceae (Alexander 1931; van der Plaats-Niterink 1981; Pagoch *et al.* 2015; Mendes and Urben 2020; Farr and Rossman 2020). In this study the wide host range of these *Pythium* species has also been confirmed in weeds, expanding their list of hosts in Brazil to those belonging to botanical families, such as Portulacaceae and Amaranthaceae.

Table 1. *Pythium* and *Phytophthium* isolates associated with weeds, hosts, collected month/year, origin, species and GenBank accession of the ITS and *Cox II*.

Isolate	Host	month/year	Origin	Species	GenBank accession number	
					ITS	<i>Cox II</i>
Pyt606	<i>Solanum lycocarpum</i>	03/2017	Distrito Federal	<i>P. myriotylum</i>	MT457748	-
Pyt607	<i>Solanum lycocarpum</i>	03/2017	Distrito Federal	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457749	-
Pyt611	<i>Solanum lycocarpum</i>	03/2017	Distrito Federal	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457750	-
Pyt612	<i>Solanum lycocarpum</i>	03/2017	Distrito Federal	<i>P. myriotylum</i>	MT457751	-
Pyt655	<i>Galinsoga parviflora</i>	07/2018	Distrito Federal	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457752	-
Pyt656	<i>Galinsoga parviflora</i>	07/2018	Distrito Federal	<i>P. ultimum</i>	MT457753	MT465497
Pyt657	<i>Sonchus oleraceus</i>	07/2018	Distrito Federal	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457754	MT465496
Pyt659	<i>Amaranthus viridis</i>	07/2018	Distrito Federal	<i>P. ultimum</i>	MT457755	MT465495
Pyt660	<i>Galinsoga parviflora</i>	07/2018	Distrito Federal	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457756	MT465494
Pyt661	<i>Amaranthus viridis</i>	07/2018	Distrito Federal	<i>P. ultimum</i>	MT457757	MT465493
Pyt662	<i>Amaranthus lividus</i>	07/2018	Distrito Federal	<i>P. ultimum</i>	MT457758	-
Pyt675	<i>Portulaca oleracea</i>	07/2018	Distrito Federal	<i>Pythium</i> sp.	MT457759	MT465492
Pyt676	<i>Portulaca oleracea</i>	08/2018	Distrito Federal	<i>P. ultimum</i>	MT457760	MT465491
Pyt677	<i>Galinsoga parviflora</i>	08/2018	Distrito Federal	<i>Pythium</i> sp.	MT457761	MT465490
Pyt678	<i>Galinsoga parviflora</i>	08/2018	Distrito Federal	<i>Pythium</i> sp.	MT457762	MT465489
Pyt679	<i>Galinsoga parviflora</i>	08/2018	Distrito Federal	<i>Pythium</i> sp.	MT457763	-
Pyt680	<i>Galinsoga parviflora</i>	08/2018	Distrito Federal	<i>Phy. oedochilum</i>	MT457764	MT465488
Pyt709	<i>Amaranthus lividus</i>	08/2018	Pernambuco	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457765	MT465487
Pyt710	<i>Amaranthus lividus</i>	08/2018	Pernambuco	<i>P. ultimum</i>	MT457766	MT465486
Pyt712	<i>Bidens pilosa</i>	09/2018	Distrito Federal	<i>P. ultimum</i>	MT457767	MT465485
Pyt714	<i>Amaranthus viridis</i>	09/2018	Distrito Federal	<i>P. ultimum</i>	MT457768	MT465484
Pyt715	<i>Galinsoga parviflora</i>	10/2018	Distrito Federal	<i>Pythium</i> sp.	MT457769	-
Pyt723	<i>Portulaca oleracea</i>	10/2018	Distrito Federal	<i>P. sylvaticum</i>	MT457770	MT465483
Pyt724	<i>Portulaca oleracea</i>	01/2019	Goiás	<i>Pythium</i> sp.	MT457771	MT465482
Pyt725	<i>Portulaca oleracea</i>	01/2019	Goiás	<i>Pythium</i> sp.	MT457772	MT465481
Pyt726	<i>Ageratum conyzoides</i>	03/2019	Distrito Federal	<i>Pythium</i> sp.	MT457773	MT465480
Pyt773	<i>Ageratum conyzoides</i>	03/2019	Distrito Federal	<i>Pythium</i> sp.	MT457774	MT465479
Pyt778	<i>Ageratum conyzoides</i>	03/2019	Distrito Federal	<i>Phy. chamaelophyon</i>	MT457775	MT465478
Pyt802	<i>Portulaca oleracea</i>	03/2019	Ceará	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457776	MT465477
Pyt803	<i>Sonchus oleraceus</i>	05/2019	Ceará	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457777	MT465476
Pyt804	<i>Sonchus oleraceus</i>	05/2019	Ceará	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457778	MT465475
Pyt805	<i>Amaranthus spinosus</i>	05/2019	Ceará	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457779	MT465474
Pyt806	<i>Amaranthus spinosus</i>	05/2019	Ceará	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457780	MT465473
Pyt807	<i>Solanum americanum</i>	05/2019	Ceará	<i>P. aphanidermatum</i>	MT457781	MT465472

3.2. Phylogenetic analysis

The topology of phylogenetic trees with bootstrap support values is shown in Fig. 1-2. For the ITS region, the alignment consisted of a total of 735 characters, of which 272 were conserved, 417 characters were variable and 380 characters were informative for parsimony analysis. For the *Cox II* region, the alignment consisted of a total of 509 characters, of which 326 were conserved, 178 characters were variable and 144 characters were informative for parsimony analysis. The combined data set containing the ITS and the *Cox II* regions comprised an alignment with 1340 characters, with 662 conserved characters, 633 variable characters and 554 informative characters for parsimony analysis. The isolates clustered together according to their phylogenetic species there was no correlation with the host or geographic region. Isolates with filamentous and globose sporangia were grouped in distinct clusters (Fig. 1-2). One clade was formed exclusively by *P. aphanidermatum* isolates with 93% bootstrap for ITS region, 95% for *Cox II* region (data not shown), and 99% bootstrap in the concatenated phylogenetic tree (Fig. 2). The Pyt 606 and Pyt 612 isolates clustered with the reference sequences of *P. myriotylum* with 100% bootstrap for the ITS region (Fig. 1). Among the species with globose sporangia eight isolates were identified as *P. ultimum* var. *ultimum* grouped in a clade with 95% for the *Cox II* region and 100% bootstrap for the ITS region and for the combination of the two regions. The isolate Pyt 723 grouped with all reference isolates of *P. sylvaticum* with 96% bootstrap for the ITS region, 98% for the *Cox II* region and 99% for the combination of the two regions (Fig. 1-2).

The molecular phylogeny of the genus *Pythium* has demonstrated its division into 11 distinct clades, named as A to K, using sequences from the Large Subunit (LSU) and the ITS region of the rDNA (Lévesque and de Cock 2004). Both in the phylogeny of the ITS and *Cox II* region, our isolates grouped together with the sequences of the species corresponding to those of the comparison with the NCBI by BLAST. The isolates belonging to the same species of *Pythium* did not group together according to the geographical region or hosts of origin. Phylogenetic studies of the genus *Pythium* show a division of species into groups that correspond to the sporangium morphology: a monophyletic group composed of species with filamentous sporangia and another monophyletic group formed by clades containing species with globose sporangia. As previously mentioned, the K clade is phylogenetically more distant from the other clades and includes species of the genus *Phytopythium* (Bala *et al.* 2010; de Cock *et al.* 2015; Jesus *et al.* 2016). In our study, the topology of the phylogenetic trees generated from the analysis of the ITS and *Cox II* regions are similar to those described by Lévesque and

de Cock (2004), Matsumoto *et al.* (2000) and Villa *et al.* (2006), with the grouping of *Pythium* species according to the sporangium morphology for most of the analyzed isolates, as well as in other studies. Phylogenetic analysis showed that *Pythium* isolates associated with weeds of vegetable fields in Brazil are distributed in clades A, B1 e B2, D, F, I and K. Most of the isolates analyzed were identified as *P. aphanidermatum*, belonging to clade A which encompasses species characterized by filamentous and inflated sporangia and rapid mycelial growth (van Der Plaats-Niterink 1981). The species belonging to clade A show high similarity in the ITS region and have always grouped in close clades in all phylogenetic trees analyzed (ITS, *Cox II* and ITS/*Cox II*).

