



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Caracterização de fontes de resistência genética contra espécies de
Berkeleyomyces e *Septoria lactucae* em *Lactuca sativa***

David Nataren Perdomo

**RECIFE – PE
2022**

DAVID NATAREN PERDOMO

**Caracterização de fontes de resistência genética contra espécies de
Berkeleyomyces e *Septoria lactucae* em *Lactuca sativa***

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux (PPGF/UFRPE – UnB/Embrapa Hortaliças)

Coorientador: Prof. Dr. Ailton Reis (PPGF/UFRPE – Embrapa Hortaliças)

Coorientadora: Profa. Dra. Cléia Santos Cabral (UPIS, Brasília-DF)

**RECIFE – PE
Novembro de 2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P433c Perdomo, David
Caracterização de fontes de resistência genética contra espécies de *Berkeleyomyces* e *Septoria lactucae* em *Lactuca sativa* / David Perdomo. - 2022.
102 f. : il.
- Orientador: Leonardo Silva Boiteux.
Coorientador: Ailton Reis.
Inclui referências.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2022.
1. *Septoria lactucae*. 2. *Berkeleyomyces*. 3. *Lactuca sativa* L. 4. Resistência de plantas. 5. Reação de cultivares. I. Boiteux, Leonardo Silva, orient. II. Reis, Ailton, coorient. III. Título

Caracterização de fontes de resistência genética contra espécies de *Berkeleyomyces* e *Septoria lactucae* em *Lactuca sativa*

DAVID NATAREN PERDOMO

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 18/11/2022

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Leonardo Silva Boiteux (PPGF/Embrapa Hortaliças)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (PPGF/UFRPE)

Prof. Dr. André Angelo Gomes (PPGF/UFRPE)

Prof. Dr. Warley Marcos Nascimento (Embrapa Hortaliças)

Prof. Dr. Matias González Arcos (INIA/Uruguai)

RECIFE – PE
Novembro de 2022

Ao meu pai, Victor Manuel Nataren e a minha mãe, Brigida Perdomo (in memoriam), lavradores de uma vida inteira, que com atitude e coragem lutaram na missão mais bela: Um futuro melhor para seus filhos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o ser supremo, pelos objetivos alcançados, pelo dom da vida e por todas as oportunidades e conquistas que têm me dado.

Agradeço aos meus pais pela dedicação, incentivo, apoio e pelos ensinamentos sobre o trabalho e perseverança, que, desde cedo, me levaram a valorizar a busca da construção de uma vida progressista, justa, cheia de lutas e conquistas. Aos meus irmãos, irmãs, primos, primas, cunhados e cunhadas agradeço pelo esforço, estímulos e pelo suporte incontestado em todos os momentos da minha formação. Com toda certeza posso dizer que vocês são meus heróis.

Ao meu orientador, Prof. Leonardo Silva Boiteux, agradeço imensuravelmente e deixo expresso meus sinceros agradecimentos por toda a presteza, confiança, paciência, liderança, amizade, sensibilidade e constantes ensinamentos, fundamentais para a concretização de cada etapa desafiadora deste trabalho.

Aos meus coorientadores, Prof. Ailton Reis e Profa. Cléia Cabral pelas orientações que me levaram a alcançar a melhoria do trabalho de pesquisa, e por ter-me incentivado a conhecer e aprimorar diversos conhecimentos fitopatológicos.

Aos amigos e companheiros de laboratórios, pelo convívio, por tornar mais descontraídos nossos momentos, por todo o companheirismo nos momentos de trabalho e fora dele, que com carinho e inquantificáveis horas agradáveis, me ajudaram a suportar a distância da minha família.

Aos meus professores da UFRPE, agradeço por cada palavra saturada de conhecimentos que me transmitiram, as quais serão os pilares fundamentais na busca da excelência profissional.

A Embrapa Hortaliças, por me receber e pela insuperável prontidão logística durante a efetivação deste trabalho. À CAPES pela concessão de bolsa para financiar meus estudos.

Por fim, agradeço a todos e todas que direta ou indiretamente participaram dessa conquista e da concretização deste sonho.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT	2
CAPÍTULO I	3
1. INTRODUÇÃO GERAL	4
1.1. Aspectos gerais da cultura da alface.	4
1.2. Tipos varietais (morfotipos) de alface.	6
1.3. Biologia floral e produção de sementes em <i>Lactuca Sativa</i>	7
1.4. Principais doenças da alface	8
1.5. Doenças fúngicas emergentes no cultivo da alface no Brasil	10
1.5.2. Septoriose da alface.....	10
1.5.1. Murchadeira ou podridão negra das raízes.....	12
1.6. Resistência das plantas aos microorganismos	16
1.6.1. Resistência de não-hospedeiro (RNH) e PTI (PAMP/ <i>Pathogen-triggered immunity</i>).....	16
1.6.2. Resistência a patógenos compatíveis e ETI (<i>effector triggered immunity</i>)	17
1.6.3. Resistência Vertical e Horizontal	18
1.7. Melhoramento genético de alface no Brasil.....	19
1.8. Melhoramento e estudos de herança em alface.....	20
1.9. Marcadores moleculares.	21
1.10. Referências bibliográficas.....	25
CAPÍTULO II	35
Identification of stable sources of rate-reducing resistance to <i>Septoria lactucae</i> in lettuce germplasm.....	36
CAPÍTULO III	52
Sources of broad-spectrum resistance to <i>Berkeleyomyces basicola</i> and <i>B. rouxiae</i> isolates in lettuce (<i>Lactuca sativa</i>) germplasm.	53
CAPÍTULO IV	73
A monogenic dominant resistance to <i>Berkeleyomyces rouxiae</i> and <i>Berkeleyomyces basicola</i> in lettuce (<i>Lactuca sativa</i>) ‘La Brillante’	74
CAPÍTULO V	93
CONCLUSÕES – CAPÍTULOS	94
CONCLUSÕES – GERAIS	95

RESUMO GERAL

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais importante no Brasil e no mundo. As cultivares de alface são agrupadas em diferentes morfotipos com especial destaque para os segmentos ‘Lisa’, ‘Crespa’, ‘Americana’, ‘Romana’, ‘Batávia’ e ‘Mimosa’. Os níveis de produtividade desta hortaliça e, em especial, das cultivares dos morfotipos ‘Americana’ e ‘Lisa’ vêm sendo afetados por duas doenças de etiologia fúngica: a septoriose causada por isolados de *Septoria lactucae* e murchadeira (causada por isolados de *Berkeleyomyces basicola* e *B. rouxiae*). A presente investigação objetivou identificar e caracterizar fontes de resistência contra *S. lactucae* e contra as duas espécies de *Berkeleyomyces* em germoplasma de *L. sativa*. Foram também realizados estudos de herança genética da resistência contra isolados das duas espécies de *Berkeleyomyces*. Foram desenvolvidos grupos de experimentos no Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa Hortaliças), em Brasília-DF durante os anos 2021 e 2022. No **Capítulo 2**, foram avaliadas 42 cultivares de alface em condições de campo (durante a estação chuvosa) para reação ao fungo *S. lactucae*. Nove cultivares categorizadas como resistentes em condições de campo foram posteriormente inoculadas com quatro isolados de *S. lactucae* em condições de casa de vegetação. Os valores de Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) foram significativamente menores para as cultivares ‘BRS Mediterrânea’ e ‘Vanda’ (do grupo varietal ‘Crespa’). As demais cultivares mostraram reação de tolerância, com valores intermediários de AACPD, com a exceção da cultivar ‘Rubi’ (testemunha) que mostrou moderada suscetibilidade ao patógeno. No **Capítulo 3** foram avaliadas 68 cultivares de alface que foram inicialmente inoculadas com um isolado de *B. basicola*. Um segundo ensaio foi conduzido utilizando 33 cultivares classificadas como resistentes no primeiro ensaio. As plantas foram analisadas e inoculadas com quatro isolados (dois de *B. basicola* e dois de *B. rouxiae*). Foi observada uma forte correlação entre resistência/suscetibilidade para *B. basicola* e *B. rouxiae*. Os grupos varietais do tipo ‘Romana’ e ‘Batávia’ apresentaram uma frequência mais elevada de acessos resistentes. Houve variação intervarietal entre acessos dos morfotipos ‘Crespa’, ‘Mimosa’ e ‘Americana’. A maioria das alfaces do segmento ‘Lisa’ se mostrou suscetível. No **Capítulo 4**, foram realizados, em condições controladas, estudos de herança da resistência genética contra as duas espécies de *Berkeleyomyces* em alface. Foram realizados distintos cruzamentos entre a cultivar ‘La Brillante’ (parental resistente do segmento ‘Batávia’) com ‘Elisa’ (parental suscetível do segmento ‘Lisa’). Marcadores moleculares do tipo RAPD e análise morfológica foram utilizados para confirmar a origem híbrida de plantas obtidas via cruzamentos controlados. Duas plantas individuais foram confirmadas via genotipagem como sendo híbridas F₁ e então autofecundadas para obtenção de duas populações F₂ segregantes. Ao todo, 413 plantas F₂ foram inoculadas separadamente com *B. rouxiae* (247 plantas) e *B. basicola* (166 plantas). Testes de qui-quadrado (χ^2) a 5% foram conduzidos para estimar a adequação dos padrões de segregação observados às proporções Mendelianas previstas. Respostas altamente contrastantes foram confirmadas entre os parentais ‘La Brillante’ (resistente) e ‘Elisa’ (suscetível) após a inoculação com os dois fungos. Segregações na população F₂ se ajustaram melhor a um modelo monogênico dominante para a resistência contra as duas espécies fúngicas. **Em conclusão**, os resultados obtidos no presente trabalho indicam haver distintos níveis de resistência/suscetibilidade em relação aos patógenos *Berkeleyomyces* e *S. lactucae* nos diferentes morfotipos de alface. A caracterização genética de novas fontes de resistência contra esses patógenos representa uma importante contribuição para melhoramento da alface. O manejo destas doenças via utilização de cultivares resistentes pode garantir níveis maiores de sustentabilidade do cultivo desta hortaliça em regiões tropicais e subtropicais do Brasil e do mundo.

Palavras-Chaves: *Septoria lactucae*; *Berkeleyomyces*; *Lactuca sativa* L.; Resistência de plantas; Reação de cultivares; Herança; Melhoramento.