Among the isolates identified as belonging to the genus *Phytopythium*, the isolate Pyt 680 clustered in a clade with the *Phy. oedoehilum* reference isolates with 100% bootstrap, as well as Pyt 778 with *Phy. chamaehyphon* for the ITS region and in the concatenated phylogenetic tree. In the phylogenetic tree obtained by the analysis of the *Cox II* region (data not shown), the isolate Pyt 680 grouped in the clade with *Phy. oedoehilum* with 84% bootstrap and Pyt 778 with *Phy. chamaehyphon* with 80% bootstrap support. In this clade, three subclades were formed that represent the clades of the phylogenetic tree of the genus *Phytopythium* published by Baten *et al.* (2014). The Pyt 680 isolate clustered in clade 1, which also included *Phy. megacarpum* and is reported as the largest clade within the genus *Phytopythium*. The clade 2 contains the species *Phy. chamaehyphon* and *Phy. helicoides*, as well as the isolate Pyt 778. None of the isolates obtained from weeds belonged to clade 3, in which the *Phy. vexans* and *Phy. cucurbitacearum* species are present.

The isolates not identified at the species level grouped in clades containing more than one species of the reference isolates from GenBank, also showing high similarity of the sequences of the ITS and *Cox II* regions with several *Pythium* species after comparison with the database. Despite Pyt 675 and Pyt 725 isolates clustered in a clade with high bootstrap support (100%) with *P. orthogonon* in the three phylogenetic trees, these isolates showed high similarity with *P. middletonii*, after comparing the sequences of the ITS and *Cox II* regions, these isolates showed high similarity with *P. middletoni* (JQ898468) and *Pythium* sp. (MK795051). The isolate Pyt 724 had similarity of 99% with *P. amasculinum*, *P. hydnosporum*, *P. lycopersicum* and *P. oligandrum*, belonging to the clade D (Lévesque and de Cock 2004) and which have identical or very similar sequences from the ITS region. In all the trees analyzed, the isolate Pyt 724 grouped with 100% bootstrap in a clade with the species mentioned above (Fig. 1-2).

The Pyt 677, Pyt 678, Pyt 679, Pyt 726 and Pyt 773 isolates clustered together with the reference sequences of *P. dissotocum*, *P. diclinum*, *P. coloratum*, *P. lutarium* and *P. marinum*, species, with bootstrap support less than 80% in all phylogenetic trees. All of these species belong to clade B2 of Lévesque and de Cock (2004), characterized by the presence of uninflated filamentous sporangia, smooth oogonium wall and moderate growth rate in culture medium. In this group, the species more commonly associated with plant diseases is *P. dissotocum*. However it is difficult to separate these species based only on molecular data, since the sequences of the ITS region are identical in *P. coloratum*, *P. lutarium*, *P. marinum* and *P. dissotocum*, and differ by only 1 bp in *P. diclinum*. The *P. pachycaule* species is also very close, with 97% similarity. The morphological characterization could assist in the separation of these species but it is difficult to make them to produce sexual structures.

Only the ITS region of the Pyt 715 isolate was sequenced and similarly, a high identity was observed with *Pythium* sp. (MK795007). In the phylogenetic tree, this isolate was closer to the species *P. debaryanum* (AY598704), *P. spinosum* (AY598701), *P. sylvaticum* (AY598645, MK795052 and HQ643852) and *P. viniferum* (HQ643956), species belonging to clade F that have globular sporangia without proliferation and thickening of hyphae.

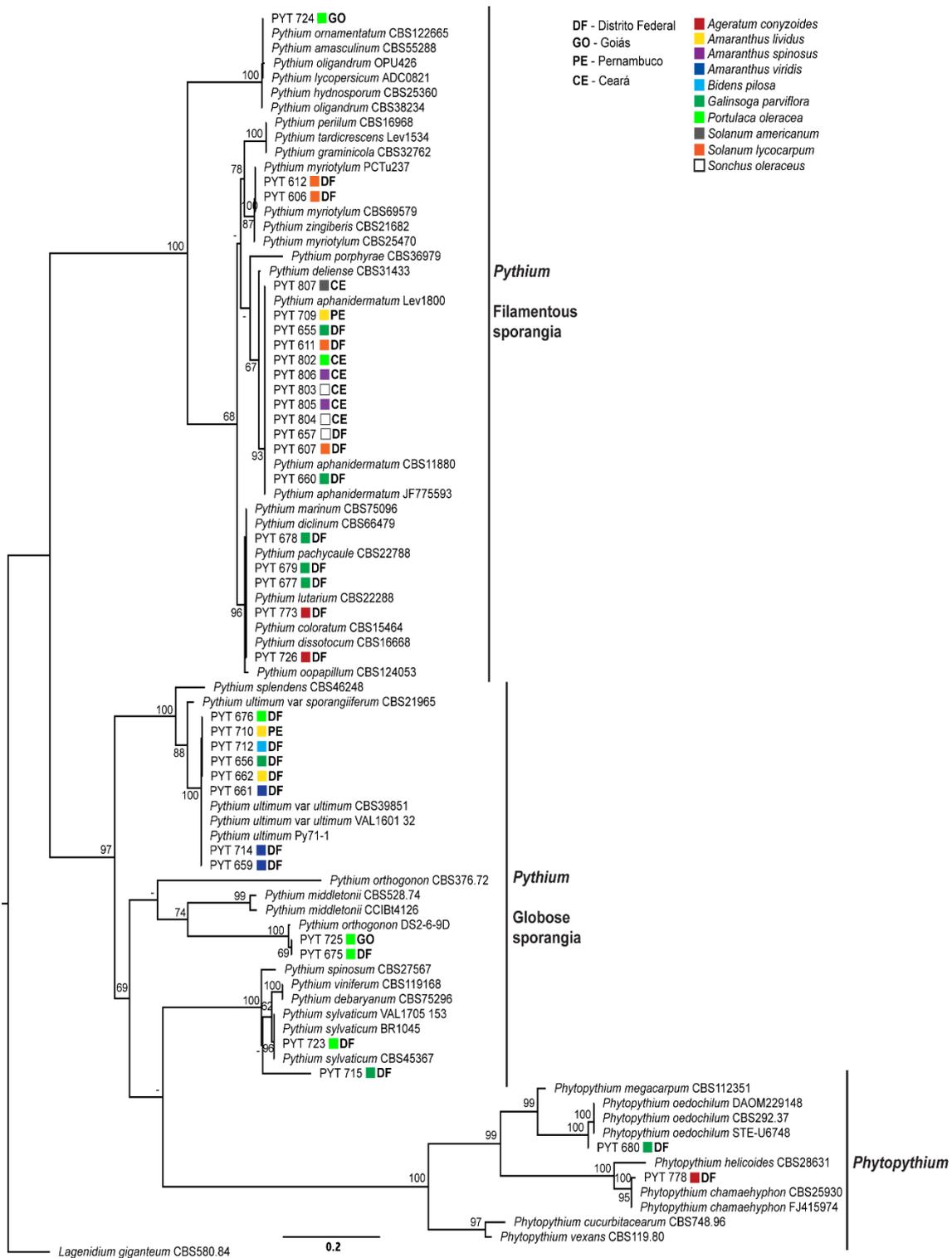


Figure 1. Maximum likelihood tree of the ITS region of 34 *Pythium* and *Phytophthium* isolates from weeds sampled vegetable fields in Brazil, and 50 reference isolates. Branching support was based on 1,000 bootstrap replicates. Model GTR+G chosen in MEGA X using Akaike Information Criterion. Accession KJ716868 of *Lagenidium giganteum* was included as the outgroup.

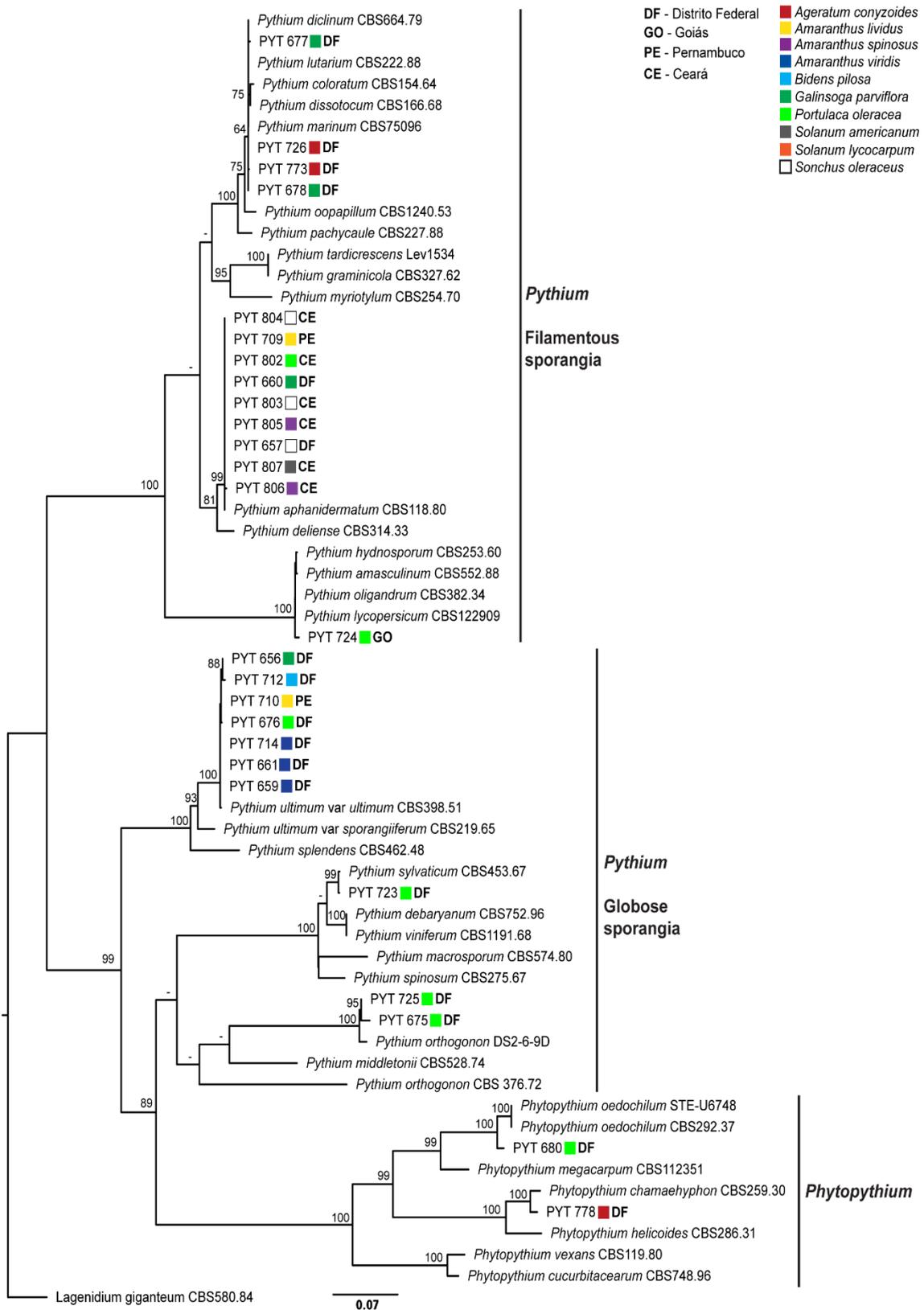


Figure 2. Maximum likelihood tree of ITS and *Cox* II regions of 26 *Pythium* and *Phytophthium* isolates and 35 reference isolates. Branch support based on 1,000 bootstrap replicates. Model GTR+G+I chosen in MEGA X using Akaike information criterion. *Lagenidium giganteum* as outgroup.

3.3. Pathogenicity tests

The results of pathogenicity tests fulfilled the Koch's postulates and the weed plants showed typical symptoms of diseases caused by *Pythium* and *Phytophthora*, suggesting that weeds are alternative hosts for this soilborne plant pathogen. These weeds maintain and multiply the pathogen inoculum in the soil and this inoculum can attack and infect any vegetable crop cultivated in this soil.

Among the weeds found in this study, *Amaranthus* sp. was host of the *P. aphanidermatum* and *P. ultimum* var. *ultimum* species, in addition to four *Pythium* isolates not identified at the species level. In pathogenicity tests, *Pythium aphanidermatum* isolates (Pyt 806 and Pyt 709) caused root rot symptoms and were recovered from *A. spinosus* and *A. lividus*, respectively (Fig. 3K-L). *Amaranthus* spp. are already recognized as hosts of *Pythium* (National Research Council 1984), with *P. myriotylum* reported as a causal agent of damping-off in cultivated amaranth seedlings (Lopez *et al.* 2018).

In *G. parviflora* the isolates of *P. aphanidermatum* (Pyt 655 and Pyt 660) and *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 656) and Pyt 677 (*Pythium* sp.) caused disease and were re-isolated from symptomatic seedlings (Fig. 3A-D).

In *S. lycocarpum*, two *Pythium* species were identified, *P. aphanidermatum* (Pyt 607 and Pyt 611) and *P. myriotylum* (Pyt 606 and Pyt 612), and this weed was the only host in which *P. myriotylum* was found. All isolates of these species caused root or stem rot symptoms after inoculation in this weed (Fig. 3E-F). In turn, the species *P. aphanidermatum*, isolate Pyt 807, was found infecting *S. americanum* and causing root rot. In the pathogenicity test it caused root rot and seedling stunting, and was subsequently re-isolated from roots fulfilling Koch's postulates, confirming that plants of the botanical family Solanaceae are common hosts for *Pythium* species (Kucharek and Mitchell 2000; Hyder *et al.* 2018).

In *S. oleraceus* and *B. pilosa* the species *P. aphanidermatum* and *P. ultimum* var. *ultimum*, respectively, were isolated. In these weeds, the two isolates of *P. aphanidermatum* (Pyt 657 and Pyt 804) caused symptoms of stem and root rot in *S. oleraceus* (Fig. 3G-H), as well as *P. ultimum* var. *ultimum* (Pyt 712) was also reisolated after causing stem rot symptoms in *B. pilosa* (Fig. 3I-J). In Brazil, *B. pilosa* is found in practically all the territory and seasons of the year, and besides being a very aggressive invader weed and competing with crops for many resources, it also can act as a host of pests and diseases, causing significant losses of yield in agricultural crops (Kissmann and Groth 1999; Oliveira *et al.* 2018). In *S. oleraceus*, diseases that are common in lettuce, such as downy mildew (*Bremia lactucae*), are commonly found, as

both plants belong to the Asteraceae family (Vardhana 2017; Mendes and Urban 2020). However, this is the first report of *P. aphanidermatum* infecting *S. oleraceus*, despite of many reports of this pathogen infecting lettuce (Farr and Rossman 2020).

In *P. oleraceae*, the species *P. aphanidermatum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* var. *ultimum* and three *Pythium* isolates not identified at species level were found. The oomycetes *P. irregulare* and *P. intermedium* had been already reported infecting *P. oleraceae* (Kalu *et al.* 1976), however this is the first report of *P. aphanidermatum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum* var. *ultimum* associated to *P. oleraceae*. In this work it was not possible to observe the presence of symptoms after inoculation of the *Pythium* isolates in *P. oleraceae* seedlings under the greenhouse conditions suggesting a non-susceptibility of this weed to *Pythium* species and they were just associated to its roots. Another option is that or the accession of *P. oleraceae* inoculated in the pathogenicity test is resistant to these pathogens. Likewise, no symptoms were observed in *A. conyzoides* after inoculation of *Pythium* sp. (Pyt 726 and Pyt 773). Dissanayake *et al.* (1997) when inoculating *P. arrhenomanes* in weeds of the Poaceae and Cyperaceae family observed that root colonization, severity and growth reduction varied between species, and there was no adverse effect on plant growth or root symptoms, despite proving the colonization of the roots. Thus, even asymptomatic, these plants can act as a source of inoculum to other plants. A similar situation occurs in weeds found as alternative hosts for *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, causal agent of stem cancer in soybeans (Black *et al.* 1996). These plants do not show symptoms when inoculated, suggesting that even asymptomatic they allow the multiplication of pathogen inoculum.

When the isolate Pyt 724 (*Pythium* sp.) was inoculated in *P. oleraceae* no symptoms were observed. This isolate had a high identity with more than one *Pythium* species, among them *P. oligandrum*, species known as fungi and oomycetes hyperparasite (Brožová 2002; Takenaka *et al.* 2015). This may be an indication that this isolate belongs to a non-plant pathogenic species. Likewise, Wulff *et al.* (1998) proved that *P. oligandrum* was not pathogenic in twelve species of cultivated plants, concluding that a mycoparasite species can occur on the root surface of these plants together with phytopathogens, without attacking the tissues of the crops, using only root exudates or parasitizing other fungi (Dušková 1995; Brožová 2002)

Among the *Phytopythium* species, *Phy. chamaehyphon* and *Phy. oedochilum* were found in *A. conyzoides* and *G. parviflora*, respectively, and only *Phy. chamaehyphon* caused damping-off symptoms and was successfully re-isolated from original host in pathogenicity test. Besides it was not pathogenic to the inoculated seedlings of *G. parviflora* in this study,

Phytophthium oedoehilum has already been reported as a weed pathogen (Lodhi *et al.* 2020). This species was first described from *Dahlia* sp. by Drechsler (1930) and since then it was isolated from different countries from ornamental plants, vegetables crops, forests and orcharding (Ravise and Boccas 1969; Watanabe *et al.* 1977; Cother and Gilbert 1993). In Brazil, reports of the presence of this specie was not found.