GENERAL ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is the most important leafy vegetable in Brazil and across the world. Lettuce cultivars are grouped into different morphotypes according to their morphological characteristics with special emphasis on the segments 'Butterhead', 'Crispy loose-leaf', 'Iceberg', 'Cos/Romaine', 'Batavian', and 'Mimosa'. The yield of lettuce cultivars from the morphotypes 'Iceberg' and 'Butterhead' have been severely affected by two fungal diseases: Septoria leaf spot (caused by isolates of *Septoria lactucae*) and black root rot disease (caused by isolates of *Berkeleyomyces basicola* and *B. rouxiae*). The present investigation aimed to identify and characterize sources of resistance to *S. lactucae* as well as against the two *Berkeleyomyces* species in *L. sativa* germplasm. Genetic inheritance studies of resistance against isolates of the two *Berkeleyomyces* species were also performed. Three sets of experiments were carried out at Embrapa Hortaliças in Brasília-DF during 2021 and 2022. **In Chapter 2**, forty-two (42) lettuce accessions were evaluated under field conditions (during the rainy season) for reaction to *S. lactucae*. Nine cultivars categorized as resistant under field conditions were subsequently inoculated with four isolates of *S. lactucae* under greenhouse conditions. The Area Under the Disease Progress Curve (AACPD) values were significantly lower for the cultivars 'BRS Mediterrânea' and 'Vanda' (from the 'Crispy loose-leaf' morphotype). The other cultivars displayed a tolerance reaction, with intermediate AACPD values, except for the cultivar 'Rubi' (control), which displayed moderate susceptibility to the pathogen. **In Chapter 3**, 68 lettuce cultivars were initially inoculated with an isolate of *B. basicola*. A second experiment was conducted using 33 cultivars classified as resistant in the first experiment. These accessions were subsequently inoculated with four isolates (two of *B. basicola* and two of *B. rouxiae*). A strong correlation was observed between resistance/susceptibility to *B. basicola* and *B. rouxiae*. The morphotypes 'Cos/Romaine' and 'Batavian' showed a higher frequency of resistant accessions. Variation in the reaction to these pathogens was observed among accessions of the morphotypes 'Crispy loose-leaf', 'Mimosa' and 'Iceberg'. Most of the lettuces of the 'Butterhead' morphotype displayed a susceptible reaction. **In Chapter 4**, genetic inheritance studies for resistance to both *Berkeleyomyces* species were carried out under controlled conditions. Different crosses were carried out between the resistant parent 'La Brillante' (from the 'Batavian' morphotype) and the cultivar 'Elisa' (susceptible parent from the 'Butterhead' morphotype). Morphological analysis and molecular assays with RAPD markers were used to confirm the hybrid origin of lettuce plants obtained via controlled crosses. Two individual plants were confirmed as F₁ hybrids via genotyping and then self-fertilized to obtain two segregating F₂ populations. A total of 413 F₂ plants were inoculated separately with *B. rouxiae* (247 plants) and *B. basicola* (166 plants). Chi-square (χ^2) tests at 5% were performed to estimate the best fit of the observed segregation patterns to the predicted Mendelian ratios. Highly contrasting responses were observed between the parents 'La Brillante' (resistant) and 'Elisa' (susceptible) after inoculation with the two fungi. Segregations in the F₂ population displayed a good fit to a dominant monogenic model for resistance against both fungal species. **In conclusion**, the results obtained in the present work indicate that there are different resistance/susceptibility levels across the lettuce morphotypes in relation to *Berkeleyomyces* species and *S. lactucae*. The identification and genetic characterization of novel sources of resistance against these pathogens represents an important contribution to lettuce breeding. The management of these diseases using resistant cultivars can assure higher levels of sustainability in the cultivation of this vegetable in tropical and subtropical regions of Brazil and across the world.

Key words: *Septoria lactucae*; *Berkeleyomyces*; *Lactuca sativa* L.; Plant resistance; Reaction of cultivars; Inheritance; Breeding.

CAPÍTULO I

Introdução Geral.

Caracterização de fontes de resistência genética contra espécies de *Berkeleyomyces* e *Septoria lactucae* em *Lactuca sativa*

1. INTRODUÇÃO GERAL.

1.1. Aspectos gerais da cultura da alface.

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças mais produzidas e vendidas no território brasileiro e no mundo (PHILLIPS, 1996; AZEVEDO FILHO, 2017). No consumo doméstico, a alface é consumida principalmente *in natura* na forma de saladas. No entanto, esta hortaliça também representa um item crucial nas cadeias de fast-food e nos restaurantes comerciais (AZEVEDO FILHO, 2017). A alface, assim como a alcachofra, almeirão, chicória e a escarola, é uma planta anual pertencente à família Asteraceae, Subfamília Cichorioideae. A família Asteraceae engloba entorno de 1500 gêneros e 23.000 espécies, representando a maior família entre as dicotiledôneas (RYDER, 1999; ALMEIDA, 2006).

O gênero *Lactuca* tem como centro de origem a região Asiática, já sendo conhecida no antigo Egito desde o ano 4.500 a.C. De acordo as evidências encontradas em pinturas de tumbas egípcias, a alface assemelhava-se com aquelas agrupadas no morfotipo ‘Romana’, sendo plantas de folhas lanceoladas e pontiagudas. A partir do Egito a alface espalhou-se para a Grécia e Roma. No Novo Mundo, a alface foi, muito provavelmente, introduzida no continente americano através das expedições de Cristóvão Colombo a partir de 1494 (RYDER, 1999; RYDER, 2002). No Brasil, a alface foi introduzida no século XVI pelos imigrantes portugueses (FILGUEIRA, 2008). A forma ancestral da alface, *Lactuca serriola* (L.), é encontrada desde o Mediterrâneo e Ásia central até o Norte da China e Nepal (LINDQVIST, 1960a; DAVIS *et al.*, 1997). Dentro do gênero *Lactuca*, existem mais de 98 espécies selvagens de alface, das quais 17 espécies são encontradas na Europa, 51 na Ásia, 43 na África e 12 na América (LEBEDA *et al.*, 2004).

De acordo com a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM), a alface é a terceira hortaliça em volume de produção, ficando atrás apenas da melancia e do tomateiro. A produção brasileira anual é estimada em 1,5 milhões de toneladas por ano plantadas em 85,000 hectares por 670 mil produtores rurais e movimentando cerca de 8 bilhões de reais, sendo a folhosa mais consumida no Brasil (PESSOA & MACHADO JÚNIOR, 2021).

Além de possuir sabor agradável e refrescante, a alface é rica em sais minerais, vitaminas e ainda apresenta efeito calmante, diurético e laxante. O aproveitamento dos nutrientes da alface é favorecido pelo fato dessa hortaliça ser consumida crua, destacando-se

seus elevados teores de pró-vitamina A, que alcança, na maioria de vezes, cerca de 4.000 UI em 100 g de folhas verdes (cerca de quatro vezes maior que os teores observados no tomate). No entanto, os teores de pró-vitamina A são bem mais baixos nas folhas internas brancas de cultivares do tipo repolhudas (HOOPER & CASSIDY, 2006). A alface acumula também vitaminas do complexo B (B1, B2 e B5) e vitamina C assim como os minerais Ca, Fe, Mg, P, K e Na, cujos teores variam de acordo com a cultivar (CAMARGO, 1992). Além de ser uma excelente fonte de vitaminas e minerais, a alface se tornou popularmente consumida pelo seu sabor, qualidade nutritiva, facilidade de aquisição. De fato, produção ininterrupta da alface durante todas as épocas do ano resulta em um custo relativamente baixo para o consumidor final (COMETTI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2015).

A alface é uma planta dicotiledônea anual, herbácea, cresce em forma de roseta em volta do caule. A planta produz folhas grandes, sendo estas partes comestíveis da planta que podem ser lisas ou crespas, fechando-se ou não na forma de uma “cabeça”. O ciclo da alface é considerado curto e a planta pode ser colhida com poucos dias após o transplante. O ciclo de vida se divide em período vegetativo e reprodutivo (RYDER, 1996). Durante o período vegetativo ocorre a germinação, formação da roseta ou da cabeça. Nessa fase, o caule apresenta o tamanho diminuto. Na fase reprodutiva, ocorre o pendoamento, florescimento e formação das sementes e é marcada pelo alongamento do caule e início da produção de látex, que torna as folhas impróprias para o consumo devido ao sabor amargo (FILGUEIRA, 2008; AZEVEDO FILHO, 2017).

A coloração das plantas de alface pode variar do verde amarelado até o verde escuro e pode ser roxa, dependendo da cultivar (TRANI *et al.*, 2005). A coloração verde se deve à presença da clorofila que tem a função de realizar a fotossíntese no cloroplasto. Além de clorofila também pode ser encontrados outros pigmentos como os carotenoides, que podem ser divididos em carotenos e xantofilas (STREIT *et al.*, 2005). A coloração roxa ou vermelha ocorre pela presença das antocianinas, que são pigmentos flavonoides solúveis em água e que apresentam um elevado potencial antioxidante (WAYCOTT *et al.*, 1999).

O sistema radicular da alface é muito ramificado e superficial, explorando apenas os primeiros 25 cm de solo, quando a cultura é transplantada. Em semeadura direta, a raiz pivotante pode atingir até 60 cm de profundidade (FILGUEIRA, 2003; FILGUEIRA, 2008). Para um ótimo desenvolvimento da alface é necessário temperaturas amenas que variam entre 20 e 25°C, embora, através do melhoramento genético, inúmeras cultivares têm sido desenvolvidas com mais elevados níveis de adaptação as diferentes condições climáticas. No Brasil, o cultivo de alface é realizado em canteiros no campo e sendo irrigadas através de aspersão convencional,

ainda que, atualmente com o desenvolvimento da agricultura protegida o cultivo de alface em telados está sendo bastante difundido (EMBRAPA, 2003; RESENDE *et al.*, 2007). O plantio de mudas em sementeiras tem sido o mais indicado, permitindo um melhor controle fitossanitário e uma seleção mais rigorosa de mudas com maior vigor para o transplante. O transplantio é feito com plantas no estágio de 4–6 folhas definitivas, e deve ser realizado prioritariamente, nas horas mais frescas do dia, ao final da tarde ou no início da manhã (NOZOMU, 1992).

O cultivo da alface é realizado de forma intensiva por pequenos produtores, representando uma importante fonte de emprego e renda na área rural. O crescente interesse no cultivo da alface se deve ao fato de não requerer grandes áreas para sua produção em larga escala e pela geração de pelo menos cinco empregos diretos por hectare plantada (COSTA & SALA, 2005). Além disso, vale mencionar outros fatores tais como o ciclo curto, fácil acesso a sementes, alta produtividade, rápido retorno financeiro e as mudanças positivas nos hábitos alimentares da população, que vêm intensificando o consumo de hortaliças, incluindo a alface. A ampla aceitação no mercado consumidor e sua extrema perecibilidade fazem com que as áreas de cultivo sejam próximas aos centros urbanos, viabilizando uma comercialização mais adequada do produto (MEDEIROS *et al.*, 2006, RESENDE *et al.*, 2007; SALA & COSTA, 2016).

1.2. Tipos varietais (morfotipos) de alface.

Em relação às variedades de alface produzidas no Brasil e baseados nas características morfológicas, diversos autores separam as diferentes cultivares em distintos grupos ou morfotipos comerciais (FILGUEIRA, 2003; 2008; HENZ & SUINAGA, 2009; SALA & COSTA, 2012; SIMKO *et al.*, 2013; AZEVEDO FILHO, 2017). Em relação ao consumo de alface no mercado nacional, as principais cultivares são aquelas do morfotipo ‘Crespa’, com um percentual de aproximadamente 53%, seguida pelas alfices dos morfotipos ‘Americana’, ‘Lisa’ e ‘Romana’ (CULTIVAR, 2015; SALA & COSTA, 2012; HORTI&FRUTI, 2019). Abaixo segue uma breve descrição dos principais morfotipos de alface:

A. Morfotipo ‘Lisa’: São cultivares de alface com folhas lisas, delicadas, verde amareladas, oleosas, com nervuras pouco salientes, podendo formar ou não uma cabeça compacta. **Variedades líderes de mercado:** ‘Aurélia’ (Topseed), ‘Elisa’ (Sakata), ‘Karla’ (Hortec), ‘Lídia’ (Sakata), ‘Lívia’ (Topseed), ‘Luisa-Orgânica’ (Horticeres) ‘Maravilha de Verão’ (Topseed), ‘Rainha de Maio’ (Isla), e ‘Regina’ (Hortec, Sakata e Topseed).

B. Morfotipo ‘Americana’: São cultivares de alface de folhas crespas, bem consistentes, formam cabeça grande e compacta. **Varietades líderes de mercado:** ‘Great Lakes 659-700’ (Topseed), ‘Hanson’, ‘Irene’ (Eagle), ‘Laurel’ (Sakama), ‘Lucy Brown’ (Semini), ‘Raider’ (Semini), ‘Raider Plus’ (Semini), ‘Salinas 88’ e ‘Tainá’ (Sakata).

C. Morfotipo ‘Crespa’: São cultivares de alface de folhas crespas, soltas, consistentes e não formando cabeça. **Varietades líderes de mercado:** ‘Simpson’ (Isla), ‘Grand Rapids TBR’ (Topseed), ‘Itapuã 401’ (Isla), ‘Gizele’ (Topseed), ‘Grand Rapids’ (Hortec), ‘Hortência’ (Hortec), ‘Leila’ (Agrocinco), ‘Lelia’ (Agrocinco), ‘Marianne Orgânica’ (Horticeres), ‘Marisa’ (Horticeres), ‘Mediterrânea’ (Agrocinco), ‘Renata’ (Hortec), ‘Valentina’ (Sakata), ‘Verônica’ (Sakata) e ‘Vanda’ (Sakata).

C.1. Morfotipo ‘Crespa Roxa’: Aglomera cultivares de alface com folhas delicadas, aspecto arrepiado, não formam cabeça. **Varietades líderes de mercado:** ‘Banchu Red Fire’ (Takii), ‘Maravilha Quatro Estações’ (Topseed), ‘Mimosa Vermelha’ (Isla), ‘Mirella’ (Sakata), ‘PiraRoxa’ (Tecnoseed), ‘Rubi’ (Isla), ‘Roxane’ (Sakata), ‘Salad Bowl’ (Sakata, Semini, Topseed) e ‘Veneza Roxa’ (Sakata).

D. Morfotipo ‘Romana’: São cultivares de alface de folhas alongadas, consistentes, nervuras protuberantes que formam cabeça fofa em forma de cone. **Varietades líderes de mercado:** ‘Branca de Paris’ (Isla), ‘Lente a Monter’ (Sakata), ‘Paris Island Cos’ (Ferry Morse), ‘Romana Balão’ (Topseed) e ‘Romana Lente New Selection’.

E. Morfotipo ‘Mimosa’: Engloba cultivares de alface com folhas entrecortadas, crespas, repicadas e miúdas. Podem ser encontradas tanto na versão verde o na versão roxa. **Varietades líderes de mercado:** ‘Mimosa Salad Bowl’ (Sakata, Semini, Topseed) e ‘Salad Bowl Green’ (Hortec).

F. Morfotipo ‘Batávia’: São cultivares de alface com folhas soltas, macias e encaracoladas. Folhas muito vistosas podendo ser de coloração verde ou roxo brilhante. **Varietades líderes de mercado:** ‘Cacimba’ (Isla), ‘Joaquina’ (Ilsa) e ‘La Brillante’.

1.3. Biologia floral e produção de sementes em *Lactuca sativa*.

A alface é uma espécie autógama, diploide ($2n=2x=18$ cromossomos) e com um genoma relativamente grande de 2.7 Gb (REYES-CHIN-WO *et al.*, 2017). Possui uma inflorescência racemosa com aparência de uma flor simples. O capítulo floral é constituído de 10 a 24 flores iguais entre si, assentadas sobre um receptáculo comum cercado por brácteas (HARRIS, 1995). Apresenta flores hermafroditas, onde a corola forma um tubo cilíndrico. O pistilo possui pêlos coletores, distribuídos em toda sua extensão. As anteras são concrecidas entre si, formando um tubo onde os grãos de pólen são liberados (NAGATA, 1992; FILGUEIRA, 2005).

As flores de um capítulo abrem-se uma única vez pela manhã. Em uma inflorescência os capítulos podem abrir em dias diferentes. Desta forma, em uma mesma inflorescência, pode-se existir desde sementes maduras até botões que ainda não se abriram. À medida que os raios de sol alcançam o capítulo as flores vão se abrindo, enquanto o pistilo vai se alongando através do tubo e varrendo o pólen das anteras para seguidamente ser autopolinizado (RYDER, 1986, 1999; MOU, 2008). Cerca de 18 horas antes da antese, as brácteas que circundam o capítulo começam a se abrir no topo devido ao desenvolvimento dos botões florais. A abertura inicia-se às 5 horas da manhã e fecha após 2–3 horas. Em 24 horas as corolas, estames, estiletos e estigmas estão murchos. O aquênio alonga seu rostro filiforme na ponta do jovem fruto. As sementes produzidas (6–12) tornam-se maturadas cerca de 20 dias após a fecundação. As sementes apresentam o tamanho reduzido e, em média, 1000 sementes de alface pesam um grama e podem apresentar as cores branca, marrom ou preta (RYDER, 1996; SANTOS 1996).

1.4. Principais doenças da alface.

Doença de planta é definida como sendo qualquer anormalidade, causada por agentes bióticos ou por fatores abióticos que alteram negativamente o metabolismo resultando em uma queda da produção, perda de qualidade do produto e eventual morte da planta (AGRIOS, 2005). Durante todo o ciclo da cultura da alface podem ocorrer doenças prejudiciais ao seu crescimento e desenvolvimento. As doenças se manifestam pela presença simultânea de três principais componentes: um agente causal (patógeno), de uma planta hospedeira suscetível e de condições climáticas que favoreçam a manifestação dos sintomas (DAVIS *et al.*, 1997; LOPES *et al.*, 2010). Doenças podem ser transmissíveis ou não. As doenças transmissíveis são causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, os quais são chamados de agentes bióticos. Por outro lado, as doenças (ou distúrbios) não transmissíveis são produtos de diversos problemas fisiológicos como consequência do desbalanço de fatores nutricionais, fitotoxidez de defensivos agrícolas, e condições climáticas desfavoráveis ao desenvolvimento normal das plantas (DAVIS *et al.*, 1997; LOPES *et al.*, 2010; FILGUEIRA, 2008).

A alface pode ser afetada por inúmeras doenças que possuem alto potencial destrutivo e podem comprometer seriamente a produtividade e a qualidade quando não controladas de forma adequada. Para esta cultura, mais de 75 doenças de causa biótica já foram relatadas no mundo, muitas delas presentes no Brasil (DAVIS *et al.*, 1997; LOPES *et al.*, 2010, TÖFOLI & DOMINGUES, 2012). A seguir, se enumeram as principais doenças da cultura da alface relatadas no território brasileiro (LOPES *et al.*, 2010; SALA, 2006; TÖFOLI & DOMINGUES, 2017).

Doenças de etiologia viral: No total, aproximadamente 26 espécies de vírus já foram relatadas no mundo causando doenças em alface (MORAES *et al.*, 1988; PAVAN *et al.*, 2008; COLARICCIO *et al.*, 2017). No Brasil se destacam o Mosaico (lettuce mosaic virus – LMV), Vira-cabeça (várias espécies: tomato spotted wilt virus – TSWV, tomato chlorotic spot virus – TCSV e groundnut ringspot virus – GRSV), o Mosqueado (lettuce mottle virus = LeMoV), além de ocorrências esporádicas de cucumber mosaic virus (CMV) e turnip mosaic virus – TuMV (MORAES *et al.*, 1988; PAVAN *et al.*, 2008; COLARICCIO *et al.*, 2017).

Doenças causadas por nematoides: Uma ampla gama de gêneros e espécies de nematoides pode atacar a alface, tais como: *Aorolaimus*, *Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Mesocriconema*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Trichodorus*, *Xiphinema* e *Meloidogyne*. Dentro desse grupo de patógenos, os nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) são os que causam maiores prejuízos na cultura da alface (OLIVEIRA *et al.*, 2017; FERRAZ, 2018).

Doenças de origem bacteriana: As principais doenças de origem bacteriana na cultura da alface incluem: Mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians*), Mancha cerosa (*Pseudomonas cichorii*), Queima lateral das folhas (*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*) e Podridão mole (*Pectobacterium* spp. ou *Dickeya* spp. = *Erwinia* spp.). No Brasil, as doenças mais importantes são a mancha bacteriana (causada por bactérias do gênero *Xanthomonas*) e as podridões moles induzidas por patógenos dos gêneros, *Dickeya* e *Pectobacterium* (BERIAM & ALMEIDA, 2017; AMORIM & PASCHOLATI, 2018).

Doenças da parte aérea, causadas por fungos e oomicetos: As principais doenças induzidas por esse grupo de patógenos incluem: Míldio (causado por várias raças de *Bremia lactucae*), Septoriose (*Septoria lactucae*), Mancha de cercóspora (*Cercospora longissima*), Podridão de botritis (*Botrytis cinerea*) e Oídio causado por *Golovinomyces cichoracearum* (TÖFOLI &

DOMINGUES, 2017) ou por *Golovinomyces orontii* (CABRAL *et al.*, 2019a).