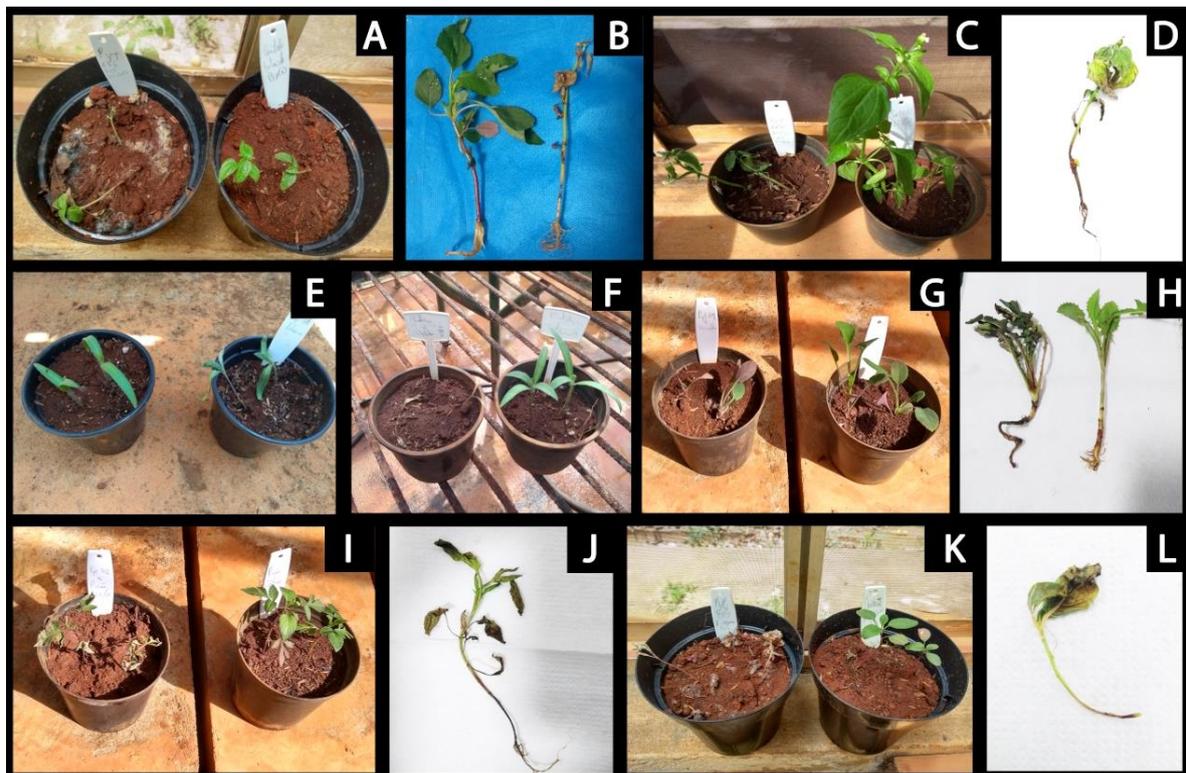


Figure 3. Damping-off, root and collar rot symptoms in weeds species inoculated with Brazilian *Pythium* isolates: **A-D.** *Galinsoga parviflora* **A.B.** *Pythium ultimum* var. *ultimum* (Pyt 656) and **C-D.** *Pythium aphanidermatum* (Pyt 660); **E-F.** *Solanum lycocarpum*, **E.** *Pythium aphanidermatum* (Pyt 607) and **F.** *Pythium myriotylum* (Pyt 612); **G-H.** *Sonchus oleraceus*, **G.** *Pythium aphanidermatum* (Pyt 804) and **H.** *Pythium aphanidermatum* (Pyt 657) **I-J.** *Bidens pilosa* x *Pythium aphanidermatum* (Pyt 807); **K.** *Amaranthus spinosus* x *Pythium aphanidermatum* (Pyt 806); **L.** *Amaranthus lividus* x *Pythium aphanidermatum* (Pyt 709).

Therefore, weed plants common in vegetable production areas can be host of different species of *Pythium*. Among these, *Pythium aphanidermatum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum* are prevalent in weeds and due to the wide range of hosts of these species and their infectious potential in vegetables, the importance of eliminating these alternative hosts is evident. In addition to these species, *P. myriotylum* and *P. sylvaticum* and two species of *Phytophthium*, *Phy. chamaeophyon* and *Phy. oedoehilum*, were also found, all of them, with the exception of

Phy. oedoehilum, were already found in vegetables. In addition to these plants having high competitive potential and being very aggressive, they can be a source of inoculum for *Pythium* species that subsequently attack cultivated plants. All weeds sampled in this study are very common in vegetable fields in Brazil, and the presence of these plants can result in an increased severity and incidence of diseases caused by *Pythium* and *Phytopythium* during the cultivation of vegetables.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Disclosure of potential conflict of interest – The authors do not have any conflict of interest.

Research involving Human Participants and/or Animals – Not applicable.

Informed consent – All authors have reviewed the manuscript and approved its submission to Brazilian Journal of Microbiology

Acknowledgements

Elenice A. Barboza was supported by a graduate fellowship from the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES).

Ailton Reis was supported by a fellowship from the “Conselho Nacional de Pesquisa” (CNPq).

4. REFERENCES

- Akaike, H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* **19**, 716–723.
- Alexander, L.J. (1931) The causes and control of damping off of tomato, brinjal and chilli seedlings. *Ohio Agric Exp Stat Bull* **496**, 57–61.
- Altschul, S.F. (1990) BLAST algorithm. In: eLS.
- Amorim, L.; Rezende, J.A.M. & Bergamin Filho, A. (eds). (2018) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 5. ed. V.1 Ouro fino- MG: Agronômica Ceres. 573p.
- Araújo, E.R.; Costa, J.R.; Pontes, N.C. & Quezado-Duval, A.M. (2015) *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in Brazilian tomato fields. *Eur J Plant Pathol* **143**, 543-548.
- Bala, K.; Robideau, G.P.; Levésque, C.A.; de Cook, A.W.A.M. & Abad, Z.G. (2010) *Phytophthium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhiand, Lévesque, gen. nov. and *Phytophthium sindhum* Lodhi, Shahzad and Lévesque, sp. nov. *Persoonia* **24**, 136-137.
- Barreto, S.S.; Hallwass, M.; Aquino, O. M. & Inoue-Nagata, A.K. (2013) A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato infecting begomovirus in central Brazil. *Phytopathology* **103**, 436-444.
- Baten, M.A.; Asano, T.; Motohashi, K.; Ishiguro, Y.; Rahman, M.Z.; Inaba, S.; Suga, H. & Kageyama, K. (2014) Phylogenetic relationships among *Phytophthium* species, and re-evaluation of *Phytophthium fagopyri* comb. nov., recovered from damped-off buckwheat seedlings in Japan. *Mycological Progress* **13**, 4.
- Black, B.D.; Padgett, G.B.; Russin, J.S.; Griffin, J.L.; Snow, J.P. & Berggren Jr, G.T. (1996) Potential weed hosts for *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, causal agent for soybean stem canker. *Plant Dis* **80**, 763-765.
- Blair, J.E.; Coffey, M.D.; Park, S.Y.; Geiser, D.M. & Kang, S. (2008) A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 266–277.
- Brožová, J. (2002) Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Prot Sci* **38**, 29-35.
- Caixeta, M.P.; Carvalho Nunes, W.M.; Santos, A.F.; Tessmann, D.J. & Vida, J.B. (2013) Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil. *Summa Phytopathologica* **39**, 242-247.
- Castellani, A. (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene* **24**, 270-276.

- Cother, E.J. and Gilbert, R.L. (1993) Comparative pathogenicity of *Pythium* species associated with poor seedling establishment of rice in Southern Australia. *Plant Pathology* **42**, 151-157.
- De Cock, A.W., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad, S. and Lévesque, C.A. (2015) *Phytophthium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia: Mol. Phylogeny Evol. Fungi* **34**, 25–39.
- Drechsler, C. (1930) Some new species of *Pythium*. *Journal Wash. Acad. Sci.* **20**, 398 – 418.
- Dissanayake, N., Hoy, J.W. and Griffin, J.L. (1997) Weed hosts of the sugarcane root rot pathogen, *Pythium arrhenomanes*. *Plant Dis* **81**, 587-591.
- Dušková, E. (1995) New biological fungicides for plant protection registered in the Czech Republic. In: Proceedings of the 3rd Conference of the European Foundation for Plant Pathology, Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control, Poznan, 5-9 September 1994. Poznan: *The Polish Phytopathological Society*, 211-217.
- Farr, D.F. and Rossman, A.Y. (2020) Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. (Accessed date: 18 April 2020).
- French-Monar, R.D., Jones, J.B. and Roberts, P.D. (2006) Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. *Plant Dis* **90**, 345-350.
- Garrett, S.D. (1960) Inoculum potential. Pages 23-56 in: *Plant Pathology*. Vol. 3. J. G. Horsfall and A. E. Dimond, eds., Academic Press, New York.
- Hendrix, F.F. and Campbell, W.A. (1973) *Pythium* as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **11**, 77-98.
- Hollowell, J.E., Shew, B.B., Cubeta, M.A. and Wilcut, J.W. (2003) Weed species as hosts of *Sclerotinia minor* in peanut fields. *Plant Dis* **87**, 197-199.
- Hyder, S., Inam-Ul-Haq, M., Ashfaq, M., Ahmad, A., Gondal, A.S. and Iqbal, M. (2018) First Report of *Pythium myriotylum*, causing damping off and root rot in chili pepper (*Capsicum annum* L.) from Punjab, Pakistan. *Plant Dis* **102**, 687-687.
- Hudspeth, D.S., Nadler, S.A. and Hudspeth, M.E. (2000) A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia* **92**, 674-684.
- Kageyama K. (2014) Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. *J. Gen. Plant Pathol.* **80**, 314-326.
- Kalu, N.N., Sutton, J.C. and Vaartaja, O. (1976) *Pythium* spp. associated with root dieback of carrot in Ontario. *Canadian Journal of Plant Science* **56**, 555-561.
- Katoh, K. and Standley, D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 772-780.