Doenças causadas por fungos na raiz e caule: Tombamento ou ‘damping-off’ (*Pythium* spp. e *Rhizoctonia solani*), Podridão de raiz e murcha (*Pythium* spp.), Podridão de esclerotinia = mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor*), Murcha-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii*), murchadeira (*Berkeleyomyces* spp.), rizootoniose ou queima da saia (*Rhizoctonia solani*) (TÖFOLI & DOMINGUES, 2017) e murcha de fusário causada, nas condições brasileiras, por isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* raça 1 (CABRAL *et al.*, 2018; CABRAL *et al.*, 2019b).

1.5. Doenças fúngicas emergentes no cultivo da alface no Brasil

A cultura da alface, por ser amplamente produzida em áreas com cultivos sucessivos e sem a rotação com outras culturas, tem propiciado o surgimento de doenças ocasionadas por patógenos habitantes do solo e da parte aérea. Dois fungos cabem destacar pela importância nesta cultura: A septoriose causada por *Septoria lactucae* Passerini (SOUSA *et al.*, 2003; BLANCARD *et al.*, 2006; SALA *et al.*, 2008; CABRAL *et al.*, 2022) e a murchadeira, causada pelo fungo *Berkeleyomyces basicola* e *B. rouxiae* (Berk & Broome) Ferraris, sinanamorfo de *Chalara elegans* Nag Raj & Kendrick. *Berkeleyomyces basicola* e *B. rouxiae* vêm limitando o plantio e expansão de cultivares dos morfotipos ‘Americana’ e ‘Lisa’ em algumas regiões do território brasileiro. Além disso, ambos patógenos são favorecidos por condições climáticas amenas e solos excessivamente úmidos o que resulta no comprometimento da produtividade, estética e do potencial de mercado da alface (SALA, 2006; SALA *et al.*, 2008, LOPES *et al.*, 2010).

1.5.2. Septoriose da alface

A mancha de *Septoria* ou septoriose da alface foi relatada pela primeira vez na Itália em 1878. A septoriose é uma doença muito comum em regiões de clima ameno, principalmente durante as épocas chuvosas ou em cultivos irrigados por aspersão (BLANCARD *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2010). A presença da septoriose tem sido descrita nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Raras vezes tem sido relatada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde as temperaturas costumam ser muito altas e a umidade baixa, uma combinação de fatores que resulta em condições pouco favoráveis para o desenvolvimento do patógeno. A septoriose pode ser encontrada causando danos em diversas culturas de importância econômica, como alface, a chicória (*Cichorium intybus*) e o almeirão (*C. intybus* subsp. *intybus*) (SOUSA *et al.*, 2003;

LOPES *et al.*, 2010). Esta doença tem como agente causal o fungo *Septoria lactucae* Passerini, classe Dothideomycetes, ordem Mycosphaerellales e família Mycosphaerellaceae (MYCOBANK, 2022). No Brasil, apenas a espécie *S. lactucae* tem sido identificada causando a septoriose (CABRAL *et al.*, 2022).

As fontes de inóculo primário da doença são normalmente advindos de sementes infectadas, restos de cultura ou de cultivos mais antigos e infectados. Os conídios germinam frequentemente na presença de umidade. A penetração das estruturas do patógeno ocorre pela abertura estomática na presença de filme de água. Os sintomas iniciais são observados nas folhas mais velhas e caracterizam-se pela presença de pequenas manchas cloróticas e irregulares. As manchas, ao evoluírem, tornam-se necróticas, pardo-escuras, envoltas por um halo amarelado e podem atingir toda área foliar. A doença causa seca nas folhas devido a coalescência de muitas manchas, podendo resultar em danos na formação das sementes. O fungo ataca principalmente as folhas, mas pode afetar também a haste e os órgãos florais no campo de produção de sementes (SUTTON, 1980; BEDLAN, 1999; LOPES *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2013). O tecido afetado pela septoriose, inicialmente com aspecto desidratado, torna-se pardacento, com numerosos pontos de cor escura visíveis ao olho nu e que são os corpos de frutificação do fungo denominados de picnídios. Na parte superior dos picnídios, observa-se uma massa de conídios denominada de cirros que só é liberada na presença de alta umidade relativa. Os conídios liberados se espalham a curta distância para outras plantas por meio do vento e respingos de água, e para longa distância por meio de sementes infectadas. Os picnídios também funcionam como estruturas de sobrevivência do fungo no solo na ausência da planta hospedeira (PAVAN & KUROSZAWA, 1997; BEDLAN, 1999; LOPES *et al.*, 2010).

Os conídios de *S. lactucae* são filiformes, multisseptados, hialinos e são facilmente disseminados através de sementes contaminadas, mudas doentes e respingos de água de chuva e irrigação. Em condições de campo o desenvolvimento da doença é máximo entre 10 e 28 °C, sendo 24 °C a temperatura ideal, com umidade relativa elevada e com chuvas que possibilitem a disseminação dos conídios (TOKESHI & CARVALHO, 1990; BLANCARD *et al.*, 2006). Contudo, acredita-se que a partir dos 5°C existe crescimento micelial do fungo (DAVIS *et al.*, 1997; PAVAN *et al.*, 2005).

Por se tratar de um patógeno transmitido principalmente por sementes e para evitar a introdução nas lavouras recomenda-se utilizar sementes sadias e de boa qualidade adquiridas de firmas idôneas. No entanto, a principal medida de controle é o manejo adequado da irrigação e da densidade de plantas nos canteiros, de modo a não permitir o excesso de água. Além disso,

a pulverização preventiva de fungicidas registrados é uma estratégia comumente utilizada (BEDLAN, 1999; LOPES *et al.*, 2010; AGROFIT, 2022).

Buscar fontes de resistência genética visando identificar cultivares ou acesos com níveis adequados de resistência é de grande importância para o manejo desta doença. Na atualidade ainda não há cultivares consideradas resistentes ou imunes a esta doença (SOUSA *et al.*, 2003). A identificação de diferentes níveis de resistência das cultivares de alface à septoriose se torna uma condição fundamental para o manejo desta doença, uma vez que o uso de materiais mais resistentes aumentaria proporcionalmente a eficiência de outras medidas quando aplicadas de forma integrada. Além disso, os consumidores estão exigindo atualmente alimentos livres de resíduos de agrotóxicos, motivando assim, o desenvolvimento e a condução de pesquisas visando encontrar diversas estratégias alternativas de controle contra esta doença na cultura da alface. Por outro lado, poucos trabalhos têm sido realizados objetivando avaliar cultivares ou acesos de alface quanto à resistência ou suscetibilidade à septoriose. Sousa *et al.*, (2003) há mais de duas décadas, testando a reação de cultivares de alface a septoriose em condições de campo e controladas no estado de Minas Gerais relataram que a cultivar Vitória de Santo Antão apresentou alta resistência a esta doença, inversamente, a cultivar ‘Maioba’ mostrou muita suscetibilidade.

1.5.1. Murchadeira ou podridão negra das raízes

A murchadeira das raízes da alface é causada por duas espécies do fungo hemibiotrófico *Berkeleyomyces* (= *Thielaviopsis basicola*). As espécies deste gênero englobam patógenos de solo, saprófitos, distribuídos globalmente e que afetam mais de 170 espécies vegetais de importância econômica, tais como a alface (*Lactuca sativa* L.), chicória (*Cichorium intybus* L.), abacaxi (*Ananas comosus* L.), cenoura (*Daucus carota* L.), cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.), coco (*Cocos nucifera* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) (COUMANS *et al.*, 2011; PEREG, 2013). Uma hipótese indica que este patógeno tenha ingressado no Brasil através de turfas contaminadas (SOUZA, 2022). O primeiro relato aconteceu em 1999 no Estado de Rio de Janeiro e, na atualidade, existem confirmações deste patógeno atacando plantas de alface em quase todo o território tanto em sistemas convencionais quanto em hidroponia (TEIXEIRA & YAÑEZ, 2005; LOPES *et al.*, 2010; SOUZA, 2022).

O agente causal da murchadeira pertence ao filo Ascomycota, ordem Microascales, Família Ceratocystidaceae, gênero *Berkeleyomyces* e as espécies *B. basicola* e *B. roxiae* (= *Thielaviopsis basicola*) (SACCARDO, 1892; CROUS *et al.*, 2004; NEL *et al.*, 2018). No

decorrer dos anos, este gênero sofreu de drásticas mudanças na sua taxonomia. Em 1850, na Inglaterra, Berkeley & Broome descreveram pela primeira vez o fungo *T. basicola* como *Torula basicola* agente causal de doenças na cultura da ervilha (*Pisum sativum* L.) e *Nemophila auriculata*. Em seguida, este fungo foi submetido a várias mudanças taxonômicas. Por exemplo, no ano de 1912, Ferraris mudou o nome de *Torula basicola* para *Thielaviopsis basicola* e passou a considerar a *Thielavia basicola* como a fase teleomórfica do fungo. No entanto, em 1925, foi demonstrado que ambas as espécies não apresentavam nenhum tipo de relação (MCCORMICK, 1925). Nag Raj & Kendrick (1975) redefiniram e modificaram o nome de *Torula basicola* para *Chalara elegans*. Descrições anteriores (BERKELEY & BROOME, 1850), afirmavam que esse fungo produzia apenas clamidósporos. Na realidade, essa espécie também produzia endoconídios característicos do gênero *Chalara*.

Atualmente, com o avanço nas técnicas de biologia molecular tornou-se possível estudar, de maneira mais aprofundada as relações filogenéticas entre vários organismos. Na última década, De Beer *et al.* (2014) demonstraram que *T. basicola* representava linhagem separada filogeneticamente do gênero *Thielaviopsis* dentro da família *Ceratocystidaceae*. Finalmente, na década passada, através de análises filogenéticas das sequências de seis regiões gênicas, Nel *et al.* (2018) demonstraram que isolados de *T. basicola* pertenciam a um outro gênero dentro da família *Ceratocystidaceae*, nomeando-o como *Berkeleyomyces* gen. nov. A espécie *B. basicola* foi definida como a espécie tipo deste gênero e descreveram *B. rouxiae* como uma espécie irmã. As espécies de *Berkeleyomyces* apresentam micélio assexuado, com conidióforos de origem terminal e/ou lateral as hifas vegetativas, as células conidiogênicas fialídicas são simples e tubulares e o fungo se caracteriza pela profusa formação de dois tipos de esporos: os endoconídios e os clamidósporos (CASTAÑO-ZAPATA & SALAZAR-PINEDA, 1998). Os endoconídios se caracterizam por serem hialinos, unicelulares, cilíndricos, produzidos de forma simples ou em cadeias curtas e com as extremidades ligeiramente arredondadas. São facilmente dispersos por correntes de ar para novas áreas, onde germinam rapidamente, sendo responsáveis pela eficiente disseminação do patógeno. No solo, os endoconídios conseguem sobreviver apenas por alguns meses, sendo demonstrado que a sobrevivência não ultrapassa de 1% em períodos acima de 15 meses (SCHIPPERS 1970; PEREG, 2013). Os clamidósporos são estruturas unicelulares, de parede espessa e de coloração escura e presença de melanina, com cadeias de esporos em forma de taco de golfe (*club*), com 2-8 esporos, retidos pela membrana externa, carregado lateralmente ou terminalmente em ramos de hifas, isoladamente ou em clusters. As cadeias curtas de esporos (quando maduros) podem separar-se em vários segmentos cilíndricos individuais viáveis. Os clamidósporos são

considerados estruturas de resistência devido ao fato de permanecerem viáveis no solo por 3-5 anos em condições desfavoráveis ou na ausência de hospedeiros. A persistência desses clamidósporos no solo torna a murchadeira uma doença difícil de erradicar após sua entrada na lavoura (MIMS *et al.*, 2000; ABBAS *et al.*, 2007; PEREG, 2013; DE BEER *et al.*, 2014; NEL *et al.*, 2018). Em meio de cultivo, seja BDA, BCA ou V8 a coloração da colônia pode variar desde marrom, cinza a preto. Os endoconídios podem ser produzidos em 24 horas e os clamidósporos em aproximadamente três dias, dependendo do isolado e das condições da cultura (SHEW & MEYER 1992; PEREG, 2013).

O ciclo da interação de *Berkeleyomyces* spp. com as espécies hospedeiras tem sido dividido em seis fases: **(1)** germinação de esporos; **(2)** crescimento do tubo germinativo em direção às raízes; **(3)** ligação a superfície da raiz, reconhecimento do patógeno e primeiro contato entre o patógeno e planta hospedeira; **(4)** diferenciação do patógeno em estruturas de infecção e penetração nas células da planta hospedeira; **(5)** estabelecimento de uma curta fase biotrófica; e **(6)** conversão para uma fase necrotrófica (ou seja, indução de apodrecimento do tecido radicular) e produção de novos esporos (PEREG, 2013).

Além disso, existem na literatura diversos relatos elucidando que a germinação desses esporos pode ocorrer em resposta a diversos estímulos químicos ou físicos, incluindo o tigmotropismo (PRELL & DAY 2001; PEREG, 2013). Aproximadamente 6–12 horas após a inoculação das plantas com isolados de espécies de *Berkeleyomyces* ocorre a germinação dos endoconídios. Após 12–36 horas as hifas penetram através dos pelos da raiz (ou ferimentos). Na etapa subsequente, o fungo coloniza as células epidérmicas das raízes durante sua curta fase biotrófica. Em torno de dez dias após a inoculação ocorre a colonização do tecido e o fungo entra em uma fase necrotrófica. O fungo nessa fase é responsável pela indução de uma típica descoloração escura nas raízes de plantas de alface, resultando em tecidos radiculares frágeis com baixa eficiência na absorção de água e nutrientes. Como sintomas reflexos, as plantas infectadas exibem nanismo e perda na produtividade. Quando a infecção é muito grave, os vasos das raízes podem ficar obstruídos pelas estruturas assimilativas/reprodutivas do fungo, impedindo a absorção. As raízes podem apodrecer e a planta infectada apresenta uma drástica redução da altura e, por fim, a planta pode colapsar por completo (MIMS *et al.*, 2000; NEHL *et al.*, 2004; PEREG, 2013). No interior dos tecidos doentes, clamidósporos ou esporos de repouso de parede espessa e de cor escura são produzidos em cadeia (PEREG, 2013).

Espécies de *Berkeleyomyces* tem distribuição mundial e a sua gravidade depende de fatores como o nível de resistência da planta hospedeira, da agressividade do isolado, da concentração de inóculo e das condições climáticas (STOVER, 1950; NEL *et al.*, 2019).

Existem outros fatores bióticos e abióticos que podem influir na incidência e severidade da doença. O solo argiloso e o pH na faixa entre 4,0 e 6,4 são considerados ideais para o crescimento de espécies de *Berkeleyomyces* (PUNJA, 1993). Altos teores de cálcio trocável podem promover a persistência da podridão negra. Contrariamente, altos níveis de alumínio e nitrogênio deixam os solos mais ácidos suprimindo a incidência da murchadeira através da inibição do crescimento de hifas, da germinação dos endoconídios e da produção de clamidósporos (DELGADO *et al.*, 2006; FICHTNER *et al.*, 2006). A temperatura ideal para o crescimento de espécies de *Berkeleyomyces* é de 20–30 °C, enquanto, a murchadeira se comporta com maior severidade em temperaturas entre 16–28 °C, principalmente em temperaturas menores que 26 °C (MAUK & HINE 1988, PAVAN, 2005).

Atualmente, as opções de manejo desta doença são limitadas e as poucas estratégias disponíveis visam, unicamente, a prevenção da entrada do patógeno na área de cultivo. Entre as principais medidas de manejo está a rotação de culturas com plantas monocotiledôneas, tratamento de sementes com produtos químicos indutores de resistência sistêmica (exemplo, Acibenzolar-S-metil), uso de mudas saudáveis, limpeza de máquinas e veículos, adubação equilibrada e controle da irrigação visando reduzir o encharcamento do solo (LOPES *et al.*, 2010; ALLEN *et al.*, 2012). Uma vez introduzidos nas áreas de cultivo, os esporos de *Berkeleyomyces* são muito persistentes sob diversas condições ambientais, tornando muito difícil a erradicação. Os fungicidas podem ser usados para minimizar os danos da podridão negra, mas não erradicam o fungo. Além disso, o controle químico apresenta baixa eficiência devido ao fato de ser um patógeno habitante do solo. Ainda não há nenhum registro de fungicidas para espécies de *Berkeleyomyces* no Brasil (AGROFIT, 2022).

Na literatura existem um número relativamente exíguo de trabalhos avaliando a reação de cultivares de alface a espécies de *Berkeleyomyces*. Algumas pesquisas realizadas há um pouco mais de uma década, relatam que cultivares de alface do morfotipo ‘Lisa’ são frequentemente muito suscetíveis, enquanto as cultivares do morfotipo ‘Americana’ apresentaram níveis maiores de resistência. No entanto, a maioria das cultivares dos morfotipos ‘Crespa’ e ‘Batávia’ são altamente resistentes. (TEIXEIRA-YAÑEZ, 2005; SALA, 2005, *et al.*, 2008). De fato, vários genes que controlam a diversidade morfológica, o grau de sobreposição foliar e a coloração das folhas foram caracterizados no germoplasma da alface. Estudos de herança conduzidos por Sala *et al.* (2003) propuseram um modelo monogênico dominante (denominado *Tb* gene/locus) controlando a resistência a *Thielaviopsis* (= *Berkeleyomyces*) em alfaves com folhas do tipo ‘Crespa’ sendo que existe uma suposta ligação entre genes/alelos que controlam as principais características morfológicas e o locus *Tb*. Vale destacar que nesses

trabalhos apenas a espécie *B. basicola* foi estudada, não havendo até hoje, investigações onde se confrontem distintos morfotipos de alface contra ambas as espécies de *Berkeleyomyces*.

1.6. Resistência das plantas aos microorganismos

1.6.1. Resistência de não-hospedeiro (RNH) e PTI (PAMP/*Pathogen-triggered immunity*)

As angiospermas, apesar de não possuírem um sistema imune similar aos dos animais e humanos, apresentam resistência a inúmeros microorganismos que as atacam. Este fenômeno é denominado de resistência de não-hospedeiro (RNH) e é caracterizado por um elaborado mecanismo de defesa que conferem resistência de todos os genótipos da espécie vegetal a todos as variantes genéticas de determinada espécie de microorganismo (HEATH, 2000). Geralmente a RNH é absoluta e qualitativa. Dentro do sistema de defesa de RNH podemos encontrar diversos mecanismos físicos e químicos envolvidos na proteção das plantas atuando de forma isolada ou em sincronia. Qualquer interação típica planta-patógeno envolve primeiramente o reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno. Microorganismos não patogênicos ao tentar invadir o tecido encontram inicialmente a primeira barreira anatômica imposta pela parede celular e cutícula que recobre folhas, frutos e tecidos jovens, evitando a perda de água para o ambiente externo da planta e como barreira de proteção à penetração de microorganismos. Os fungos, por exemplo, degradam a cutícula através da produção de cutinases, que facilitam, além da penetração, a adesão do esporo e a formação de apressórios, podendo estar envolvidas na determinação da especificidade de fungos com os tecidos da planta (PINOSA *et al.*, 2013).

Outra barreira física encontrada pelos microorganismos e parte da RNH é o citoesqueleto que é uma rede de filamentos de proteínas (filamentos de actina) que protege as plantas da penetração contra fungos e oomicetos e que participam nos processos de fechamento e abertura dos estômatos (PORTER & DAY 2016). Além da barreira física os microorganismos, para invadir os tecidos da planta, também precisam superar o obstáculo imposto por uma barreira bioquímica composta por diversos metabolitos secundários originados a partir das rotas dos isoprenoides, fenilpropanoides, alcaloides ou ácidos graxos/policetídeos (DIXON, 2001) e que, segundo a sua dinâmica de síntese, são denominados de fitoantecipinas ou fitoalexinas (VANETTEN *et al.*, 1994).

Para que os microorganismos consigam colonizar seu hospedeiro também precisam vencer um sofisticado sistema de vigilância celular composto por sentinelas moleculares capazes de ativar respostas de defesa local ou sistêmica. Assim que os microorganismos entram em contato com o hospedeiro liberam moléculas conservadas ou elicitores também denominados de padrões moleculares associados a microorganismo/patógeno (MAMP/PAMP–

microbe/pathogen-associated molecular patterns) (NEWMAN *et al.*, 2013). Em fungos, por exemplo, os principais PAMPs são: celulase, proteínas de avirulência, xilanase indutora de etileno (EIX), quitina, oligoquitosana, β -1,3-glicano e ergosterol. Em oomicetos os principais PAMPs são: elicítina, transglutaminase GP42 e epítomos (Pep-12 e Pep25), CBEL/GP34, heptaglicosídeo, quitosacarídeos-glicano, ácido eicosapentaenoico e ácido araquidônico.