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ...and Thierer, T. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647-1649.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870-1874.
- Kroon, L.P.N.M., Bakker, F.T., van Den Bosch, G.B.M., Bonants, P.J.M. and Flier, W.G. (2004) Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 766–782.
- Kucharek, T. and Mitchell, D. (2000) Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium*. Plant pathology fact sheet PP-53. University of Florida, Gainesville, FL.
- Lévesque, C.A. and de Cock, A.W.A.M. (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* **108**, 1363–1383.
- Lookabaugh, E.C., Ivors, K.L. & Shew, B.B. (2015) Mefenoxam sensitivity, aggressiveness, and identification of *Pythium* species causing root rot on floriculture crops in North Carolina. *Plant Dis* **99**, 1550-1558.
- Lodhi, A.M., Shahzad, S. and Syed, R.N. (2020) The Genus *Phytopythium*. In: Rai, M.; Abd-El salam, K.A. & Ingle, A.P. (Eds.). *Pythium: Diagnosis, Diseases and Management*, CRC Press.
- Lopez, P., Sanahuja, G., Suarez, S.N. and Palmateer, A.J. (2018) First report of *Pythium myriotylum* causing damping-off of *Amaranthus tricolor* in Florida. *Plant Dis* **102**, 828-828.
- Lorenzi, H. (2014) Manual da Identificação e Controle de Plantas Daninhas. Plantarum, 7ed. 382p.
- Mahuku, G.S. (2004) A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* **22**, 71-81.
- Masago, H., Yoshikawa, M., Fukada, M. and Nakanishi, N. (1977) Selective inhibition of *Pythium* spp. from soils and plants. *Phytopathology* **67**, 425-428.
- Matsumoto, C., Kageyama, K., Suga, H. and Hyakumachi, M. (2000) Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. *Mycoscience* **40**, 321–331.
- Mendes, M.A.S. and Urben, A.F. (2020) Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aqwweb/michtml/fgbanco01.asp>. (Accessed date: 18 April 2020).
- Mohammed, D. and All-Shr, A.Y.E.H. (1986) The genus *Pythium* in the West Bank and Gaza Strip. Research and Documentation Centre. An-Najah National University – Nablus.

Moreira, H.J.C. and Bragança H.B.N.2011. Manual de identificação de plantas infestantes: Hortifruti. FMC Agricultural Products, São Paulo. 1017p.

National Research Council (1984) Amaranth: modern prospects for an ancient crop. National Academy Press, Washington, DC.

Oliveira, E.F.D., Santos, P.R.R.D., & Santos, G.R.D. (2018) Seeds of weeds as an alternative host of phytopathogens. *Arquivos do Instituto Biológico*, **85**.

Pagoch, K.; Srivastava, J.N. & Singh, A.K. (2015) Damping-off disease of seedlings in solanaceous vegetables: current status and disease management. *Recent Advances in the Diagnosis and Management of Plant Diseases* 35–46.

Pires-Zottarelli, C.L.A. (2015) Pythiales in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB94877>. (Accessed date: 15 April 2020).

Ravise, A. & Boccas, B. (1969) Première liste annotée des Pythiacées parasites des plantés cultivées au Congo. *Cah. La Maboké* **7**, 41-69.

Rich, J.R., Brito, J.A., Kaur, R. and Ferrell, J.A. (2009) Weed species as hosts of *Meloidogyne*: a review. *Nematropica* **39**, 157-185.

Rizzardi, M.H. *et al.* (2003) Perdas de rendimento de grãos de soja causadas por interferência de picão-preto e guanxuma. *Ciência Rural* **3**, 621-627.

Santos, J.B and CURY, J.P. (2011) Picão-preto: uma planta daninha especial em solos tropicais. *Planta daninha* [online] **29**,1159-1172.

Schroeder, K.L., Martin, F.N., de Cock, A.W., Lévesque, C.A., Spies, C.F., Okubara, P.A. and Paulitz, T.C. (2013) Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Dis* **97**, 4-20.

Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312-1313

Sugiura, N. (1978) Further analysis of the data by Akaike's information criterion and the finite corrections. *Comm Stat. Theory Methods* **7**, 13–26.

Takenaka, S. (2015) Studies on biological control mechanisms of *Pythium oligandrum*. *Journal of General Plant Pathology* **81**, 466-469.

van Der Plaats-Niterink, A.J. (1981) Monograph of the genus *Pythium*. *Stud Mycol* **21**, 1-242.

Vardhana, R. (2017) Plant's diseases of district meerut and adjacent areas. *Plant Archives* **17**, 385-390.

Villa, N.O., Kageyama, K., Takahiro, A. and Suga, H. (2006) Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and B-tubulin gene sequences. *Mycologia* **93**, 410-422.

Watanabe, T. (1977) Fungi associated with strawberry roots in Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **18**, 251-256.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct resequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J.; White, T.J. eds. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press. 315-322.

Wulff, E.G., Pham, A.T.H., Chérif, M., Rey, P., Tirilly, Y. and Hockenhull, J. (1998) Inoculation of cucumber roots with zoospores of mycoparasitic and plantpathogenic *Pythium* species: differential zoospore accumulation, colonization ability and plant growth response. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 69-76.

CONCLUSÕES GERAIS DA TESE

A partir desse estudo foi possível obter informações adicionais de distribuição geográfica de diferentes espécies de *Pythium* e *Phytophthium* no Brasil, assim como a prevalência dessas espécies em áreas produtoras de hortaliças. A espécie *P. aphanidermatum* foi isolada da maioria das culturas amostradas, apresentando distribuição em todas as regiões do Brasil, enquanto *P. ultimum* var. *ultimum* foi predominante nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul.

As espécies prevalentes, *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* var. *ultimum* e *P. deliense*, apresentaram uma ampla gama de hospedeira entre as cultivares de hortaliças avaliadas nesse estudo. Apesar dos isolados de *P. myriotylum* terem como hospedeiras de origem apenas pimenta e tomate, os resultados da avaliação da gama de hospedeiras demonstraram que a maioria das cultivares das principais culturas olerícolas cultivadas no Brasil são hospedeiras dessa espécie.

Entre os isolados avaliados quanto à sensibilidade *in vitro* a mfenoxam, apenas dois isolados de *P. ultimum* var. *ultimum* apresentaram reação intermediária, com crescimento micelial próximo à testemunha na concentração de 10 $\mu\text{L. L}^{-1}$, porém com alta inibição na concentração de 100 $\mu\text{L. L}^{-1}$. Os demais isolados foram muito sensíveis a adição de mfenoxam ao meio cultura. Mesmo sendo imprescindível a comprovação da efetividade de mfenoxam em casa de vegetação e campo, esse resultado pode ser um indício da viabilidade de uso desse fungicida.

As espécies de *Pythium* e *Phytophthium* patogênicas e invasoras de hortaliças são, em sua maioria, as mesmas encontradas nas culturas olerícolas avaliadas nesse estudo, demonstrando que pode haver uma correlação com presença de invasoras em áreas produtoras e o aumento da incidência e severidade de doenças causadas por esses patógenos em hortaliças. Tanto para hortaliças como para invasoras, as espécies prevalentes foram *P. aphanidermatum* e *P. ultimum* var. *ultimum*.

O sequenciamento das regiões ITS e *Cox II* permitiu a identificação da maioria dos isolados recuperados de hortaliças e plantas invasoras no Brasil, porém a presença de 21 isolados que não puderam ser identificados em nível de espécie, demonstra a importância da combinação das análises moleculares com a tradicional caracterização morfológica. Por fim, ressalta-se que este estudo disponibiliza sequências das principais regiões genômicas utilizadas na caracterização molecular destes gêneros a partir de isolados provenientes de diferentes hospedeiras e origens geográficas, auxiliando futuros trabalhos e ampliando o conhecimento sobre esse importante fitopatógeno.