Os elicitores são reconhecidos por proteínas da planta denominados de receptores de reconhecimento padrão (PRRs – *Pattern recognition receptors*) (BOLLER & FELIX, 2009; MONAGHAN & ZIPFEL, 2012). Estes são divididas nas famílias receptor tipo quinases (RLK) e o receptor tipo proteína (RLP). O reconhecimento dos elicitores resultaria em resistência chamada de PTI (*PAMP/Pathogen-triggered immunity*), um componente crucial da RNH. A RNH se caracteriza, normalmente, pela ausência de sintomas e pela morte localizada de células no local de penetração do organismo invasor, fenômeno também denominado de resposta de hipersensibilidade (HR) (STAEL *et al.*, 2015; TRDÁ *et al.*, 2015). Vários genes que bloqueiam a penetração e multiplicação de microorganismos são ativados pela RNH com HR, como aqueles relacionados com a produção das proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas), das rotas de biossíntese de compostos contendo nitrogênio, dos terpenoides, fenóis e flavonoides que poderão resultar no engrossamento e lignificação da parede celular, formação de papila e acúmulo de fitoalexinas. Por outro lado, também existe a RNH sem HR, onde o processo infeccioso é interrompido pelas barreiras físico-químicas pré-formadas (ZHANG *et al.*, 2011).

1.6.2. Resistência a patógenos compatíveis e ETI (*effector-triggered immunity*)

Alguns patógenos, por sua vez, conseguem, através da aquisição de um repertório de genes durante processos co-evolutivos, burlar o sistema de defesa das plantas e suprimir a RNH mediante a produção de fatores de virulência (efetores) codificados por genes específicos de virulência/avirulência (genes *Avr*) (SOLOMON, 2010; RAFIQI *et al.*, 2012). Tanto fungos quanto oomicetos secretam os efetores (através da rota de secreção eucariótica geral) no espaço intercelular do hospedeiro ou na matriz extra-haustorial (PANSTRUGA & DODDS, 2009). Por sua vez, as plantas hospedeiras também desenvolveram (via processos co-evolutivos) um repertório de genes que funcionam como um sistema de vigilância. Estes fatores de resistência são compostos por receptores específicos (proteínas R) codificados por genes R que monitoram e detectam a presença dos efetores no tecido da planta (SARRIS *et al.*, 2015). As proteínas R são também chamadas de receptores intracelulares com ligação de nucleotídeos e domínios ricos em leucina (NLRs – *nucleotide-binding, leucine rich domain*). Estes produtos gênicos

possuem um domínio rico em leucina (LRR – *leucine rich region*), um domínio de ligação ATPase (NB – *nucleotide binding ATPase*) e um domínio TIR (*Toll interleukin-1 receptor*) ou CC (*coiled coil*) formando as famílias de proteínas TIR-NB-LRR ou CC-NB-LRR, respectivamente (TAKKEN & GOVERSE 2012; LI *et al.*, 2015).

A detecção do efector do patógeno invasor resulta na expressão de HR, como uma resistência predominantemente do tipo raça-específica, denominada de resposta imune desencadeada por efector (ETI – *effector-triggered immunity*). ETI é predominantemente qualitativa e conhecida também como resistência vertical (VALENT, 2013). A ativação da ETI leva a uma luta constante entre planta e patógeno. Estes ciclos interativos de adaptações do efector e receptor é que governam a coevolução de genes R em plantas e efetores no patógeno (RAVENSDALE *et al.*, 2011; WIN *et al.*, 2012). Kuang *et al.* (2004) identificaram em plantas do gênero *Lactuca* dois padrões evolucionários para NLRs: o primeiro é caracterizado por um modo rápido consistindo em frequente troca de sequências com outros loci de NLR e seguida de seleção diversificada; enquanto o segundo tipo é caracterizado por um modo conservador com infrequente troca de sequências e seleção purificadora.

1.6.3. Resistência Vertical e Horizontal

Na atualidade existe enormes possibilidades de obtenção de acessos de alface com resistência múltipla contra distintos patógenos fúngicos. Os diferentes acessos de alface podem apresentar resistência do tipo vertical (**RV**) ou resistência horizontal (**RH**) (*sensu* VANDERPLANK, 1963). A resistência vertical envolve, geralmente, uma herança governada por genes simples (monogênicos), dominantes e normalmente via ETI (gene-a-gene). A **RV** é mais fácil de ser manipulada em programas de melhoramento, se mostrando, em geral, extremamente efetiva contra uma raça ou uma variante do patógeno. Fenotipicamente, a **RV** se expressa através da reação de hipersensibilidade e apresenta, em geral, baixa durabilidade já que os patógenos têm capacidade de suplantá-la mais facilmente via surgimento de novos patotipos ou raças. A **RV** age no sentido de reduzir a quantidade de inóculo inicial, fazendo com que o início da epidemia seja suprimido para as variantes incompatíveis (VANDERPLANK, 1963; KIMATI *et al.*, 2005; BESPALHOK *et al.*, 2007). Por sua vez, **RH** tende a ser poligênica e durável, caracterizando-se por apresentar um mesmo nível de proteção contra diversas raças ou variantes do patógeno, não exibindo marcantes diferenças nas diversas interações entre raças e acessos das plantas hospedeiras. Na **RH** não existe interação específica cultivar *x* isolado e raramente se aproxima da imunidade. No entanto, a **RH** age reduzindo a taxa de progresso da doença (= *rate-reducing resistance*) e mostrando efeito quantitativo

(NELSON, 1978). Enquanto uma única alteração genética no patógeno é suficiente para vencer a **RV**, condicionada por um único ou poucos genes, são necessárias diversas alterações genéticas para o patógeno vencer a **RH** (VANDERPLANK, 1963; NELSON, 1978; KIMATI et al., 2005).

1.7. Melhoramento genético de alface no Brasil.

O melhoramento genético de alface realizado nos trópicos, principalmente por pesquisadores brasileiros, tem produzido variedades cada vez mais adaptadas ao ambiente tropical com ganhos consideráveis relacionados à tolerância ao calor e com adequada resistência e tolerância a diversos microorganismos patogênicos. Os trabalhos de seleção de progênies têm permitido a produção de novas cultivares com alta qualidade e boa resistência ao ataque de fungos, bactérias, vírus e nematoides. No Brasil, o melhoramento genético da alface teve seu início em instituições públicas como o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) (DELLA VECCHIA *et al.*, 1999; SALA & COSTA, 2016).

No território brasileiro até a década de 1980, predominava o cultivo de cultivares de alface do morfotipo ‘Lisa’ como a cultivar ‘White Boston’. Essas cultivares eram importadas dos Estados Unidos e de países da Europa. As cultivares de alface do morfotipo Lisa representavam até a década de 1990, mais de 51% do volume de alface comercializado, até o aparecimento da cultivar ‘Regina’ que mudou o padrão de alface lisa repolhuda para o tipo sem cabeça. Essa cultivar permitiu a produção de alface em regiões onde o clima limitava seu estabelecimento. Subsequentemente, diversas cultivares foram liberadas tais como ‘Elisa’, ‘Karla’, ‘Lídia’, ‘Brisa’, ‘Solaris’, ‘Piraverde’, ‘Lucy Brown’, ‘Gloriosa’, ‘Verônica’, ‘Vera’ e ‘Grand Rapids’ do tipo Crespa que passaram nas últimas décadas a dominar os mercados brasileiros (DELLA VECCHIA *et al.*, 1999; SALA *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, são poucas as pesquisas orientadas ao melhoramento de alface do morfotipo ‘Crespa’, a preferência está sendo direcionada para alfases de segmentos americana, romana, batávia e do tipo *baby leaf*, estas duas últimas, têm despertado o interesse dos produtores e dos consumidores de alto poder aquisitivo (SALA *et al.*, 2012). Recentemente foram desenvolvidas diversas cultivares adaptadas a climas tropicais. A cultivar ‘Brunela’ do tipo “Frisse” com resistência ao calor, a cultivar ‘Romanela’ do tipo romana com folhas alongadas, a cultivar ‘Rubinela’ de coloração avermelhada, a cultivar ‘Crocantela’ do tipo crespa com resistência ao míldio (*Bremia lactucae*). O melhoramento genético da EMBRAPA Hortaliças, liberou em 2018 as cultivares ‘BRS Leila’, ‘BRS Lelia’ e ‘BRS Mediterrânea’,

possuindo tolerância a altas temperaturas, precocidade, resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, nematoides das galhas (*Meloidogyne incognita* e *M. javanica*) e resistência a alguns patótipos do lettuce mosaic virus (EMBRAPA, 2018). Até o dia de hoje, 781 cultivares de alface foram registradas no Registro Nacional de Cultivares – RNC (dados de julho de 2022).

1.8. Melhoramento e estudos de herança em alface

Os programas de melhoramento genético visam a seleção de materiais que agreguem características como a precocidade, adaptação as diversas condições climáticas brasileiras e resistência a doenças causadas por diversos agentes patogênicos. Na alface, é comum a utilização de métodos de melhoramento que envolvam a hibridação e a seleção. O método genealógico leva em consideração as diversas características desta espécie, como a baixa taxa de polinização cruzada natural (5%) e o número reduzido de cromossomos. Robinson *et al.* (1982) descreveram 59 genes para espécie *L. sativa*, dos quais seis condicionam a presença de antocianina, 10 de clorofila, 11 de morfologia foliar, quatro para formação de cabeça, sete de morfologia floral e caracteres de sementes, sete de macho-esterilidade, um de sensibilidade a agentes químicos e treze de resistência a doenças.

São distintos os genes descritos em alface e que apresentam certa ligação aos caracteres agrônômicos. O gene dominante (*W*) confere a coloração preta das sementes, enquanto a cor branca é conferida por um gene recessivo (*w*). A formação de cabeça é governada por três pares de genes *K*, *H* e *Ca* e também um número de modificadores. O gene *K* (ausência de formação de cabeça) é dominante sobre *k* (formação de cabeça) (LINDQVIST, 1960b). Para a formação de antocianina, Thompson (1938), propõe um par de genes complementário controlando a presença ou ausência de antocianina (*CcGg*) e um sistema de alelo múltiplo controlando o modelo e distribuição da cor. Segundo o autor se o alelo dominante para cada gene complementário estiver presente, a coloração vermelha aparecerá. Outras combinações dão coloração verde.

Por outro lado, muitos genes para morfologia e coloração foliar tem sido identificado. Um gene com três alelos, governa lobulação foliar: *u+* produz uma folha “pontaguda” (semelhante a *L. serriola*), o gene *uo* produz folhas crespas e o gene *u* produz folhas com ausência de lóbulos (RYDER, 1999). Diversos autores têm identificado resistência de plantas de alface a diversos patógenos. A resistência a LMV foi identificada na cultivar de alface Galega (gene *g*) e em três acessos de alface do Egito (gene *mo*) (RYDER, 1970). A herança da resistência em alface contra o míldio (*B. lactucae*) é conferida por uma série de genes denominados de *Dm* (*Downy mildew*), com expressão fenotípica caracterizada por uma resposta

do tipo hipersensível – HR (INGRAM *et al.*, 1976). Segundo Sala *et al.* (2003) a herança da resistência para *B. basicola* é conferida por um gene dominante, denominado *Tb*.