ANEXOS

Anexo I. Isolados de *Pythium* coletados em municípios brasileiros produtores de hortaliças e utilizados para caracterização neste estudo, código do isolado, sintoma observado em campo, ano de coleta, origem, % de identidade de nucleotídeos e número de acesso no *GenBank*.

Isolado	Espécie	Hospedeira/ Substrato	Sintoma	Ano	Origem	% identidade de nucleotídeos	Acesso <i>GenBank</i>	Acesso <i>GenBank</i>
						ITS – <i>Cox II</i>	ITS	<i>Cox II</i>
Pyt 432	<i>P. splendens</i>	Tomate fruto	Podridão de fruto	mar/12	Paty de Alferes - RJ	99 - 100	FJ415952	AB468903
Pyt 438	<i>Pythium</i> sp.	Tomate rasteiro		abr/12	Goiânia - GO	-	-	-
Pyt 439	<i>P. myriotylum</i>	Tomate		abr/12	Gama – DF	100 -	HQ237488	
Pyt 440	<i>P. acanthophoron</i>	Pimenta		abr/12	São Luiz - MA	100 -100	HQ643413	KJ595376
Pyt 442	<i>P. myriotylum</i>	Pimenta		abr/12	São Luiz - MA	100 -	MK182097	
Pyt 448	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	Podridão no fruto	mar/12	Manga – MG	100	JF775593	
Pyt 450	<i>Pythium</i> sp.	Tomate		abr/12	PAD – DF	-	-	-
Pyt 453	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Tomate		abr/12	Bragança Paulista - SP	100	AY598657	
Pyt 456	<i>P. oopapillum</i>	Alface		mar/12	Embú-Guaçú - SP	100 - 99	KU211460	KJ595431
Pyt 460	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate rasteiro		abr/12	Manga - MG	99	AY598622	
Pyt 461	<i>P. aphanidermatum</i>	Abóbora de moita	Podridão no colo	abr/12	Gama - DF	100	JF775593	
Pyt 477	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface crespa	Podridão foliar	jun/14	Rio Grande - RS	100	AY598622	
Pyt 478	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface crespa	Podridão foliar	jun/14	Rio Grande - RS	100	JF775593	
Pyt 479	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface crespa	Podridão foliar	jun/14	Rio Grande - RS	99	KY646467	
Pyt 480	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface	Podridão foliar	jun/14	Rio Grande - RS	100	JF775593	
Pyt 481	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Alface	Podridão foliar	jun/14	Rio Grande - RS	100	AY598657	
Pyt 482	<i>Pythium</i> sp.	Alface crespa	Podridão foliar	jun/14	Rio Grande - RS	-	-	-
Pyt 483	<i>P. aphanidermatum</i>	Rúcula	Podridão de raiz	jun/14	Rio Grande - RS	100	JF775593	
Pyt 484	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	Tombamento	jun/14	Rio Grande - RS	100	AY598622	
Pyt 485	<i>Pythium</i> sp.	Alface crespa	Podridão foliar	jun/14	Rio Grande - RS	-	-	-
Pyt 486	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface crespa	Podridão foliar	jun/14	Rio Grande - RS	100	JF775593	
Pyt 487	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface Americana	Podridão foliar	jun/14	Petrolina - PE	100	JF775593	
Pyt 488	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface americana	Podridão foliar	jun/14	Petrolina - PE	100	JF775593	
Pyt 489	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface americana	Podridão foliar	jun/14	Petrolina - PE	100	JF775593	
Pyt 492	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface hidropônica	Podridão de raíz	jun/14	Goianápolis - GO	100	JF775593	

Pyt 493	<i>Pythium</i> sp.	Alface hidropônica	Podridão de raíz	jun/14	Goianápolis - GO	-	-	-
Pyt 500	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Tomate indústria	Podridão do colo	jun/14	Cristalina - GO	100	AY598657	
Pyt 501	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Tomate indústria	Podridão do colo	jun/14	Cristalina - GO	99	AY598657	
Pyt 502	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Tomate indústria	Podridão do colo	jun/14	Cristalina - GO	99-100	AY598657	KY753869
Pyt 503	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>S.habrochaites</i>	Tombamento	jun/14	Gama - DF	100	MH789990	
Pyt 504	<i>P. splendens</i>	Quiabo	Tombamento	jun/14	Ceilândia - DF	99 - 100	MH810251	AB468903
Pyt 508	<i>Phy. vexans</i>	Morango	Podridão de raiz	jun/14	Recanto das Emas - DF	99-99	GU133569	GU133557
Pyt 516	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface lisa	Podridão foliar	jun/14	Rio Grande - RS	100	AY598622	
Pyt 528	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Alface crespa	Podridão foliar	out/14	Itapicirica da Serra -SP	100	KU211465	
Pyt 529	<i>Pythium</i> sp.	Alface	Podridão foliar	out/14	Altamira - PA	-	-	-
Pyt 531	<i>P. deliense</i>	Alface	Podridão foliar	out/14	Altamira - PA	99	AY598674	
Pyt 534	<i>P. aphanidermatum</i>	Pimenta malagueta	Podridão de raiz	fev/15	Gama - DF	99	HQ643439	
Pyt 535	<i>Phy. vexans</i>	Morango fruto	Podridão de fruto	fev/15	Recanto das Emas - DF	95-99	KR092141	GU133526
Pyt 537	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Coentro	Tombamento	fev/15	Brazlândia - DF	99	KU211465	
Pyt 538	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface	Podridão foliar	fev/15	Altamira - PA	99	AY598622	
Pyt 539	<i>P. deliense</i>	Alface	Podridão foliar	fev/15	Altamira - PA	99	HQ643522	
Pyt 540	<i>P. deliense</i>	Alface	Podridão foliar	fev/15	Altamira - PA	99 - 100	AY598674	DQ071374
Pyt 541	<i>P. tracheiphilum</i>	Alface fol	Podridão foliar	fev/15	Riacho Fundo - DF	100-100	AY598677	KJ595375
Pyt 544	<i>P. splendens</i>	Melão	Podridão de raiz	fev/15	Gama – DF	99-100	HQ643796	AB468903
Pyt 545	<i>P. aphanidermatum</i>	Quiabo muda	Tombamento	fev/15	Padre Bernardo – GO	99	AB355599	
Pyt 546	<i>P. aphanidermatum</i>	Quiabo	Podridão raíz	fev/15	Padre Bernardo – GO	100	AY598622	
Pyt 550	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface	Podridão foliar	fev/15	Antônio Carlos - SC	99	KX260336	
Pyt 551	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Alface	Podridão foliar	fev/15	Porto Belo - SC	100	AY598657	
Pyt 552	<i>P. spinosum</i>	Alface	Podridão foliar	fev/15	Porto Belo - SC	99-99	KT338124	GU071755
Pyt 553	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Alface	Podridão foliar	fev/15	Mogi das Cruzes - SP	100-99	AY598657	GU138663
Pyt 554	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Alface	Podridão foliar	fev/15	Mogi das Cruzes - SP	99	AY598657	
Pyt 555	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Alface	Podridão foliar	fev/15	Mogi das Cruzes - SP	99	MK794626	
Pyt 557	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface	Podridão foliar	fev/15	Mogi das Cruzes - SP	99	AB355599	
Pyt 558	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	Podridão de raiz	mai/15	Guaíra - SP	100	AY598622	
Pyt 559	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Tomate	Tombamento	mai/15	Guaíra - SP	99	KU211465	
Pyt 560	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	Podridão de raiz	mai/15	Guaíra - SP	100	AY598622	
Pyt 561	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>Solanumchilense</i>	Tombamento	jun/15	Gama - DF	99	AB355599	
Pyt 562	<i>P. deliense</i>	Quiabo	Tombamento	jun/15	N.R.B.Esperança – DF	97	AB355599	