Como discutido acima, o sistema de defesa das plantas está composto por várias camadas superpostas. As plantas contêm genes de resistência fenotípica (R) que as tornam resistentes a distintos patógenos. A maioria dos genes envolvidos no reconhecimento de patógenos identificados até o momento codificam proteínas de ligação de nucleotídeos e de repetição rica em leucina (NLR) (GLOWACKI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2007). Com auxílio das diversas ferramentas genéticas e genômicas foi mapeado e constatado que aproximadamente 291 genes R da alface estão envolvidos na resistência a doenças em relação a 36 loci de resistência fenotípica para sete doenças diferentes e duas pragas; 34 dos 36 fenótipos de resistência analisados co-segregaram com genes relacionados à defesa (TRUCO *et al.*, 2007; MCHALE *et al.*, 2009). Também foi identificado um número superior a 700 genes R candidatos similares a genes de resistência (MCHALE *et al.*, 2008), a maioria deles codificam proteínas NLR de ligação a nucleotídeos geneticamente colocalizados com loci de resistência fenotípica (CHRISTOPOULOU *et al.*, 2015).

Para estudos de herança e devido a singularidade da biologia floral da alface, realizar cruzamentos artificiais controlados se torna uma atividade bastante onerosa e de baixa eficiência. Para começar os processos de hibridação os botões florais devem ser lavados e emasculados através da técnica de despolinização por jato de água que consiste em cortar o terço superior de cada botão antes do nascer do sol. Por último, são coletadas flores completamente abertas a partir dos genitores masculinos e esfregadas em cada botão floral previamente emasculado do genitor feminino para posteriormente serem identificadas (OLIVER 1910; PEARSON 1962; NAGATA 1992).

1.9. Marcadores moleculares.

Na atualidade o melhoramento genético de plantas realiza a integração das técnicas clássicas com aquelas provenientes dos avanços da biotecnologia, levando-se em consideração as vantagens e limitações de cada uma delas. Neste contexto, a tecnologia de marcadores moleculares pode contribuir significativamente para o conhecimento básico da cultura da alface e do caráter estudado, e também para a geração e desenvolvimento de produtos melhorados (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Levando em consideração o fato que a técnica de polinização em alface não é cem por cento eficiente, o uso de marcadores moleculares complementa as estratégias no processo de diferenciação entre plantas híbridas e as providas de autofecundação (DALPIAN, 2004).

Marcadores moleculares são definidos como uma série de métodos de análise genético-molecular que se baseiam na detecção de polimorfismos em proteínas e DNA que podem ser empregados para avaliar as diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos (COLLARD *et al.*, 2005). Os marcadores moleculares podem ser divididos em: Marcadores baseados em enzimas ou marcadores baseados em ácidos nucleicos (DNA ou RNA).

Os marcadores isoenzimáticos ou bioquímicos são baseados em diferentes formas moleculares (variantes) de uma mesma enzima, apresentando função idêntica ou similar, presente em um mesmo indivíduo. Esses marcadores, geralmente fornecem ampla informação genética para diversas aplicações e sua técnica é relativamente barata e acessível. Este tipo de marcadores é muito útil para análises genéticas que não precisam de uma amostragem ampla do genoma. Os marcadores baseados em ácidos nucleicos são caracterizados pela detecção da variação natural nas sequências de DNA ou RNA entre indivíduos que são herdados geneticamente (HELENTJARIS *et al.*, 1986; WILLIAMS *et al.*, 1990; HOFFMANN & BARROSO 2006; TRUCO *et al.*, 2007).

Os marcadores moleculares também podem ser classificados em dois grupos baseados na metodologia utilizada para identificá-los: Grupo 1: marcadores hibridados com sondas específicas e Grupo 2: marcadores revelados mediante amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou locus VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Os marcadores revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) ou ASA (*Amplified Specific Amplicon*); Microsatélites (ou SSR – *Simple Sequence Repeats*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e STS (*Sequence Tagged Sites*) (MILACH, 1998; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; TRUCO *et al.*, 2007). A técnica de RFLP consiste na hibridação de sequências específicas de DNA ou sondas com o DNA total digerido por enzimas de restrição dos indivíduos estudados. Esta técnica elaborada; mais demorada que as outras técnicas para obtenção de resultados; de custo relativamente alto; e tem revelado um grau de polimorfismo de intermediário abaixo, conforme a espécie (AUTRIQUE *et al.*, 1996). Os minissatélites ou locus VTNR são sequências repetitivas de DNA, adjacentes e em número variável. Essa técnica é similar à de RFLP, variando basicamente o tipo de sonda utilizado, e apresentado as vantagens e desvantagens já apresentadas para a técnica de RFLP (JEFFREYS *et al.*, 1985). A técnica RAPD envolve a utilização de marcadores moleculares gerados pela amplificação de segmentos aleatórios de DNA. A técnica é uma variação da PCR. É uma técnica de menor custo, número de etapas, e tempo para obter os resultados; e é fácil de implementar.

Essa, contudo, tem a desvantagem de ser de repetibilidade baixa e pouco consistente de um laboratório para o outro, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais. O nível de polimorfismo obtido com RAPDs varia grandemente com a espécie em questão (WILLIAMS *et al.*, 1990; BACKELJAU *et al.*, 1995; D'ANDREA *et al.*, 2008). Por outro lado, os marcadores SCAR são amplificados com primers específicos, desenvolvidos com base em seqüências já mapeadas ou caracterizadas. Marcadores RAPD podem ser transformados em marcadores SCAR (PARAN & MICHELMORE, 1993). A técnica de SCAR é muito semelhante à de RAPD, com a vantagem de ser mais consistente e desvantagem de envolver o desenvolvimento de primers, o que eleva o custo (SAKIYAMA, 1993). A técnica de AFLP possui grande capacidade para detecção de variabilidade genética e uso em caracterização de cultivares. Entre as vantagens do uso desta estão o alto grau de polimorfismo e o mais alto número de marcadores obtidos por gel analisado. É uma técnica que combina a clivagem de fragmentos de DNA com enzimas de restrição e à amplificação desses fragmentos por PCR (VOS *et al.*, 1995; HONGTRAKUL *et al.*, 1997)

Existem diversas questões relevantes com relação ao uso de marcadores para a caracterização de cultivares, por exemplo o tipo de marcador a utilizar e qual é o número mínimo de marcadores necessários para caracterizar um grupo de cultivares. As respostas a essas baseiam-se muito na espécie em questão e nas técnicas já desenvolvidas para cada espécie (MILACH *et al.*, 1997). Em primeiro lugar, o nível de polimorfismo varia muito de uma espécie para outra. Outro aspecto importante é o número mínimo de indivíduos que deve ser analisado antes que o padrão molecular de um cultivar seja estabelecido. Isto porque, mesmo em espécies que se reproduzem por autofecundação, encontrar variabilidade dentro de um cultivar é comum. Nesse caso, é possível que a caracterização inicial seja feita com uma mistura de DNA de pelo menos dez indivíduos, pois essa amostrará os alelos presentes no cultivar (MILACH *et al.*, 1997).

Uma das dificuldades encontradas no melhoramento genético é o fato do ambiente interferir na expressão fenotípica. Por exemplo no caso de resistência das plantas a doenças. A doença pode não ocorrer por inexistência de inóculo ou condições climáticas favoráveis para seu desenvolvimento, de forma que não existe incidência ou severidade da doença o suficiente para que se diferenciem plantas suscetíveis de plantas resistentes. Assim, o ideal seria que a seleção fosse feita pela presença do gene de interesse ou pela presença de grupos cromossômicos de ligação (HOFFMANN & BARROSO, 2006). Entre as etapas mais importantes no uso de marcadores moleculares está o estabelecimento da relação entre um dado marcador e um locus de interesse. Devido ao fenômeno de recombinação, as regiões que

circunvizinham o loco de interesse podem ser distintas, mesmo entre materiais genéticos aparentados (SILVA, 2012). Para o mapeamento de caracteres agrônômicos em uma espécie é necessário observar uma população segregante tanto para a característica quanto para o marcador. Esses estudos de segregação genica e testes estatísticos para a detecção podem ser realizados em populações F₂ obtidas a partir do cruzamento de dois genótipos contrastantes para a característica. Nas plantas F₂ os gametas de cada indivíduo são informativos e apresenta todas as possíveis combinações dos alelos parentais (AA, Aa & aa). Dessa forma, nas populações F₂ observa-se cada indivíduo tanto para a característica de interesse como para uma série de marcadores moleculares (BERED *et al.*, 1997; GUIMARÃES *et al.*, 2006; HOFFMANN & BARROSO, 2006).

No Brasil é escasso o número de trabalhos envolvendo estudos da herança e mapeamento via marcadores moleculares bem como são poucos os trabalhos tratando do comportamento de cultivares e acesos de alface em resposta a inoculação por espécies de *Berkeleyomyces* e por *Septoria lactucae*. Desta forma, o desenvolvimento de um programa integrado de manejo de doenças que leve em consideração o emprego de resistência genética em cultivares comerciais é essencial. Neste contexto, os principais objetivos da presente pesquisa foram: **(1)** Identificação de fontes de resistência do tipo redutora de taxa do progresso da septoriose (*Septoria lactucae*) em germoplasma de distintos morfotipos de alface; **(2)** Identificação e caracterização de fontes de resistência para espécies de *Berkeleyomyces* em plantas de alface (*L. sativa*) e **(3)** Elucidar a herança da resistência contra duas espécies de *Berkeleyomyces* em *L. sativa* por meio de populações F₂ obtidas a partir do parental resistente (cultivar ‘La Brillante’) e o parental suscetível (cultivar ‘Elisa’).

1.10. Referências bibliográficas.

ABBAS, S. Q.; NIAZ, M.; GHAFAR, A. *Thielaviopsis basicola*: A potential threat to agriculture and forestry in Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, 39: 985–990, 2007.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5^a ed. Elsevier Academic Press, 2005.

AGROFIT - **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumosagricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 18 junho, 2022.

ALLEN, S. J.; SMITH, L. J.; SCHEIKOWSKI, L.; GAMBLEY, C.; SHARMAN, M.; MAAS, S. 2012. Common diseases of cotton. In ‘Cotton pest management guide 2011–2012’. (Cotton Catchment Communities CRC: Narrabri, NSW) **Disponível em:** www.cottoncrc.org.au/industry/Publications/Cotton_Pest_Management_Guide_2011_12. Acesso em: 25 de junho de 2022.

ALMEIDA, D. Asteraceas. In: **Manual de culturas hortícolas**. p. 156-158, Lisboa, 2006.