Pyt 565	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	Tombamento	jun/15	Guaíra - SP	100	AY598622	
Pyt 568	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	Podridão de raiz	jun/15	Guaíra - SP	100	KY381579	
Pyt 580	<i>Pythium</i> sp.	Milho doce	Podridão de raiz	jul/16	Cristalina - GO	-	-	
Pyt 581	<i>Pythium</i> sp.	Milho doce	Podridão de colo	jul/16	Cristalina - GO	-	-	
Pyt 582	<i>Pythium</i> sp.	Milho doce	Podridão de colo	jul/16	Cristalina - GO	-	-	
Pyt 583	<i>Pythium</i> sp.	Milho doce	Podridão de colo	jul/16	Cristalina - GO	-	-	-
Pyt 584	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	Tombamento	set/16	Ceilândia - DF	100	AY598622	
Pyt 585	<i>Phy. cucurbitacearum</i>	Morango	Podridão de colo	set/16	Brazlândia - DF	100-99	AY598667	GU133557
Pyt 586	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	Tombamento	set/16	Taquara - DF	100 - 100	AY598622	KU324670
Pyt 587	<i>P. aphanidermatum</i>	Feijão vagem	Tombamento	out/16	Gama - DF	100	AY598622	
Pyt 588	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate hidrop.	Podridão de colo/raiz	out/16	Acre	99	AY598622	
Pyt 589	<i>P. deliense</i>	Tomate indústria	Podridão de colo/raiz	out/16	Cristalina - GO	99-100	AY598674	DQ071374
Pyt 590	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface Hidrop.		out/16	São Sebastião - DF	99	AY598622	
Pyt 591	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface Hidrop.		out/16	São Sebastião - DF	100	AY598622	
Pyt 592	<i>P. aphanidermatum</i>	Alface Hidrop.		out/16	São Sebastião - DF	100	AY598622	
Pyt 593	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	Podridão de raiz	out/16	Uaporanga – MG	100	AY598622	
Pyt 594	<i>Phy. cucurbitacearum</i>	Morango	Podridão de colo	dez/16	Brazlândia – DF	100-99	AY598667	DQ365767
Pyt 595	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Batata	Podridão de tubérculo	dez/16	São gotardo – MG	99	AY598657	
Pyt 596	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Batata	Podridão de tubérculo	dez/16	São gotardo – MG	90	AY598657	
Pyt 597	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate indústria	Podridão de colo	dez/16	Luziânia – GO	100	AY598622	
Pyt 598	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	tombamento	dez/16	Gama – DF	99	AY598622	
Pyt 599	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate indústria	Podridão de raiz	dez/16	Luziânia – GO	99	AY598622	
Pyt 600	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate	Tombamento	dez/16	Gama – DF	100-99	AY598622	EU265663
Pyt 601	<i>P. aphanidermatum</i>	Pimenta habanero	Podridão de raíz	jan/17	Gama – DF	100	AY598622	
Pyt 602	<i>P. splendens</i>	Tomate	Podridão de raiz	jan/17	Marilândia do Sul – PR	99-99	AY375242	KJ639203
Pyt 603	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Feijão-Vagem	Podridão de vagem	fev/17	Gama – DF	99	AY598657	
Pyt 604	<i>P. myriotylum</i>	Pimenta		mar/17	Gama – DF	99 - 99	AY598678	
Pyt 605	<i>P. myriotylum</i>	Pimenta		mar/17	Gama – DF	100	HQ237488	
Pyt 610	<i>P. myriotylum</i>	Pimenta		abr/17	Gama – DF	100-100	HQ237488	AB095066
Pyt 613	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate Santa Clara		abr/17	Gama – DF	100	AY598622	

Pyt 617	<i>P. aphanidermatum</i>	Beterraba		abr/17	Brazlândia – DF	100	AY598622	
Pyt 618	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Beterraba		abr/17	Brazlândia - DF	100	AY598657	
Pyt 623	<i>P. tracheiphilum</i>	Alface		mai/17	Vargem Bonita - DF	99-99	HQ643860	KJ595375
Pyt 626	<i>Phy. cucurbitacearum</i>	Grão de Bico		mai/17	Campo Novo de Percis - MT	99	AY598667	
Pyt 627	<i>Phy. cucurbitacearum</i>	Grão de Bico		mai/17	Campo Novo de Percis - MT	99	AY598667	
Pyt 630	<i>P. deliense</i>	Alface	Podridão de raíz	mai/17	Vargem Bonita - DF	99	AY598674	
Pyt 633	<i>P. aphanidermatum</i>	Melancia	Podridão de raíz	jun/17	Monte Alegre - PI	100	AY598622	
Pyt 635	<i>P. tracheiphilum</i>	Alface	Podridão no caule	jun/17	Veredas - DF	100-100	HQ643860	KJ595375
Pyt 640	<i>P. myriotylum</i>	Pimenta		set/17	Gama - DF	99	AY598678	
Pyt 641	<i>P. myriotylum</i>	Pimenta		set/17	Gama - DF	99	AY598678	
Pyt 643	<i>Pythium</i> sp.	Cenoura	Podridão de raíz	fev/18		-	-	-
Pyt 645	<i>P. aphanidermatum</i>	Batata	Tombamento	jun/18	Gama - DF	100	AY598622	
Pyt 647	<i>P. aphanidermatum</i>	Tomate muda		jun/18	Sao Gabriel - RS	100	AY598622	
Pyt 649	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Cebolinha	Podridão de raíz	jun/18	Tijucas - SC	99	AY598657	
Pyt 650	<i>Phy. chamaeophyon</i>	Rúcula	Podridão de raíz	jun/18	Samambaia - DF	99-98	AY598666	AB690685
Pyt 663	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Salsa	tombamento	jul/18	Brazlândia - DF	99	AY598657	
Pyt 664	<i>P. aphanidermatum</i>	Couve chinesa	Podridão de raíz	jul/18	Brazlândia – DF	100	AY598622	
Pyt 665	<i>Pythium solare</i>	Cenoura		jul/18	Cristalina – GO	-	-	-
Pyt 671	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Grão de bico		jul/18	Gama - DF	99	AY598657	
Pyt 681	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Grão de bico BRS Toro		ago/18	Gama - DF	100	AY598657	
Pyt 682	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Grão de bico BRS Toro		ago/18	Gama - DF	99-99	MK886833	GU071754
Pyt 690	<i>P. acanthophoron</i>	Coentro		ago/18	Feira de Santana - BA	99-100	AY598711	KJ595376
Pyt 692	<i>P. sylvaticum</i>	Cebola		ago/18	Guarapuava – PR	100	MK794949	
Pyt 698	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Repolho roxo		ago/18	Camacum - PE	100	AY598657	
Pyt 700	<i>P. acanthophoron</i>	Rúcula		ago/18	Chã grande – PE	98	AY598711	
Pyt 703	<i>P. splendens</i>	Feijão vagem		ago/18	Chã grande – PE	99	AB780622	
Pyt 704	<i>P. aphanidermatum</i>	Espinafre		ago/18	Chã grande - PE	99	AY598622	
Pyt 705	<i>P. deliense</i>	cebolinha		ago/18	Chã grande - PE	99	AY598674	
Pyt 706	<i>P. deliense</i>	cebolinha		ago/18	Natuba - PB	99	AY598674	
Pyt 707	<i>P. deliense</i>	cebolinha		ago/18	Natuba – PB	99	AY598674	
Pyt 708	<i>P. splendens</i>	cebolinha		ago/18	Chã grande - PE	99-99	AB780619	KJ639203

Pyt 720	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Espinafre		out/18	Samambaia - DF	100	AY598657
Pyt 722	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Pimenta de cheiro	Podridão no colo	out/18	Vargem Bonita – DF	99	AY598657
Pyt 749	<i>P. oopapillum</i>	Mostarda	Podridão foliar	mar/19	Vargem Bonita – DF	99	FJ655174
Pyt 751	<i>Pythium tracheiphilum</i>	Alface	Podridão foliar	mar/19	Vargem Bonita – DF	100	HQ643860
Pyt 757	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Alface	Podridão foliar	mar/19	Brazlândia - DF	99	KU210688
Pyt 760	<i>P. tracheiphilum</i>	Alface	Podridão foliar	mar/19	Samambaia - DF	98	AY598677
Pyt 762	<i>P. tracheiphilum</i>	Alface	Podridão foliar	mar/19	Samambaia - DF	100	HQ643860
Pyt 765	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	Alface	Podridão foliar	mar/19	Incra 9 - DF	99	MK330689

Anexo II. Lista de acesso das espécies de *Pythium* e *Phytophythium* selecionados do *GenBank*, usadas para a análise filogenética das regiões ITS do rDNA e *Cox II*.

Espécie	Isolado	Hospedeira	Origem	Número de Acesso no GenBank	
				ITS	Cox II
<i>Lagenidium giganteum</i>	CBS 580.84	Mosquito		KJ716868	KJ595392
<i>P. acanthicum</i>	CBS 377.34	<i>Solanum tuberosum</i>	Suécia	AY598617	KJ595380
<i>P. acanthophoron</i>	CBS 337.29	<i>Ananas sativus</i>	Hawaii	AY598711	KJ595376
<i>P. amasculinum</i>	CBS 552.88	Solo	China	AY598671	KJ595390
<i>P. anandrum</i>	CBS 285.31	<i>Rheumr haponticum</i>	EUA	AY598650	AB362328
<i>P. aphanidermatum</i>	CBS 118.80	Desconhecido	Desconhecido	AY598622	KJ595344
<i>P. aphanidermatum</i>	Lev1800			HQ643442	
<i>P. aphanidermatum</i>	Lahijan	<i>Cucumis sativus</i>		JF775593	
<i>P. aristosporum</i>	CBS 263.38	<i>Triticum aestivum</i>	Canadá	AY598627	AB507410
<i>P. arrhenomanes</i>	CBS 324.62	<i>Zea mays</i>	EUA	AY598628	AKXY0205317
<i>P. arrhenomanes</i>	Lev1728			HQ643450	
<i>P. catenulatum</i>	CBS 842.68	Grama	EUA	AY598675	KJ595404
<i>P. catenulatum</i>	CBS 461.75	-		HQ643489	-
<i>P. catenulatum</i>	#7			HQ237487	
<i>P. coloratum</i>	CBS 154.64	Solo	Austrália	AY598633	KJ595346
<i>P. debaryanum</i>	CBS 752.96	<i>Tulipa sp.</i>	Reino Unido	AY598704	KJ595399
<i>P. deliense</i>	CBS 314.33	<i>Nicotiana tabacum</i>	Sumatra	AY598674	KJ595372
<i>P. deliense</i>	CBS 114.84	-		HQ643520	
<i>P. diclinum</i>	CBS 664.79	<i>Beta vulgaris</i>	Holanda	AY598690	KJ595394
<i>P. dimorphum</i>	CBS 406.72	<i>Pinus taeda</i>	EUA	AY598651	AB362331
<i>P. dissotocum</i>	CBS 166.68	<i>Triticum aestivum</i>	EUA	AY598634	KJ595351
<i>P. graminicola</i>	CBS 327.62	<i>Saccharum officinarum</i>	Jamaica	AY598625	AF196593
<i>P. graminicola</i>	Dh29	<i>Oryza sativa</i>		LC160346	
<i>P. helicandrum</i>	CBS 393.54	<i>Rumex acetosella</i>	EUA	AY598653	AB362329
<i>P. hydnosporum</i>	CBS 253.60	Desconhecido	Alemanha	AY598672	KJ595364
<i>P. intermedium</i>	CBS 266.38	<i>Agrostis stolonifera</i>	Holanda	AY598647	AB507410
<i>P. lutarium</i>	CBS 222.88	Solo	Reino Unido	HQ643682	KJ595359
<i>P. lycopersici</i>	ADC0821	-		HQ643683	-
<i>P. macrosporum</i>	CBS 574.80	Flores	Holanda	AY598646	AB512916
<i>P. marinum</i>	CBS 750.96	Solo	Reino Unido	AY598689	KJ595398
<i>P. middletonii</i>	CBS 528.74	Solo	Holanda	AY598640	AB362318
<i>P. middletonii</i>	CCIBt4126	Substrato	Brasil	KX090906	KX387360
<i>P. myriotylum</i>	CBS 254.70	<i>Arachis hypogaea</i>	Israel	AY598678	KJ595365
<i>P. myriotylum</i>	PCTu237			HQ237488	
<i>P. myriotylum</i>	CBS 695.79	-		HQ643704	
<i>P. oligandrum</i>	CBS 382.34	<i>Viola sp.</i>	Reino Unido	AY598618	KJ595381
<i>P. oligandrum</i>	OPU426	Solo		AB355600	
<i>P. oopapillum</i>	CBS 124053	<i>Cucumis sativus</i>		FJ655174	KJ595431
<i>P. oopapillum</i>	CCIBt4098	<i>Lactuca sativa L</i>	Brasil	KT823951	

<i>P. oopapillum</i>	CCIBt415 0	<i>Eruca sativa</i> L	Brasil	KT823953	
<i>P. oopapillum</i>	CCIBt4151	<i>Lactuca sativa</i> L	Brasil	KT823954	
<i>P. ornamentatum</i>	CBS 122665	Solo		HQ643722	KJ595428
<i>P. orthogonon</i>	CBS 37672	<i>Zea mays</i>		AY598710	KJ595379
<i>P. orthogonon</i>	DS-6-9D	grama	Japão	AJ233452.1	DQ071389
<i>P. pachycaule</i>	CBS 227.88	Solo	Reino Unido	AY598687	KJ595362
<i>P. paroecandrum</i>	CBS 157.64	Solo	Austrália	AY598644	DQ071391
<i>P. periillum</i>	CBS 169.68	Solo	EUA	AY598683	N/A
<i>P. periplocum</i>	CBS 289.31	<i>Citrullus vulgaris</i>	EUA	AY598670	KJ595369
<i>P. perplexum</i>	CBS 674.85	<i>Vicia faba</i>	Holanda	AY598658	KJ595395
<i>P. porphyrae</i>	CBS 369.79	<i>Porphyra yezoensis</i>	Japão	AY598673	KJ595377
<i>P. rhizo-oryzae</i>	CBS 119169	Solo		HQ643757	KJ595420
<i>P. solare</i>	CBS 119359	<i>Phaseolus vulgaris</i>		EF688275	KJ595421
<i>P. spinosum</i>	CBS 275.67	Composto	Holanda	AY598701	KJ595366
<i>P. splendens</i>	CBS 462.48	Desconhecido	Desconhecido	AY598655	AB512921
<i>P. splendens</i>	Lev 1497	-		HQ643796	
<i>P. sylvaticum</i>	CBS 453.67	Solo	EUA	AY598645	KJ595383
<i>P. sylvaticum</i>	VAL1705_151	<i>Glycine max</i>		MK795052	
<i>P. sylvaticum</i>	BR1045	-		HQ643852	
<i>P. tardicrescens</i>	LEV1534	Gramma		HQ643855	KJ595439
<i>P. torulosum</i>	CBS 316.33	Gramma	Holanda	AY598624	KJ595374
<i>P. tracheiphilum</i>	CBS 323.65	<i>Lactuca sativa</i>	Itália	AY598677	KJ595375
<i>P. tracheiphilum</i>	U106	<i>Lactuca sativa</i>		MH023334	
<i>P. tracheiphilum</i>	BR659	<i>Lactuca sativa</i>		HQ643863	
<i>P. ultimum</i> var. <i>sporangiferum</i>	CBS 219.65	<i>Chenopodium album</i>	EUA	AY598656	KJ595357
<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	CBS 398.51	<i>Lepidium sativum</i>	Holanda	AY598657	KJ595382
<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	VAL1601_32	<i>Glycine max</i>		MK794642	-
<i>P. ultimum</i>	Py71-1	<i>Beta vulgaris</i>		AB355596	
<i>P. viniferum</i>	CBS 119168	Solo		HQ643956	KJ595419
<i>P. zingiberis</i>	CBS 216.82	<i>Zingiber mioga</i>	Japão	AY598679	JX397980
<i>Phy. boreale</i>	CBS 551.88			HQ643372	N/A
<i>Phy. carbonicum</i>	CBS 112544			AB725876	HQ708419
<i>Phy. chamaehyphon</i>	PPRI8624	Solo	África do Sul	FJ415974	HQ708420
<i>Phy. chamaehyphon</i>	FJ415974				
<i>Phy. chamaehyphon</i>	CBS 259.30	<i>Carica papaya</i>	Hawaii	AY598666	
<i>Phy. citrinum</i>	CBS 119171			HQ643375	AB257280
<i>Phy. cucurbitacearum</i>	CBS 748.96	Desconhecido	Austrália	AY598667	AB690679
<i>Phy. cucurbitacearum</i>	YLJF1501	<i>Persea americana</i>	China	MH211141	AB690680
<i>Phy. delawarensis</i>	OH382			AB725875	
<i>Phy. dogmae</i>	USTCMS 410			MF353170	
<i>Phy. fagopyri</i>	CBS 293.35			AB690617	MF359561
<i>Phy. helicoides</i>	CBS 286.31	<i>Phaseolus vulgaris</i>	EUA	AY598665	AB690671
<i>Phy. leanoi</i>	CBS 113.91			MF375474	DQ071377

<i>Phy. litorale</i>	Lev3002			HQ643677	MF397929
<i>Phy. megacarpum</i>	CBS 112351	Solo		HQ643388	
<i>Phy. mercuriale</i>	4SD073			KT337717	AB690665
<i>Phy. montanum</i>	CBS 111349			AB725883	
<i>Phy. oedochilum</i>	CBS29237	desconhecido		AY598664	AB690667
<i>Phy. oedochilum</i>	DAOM229148			HQ643712	AB108011
<i>Phy. oedochilum</i>	STE-U6748			GU133573	
<i>Phy. ostracodes</i>	CBS76873			HQ643395	GU133519
<i>Phy. palingenes</i>	CCIBt3981			KR092139	AB690668
<i>Phy. vexans</i>	CBS 119.80	Solo	Irã	HQ643400	
<i>Phy. vexans</i>	STE-U6712	Vitis sp.	África do Sul	GU133578	GU133518
<i>Phy. vexans</i>	UQ2074	Solo	Austrália	AF271224	GU133526
<i>Phy. vexans</i>	CCIBt4069	água	Brasil	KR092140	