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno hospedeiro. In: AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., & REZENDE, J. **Manual de Fitopatologia**. v. 1. Agronômica Ceres. Piracicaba, p. 61-63, 2018.

AUTRIQUE, E.; NACHIT, M. M.; MONNEVEUX, P.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphological traits and coefficient of parentage. **Crop Science**, 36: 735-742, 1996.

AZEVEDO FILHO, J. A. A cultura da alface. In: COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R. **Boletim Técnico: Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface**. São Paulo: Instituto Biológico. p.1-126, 2017.

BACKELJAU, T.; DE BRUYN, L.; DE WOLF, H.; JORDAENS, K.; VAN DONGEN, S.; VERHAGEN, R. Y.; WINNEPENNINCKX, B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. **Cladistics**, 11:119-130, 1995.

BEDLAN, G. *Septoria birgatae* sp. nov., a new pathogen causing leaf spots on *Lactuca sativa*. **Mycotaxon**, 70, p.51-53, 1999.

BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M G. DE. Doenças causadas por bactérias In: COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R. **Boletim Técnico: Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface**. São Paulo: Instituto Biológico. p.1-126, 2017.

BESPALHOK, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Noções de Genética Quantitativa**. In: BESPALHOK, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Melhoramento de Plantas. **Disponível em:** www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo (2007). Acesso em novembro de 2022.

BLANCARD, D.; LOT, H.; MAISONNEUVE, B. A. **Color atlas of diseases of lettuce and related salad crops – observation, biology and control**. Academic Press, USA, 375 pp, 2006.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern recognition receptors. in: **Annual Review of Plant Biology**, 60: 379-406, 2009.

CABRAL, C. S.; FONSECA, M.E.N.; BRUNELLI, K. R.; ROSSATO, M.; COSTA, H.; BOITEUX, L. S.; REIS, A. Relationships among Brazilian and worldwide isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 inferred from ribosomal intergenic spacer (IGS-rDNA) region and EF-1 α gene sequences. **European Journal of Plant Pathology**, 152: 81-94, 2018.

CABRAL, C. S.; SANTOS, M. D. M.; BORGES, R. C. F.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; REIS, A. Description of *Golovinomyces orontii* as the causal agent of lettuce (*Lactuca sativa*) powdery mildew in Brazil. **Plant Disease**, 103: 761, 2019a.

CABRAL, C. S.; FONSECA, M. E. N.; OLIVEIRA, V. R.; BOITEUX, L. S.; REIS, A. A single dominant gene/locus model for control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 resistance in lettuce (*Lactuca sativa*). **Euphytica**, 215: 114, 2019b.

CABRAL, C. S.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; BARBOZA, E. A.; VELOSO, J. S.; LOURENÇO, V.; REIS, A. Phenotypic and genetic variability of fungal isolates associated with the Septoria leaf spot disease of lettuce (*Lactuca sativa*) in Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 129: 53-62, 2022.

CAMARGO, L. S. **As hortaliças e seu cultivo**. 3^a ed. Campinas: Fundação Cargill, 252 pp, 1992.

CASTAÑO-ZAPATA, J.; SALAZAR-PINEDA, H. **Illustrated guide for identification of plant pathogens**. Centro Editorial Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, p. 108, 1998.

CHRISTOPOULOU, M.; MCHALE, L. K.; KOZIK, A.; REYES-CHIN WO, S.; WROBLEWSKI, T.; MICHELMORE, R. W. Dissection of two complex clusters of resistance genes in lettuce (*Lactuca sativa*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 28: 751-765, 2015.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A. L. R. Doenças causadas por vírus. In: COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R. **Boletim Técnico**: Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface. São Paulo: Instituto Biológico. p.1-126, 2017.

COLLARD, B. C. Y.; JAHUFER, M. Z. Z.; BROUWER, J. B.; PANG, E. C. K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, 142:169-196, 2005.

COMETTI, N. N.; MATIAS, G. C. S.; ZONTA, E.; MARY, W.; FERNANDES, M. S. Compostos nitrogenados e açúcares solúveis em tecidos de alface orgânica, hidropônica e convencional. **Horticultura Brasileira**, 22:748-753, 2004.

COSTA, C. P.; SALA, F. C. A evolução da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, 23:158-159, 2005.

COUMANS, J. V. F.; HARVEY, J.; BACKHOUSE, D.; POLJAK, A.; RAFTERY, M. J.; NEHL, D.; PEREG, L. Proteomic assessment of host-associated microevolution in the fungus *Thielaviopsis basicola*. **Environmental Microbiology**, 13: 576-588, 2011.

CROUS, P. W.; GAMS, W.; STALPERS, J. A.; ROBERT, V.; STEGEHUIS, G. MYCOBANK: An online initiative to launch mycology into the 21st century. **Studies in Mycology**, 50: 19-22, 2004.

CULTIVAR. **Alface é a folhosa mais consumida no Brasil**. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/noticias/alface-e-a-folhosa-mais-consumida-no-brasil>. acesso em: 20 de julho de 2022.

DAVIS, R. M.; SUBBARAO, K. V.; RAID, R. N.; KURTZ, E. A. **Compendium of Lettuce Diseases**. St. Paul: APS Press, 79 pp, 1997.

DALPIAN, T.; BRAZ, L. T.; MARGARETE, C. Identificação das raças de *Bremia lactucae* que ocorrem na região de Campinas– SP. **Horticultura Brasileira**, 22:2004.

D'ANDREA, L.; FELBER, F.; GUADAGNUOLO, R. Hybridization rates between lettuce (*Lactuca sativa*) and its wild relative (*L. serriola*) under field conditions. **Environmental Biosafety Research**, 7:61–71, 2008.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Redefining Ceratocystis and allied genera. **Studies in Mycology**, 79: 187-219, 2014.

DELGADO, A.; FRANCO, G. M.; PAEZ, J. I.; VEGA, J. M.; CARMONA, E.; AVILES, M. Incidence of cotton seedling diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Thielaviopsis basicola* in relation to previous crop, residue management and nutrients availability in soils in SW Spain. **Journal of Phytopathology**, 154: 710–714, 2006.

DELLA VECCHIA, P. T.; KOCH, P. S.; KIKUCHI, M. Vera: Nova cultivar de alface crespa resistente ao florescimento prematuro. **Horticultura Brasileira**, 17: 171, 1999.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, 411: 843-847, 2001.

ECHER, R.; LOVATTO, P. B.; TRECHA, C. O.; SCHIEDECK, G. Alface à mesa: implicações socioeconômicas e ambientais da semente ao prato. **Revista Thema**, 13: 17-29, 2016.

EMBRAPA/CNPH. **Alface: produção em cultivo protegido**. Brasília, DF: Engenharia de Agricultura. p. 21-26, 2003.

EMBRAPA. **Alface BRS Leila**. 2018. Disponível em: [https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/4224/alface-brs-leila#:~:text=A%20alface%20\(Lactuca%20sativa%20L,possuindo%20relev%C3%A2ncia%20social%20e%20econ%C3%B4mica.&text=Por%20ser%20de%20ciclo%20precoce,em%20solos%20com%20pH%20corrigido](https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/4224/alface-brs-leila#:~:text=A%20alface%20(Lactuca%20sativa%20L,possuindo%20relev%C3%A2ncia%20social%20e%20econ%C3%B4mica.&text=Por%20ser%20de%20ciclo%20precoce,em%20solos%20com%20pH%20corrigido). Acesso em: 22 maio de 2022.

EMBRAPA. **Alface BRS Mediterrânea**. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/4379/alface-brs-mediterranea>. Acesso em: 22 maio de 2022.

FERRAZ, L. C. C. B. NEMATOIDES. In: AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., & REZENDE, J. **Manual de Fitopatologia**. v. 1. Piracicaba: Agronômica Ceres., p. 61-63, 2018.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20, 220 pp, 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª Ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 pp, 1996.

FICHTNER, E. J.; HESTERBERG, D. L.; SMYTH, T. J.; SHEW, H. D. Differential sensitivity of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *Thielaviopsis basicola* to monomeric aluminum species. **Phytopathology**, 96, 212–220, 2006.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2ª ed., UFV, 421pp, 2005.

FILGUEIRA, F. A. R. Asteráceas. Alface e outras folhosas. In: Filgueira, F.A.R. (ed.). **Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna para produção de hortaliças**. 3ª ed. revista e ampliada. UFV, Viçosa, 300-306, 2008.

GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J. V.; SOUZA J. R, C. L. **Marcadores moleculares no Melhoramento de Plantas**. In: BORÉM, A; CAIXETA, E. T. Marcadores Moleculares. UFV. Viçosa, MG, 2006.

HARRIS, E. M. Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: A synthesis of historical and current concepts. **The Botanical Review**, 61: 93-278, 1995.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. A. Tipos de alface cultivados no Brasil. **Embrapa Hortaliças- Comunicado Técnico** (INFOTECA-E), 2009.

HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 315-319, 2000.

HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. **Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas**. Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E), 2006.

HONGTRAKUL, V.; HUESTIS, G. M.; KNAPP, S. J. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics**, 95:400-407, 1997.

HOOPER, L.; CASSIDY, A. A review of the health care potential of bioactive compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86: 1805-1813, 2006.

HORTI&FRUTI. **Anuário Brasileiro de Horti&Fruti**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, p.96. 2019.

INGRAM, D. S.; SARGENT, J. A.; TOMMERUP, I. C. Structural aspects of infection by biotrophic fungi. In: FRIEND, J.; THRELFALL, D. R. **Biochemical aspects of host-parasite relationships**. London: Academic, p. 43-78, 1976.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. **Nature**, 316:76-79, 1985.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO,

- L.E.A. ed. **Manual de Fitopatologia**. Volume 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 2005. 666.p
- KUANG, H.; WOO, S. S.; MEYERS, B. C.; NEVO, E.; MICHELMORE, R. W. Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce. **Plant Cell**, 16: 2870-2894, 2004.
- LI, X.; KAPOV, P.; ZHANG, Y. NLRs in plants. **Current Opinion in Immunology**, 32: 114-121, 2015.
- LIU, J.; LIU, X.; DAI, L.; WANG, G. Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. **Journal of Genetics and Genomics**, 34: 765-776, 2007.
- LEBEDA, A.; DOLEZALOVÁ, I.; FERÁKOVÁ, V.; ASTLEY, D. Geographical distribution of wild *Lactuca species* (Asteraceae, Lactuceae). **Botanical Review**, 70: 328-356, 2004.
- LINDQVIST, K. On the origin of cultivated lettuce. **Hereditas**, 46: 319-350, 1960a.
- LINDQVIST, K. Inheritance studies in lettuce. **Hereditas**, 46: 387-470, 1960b.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da Alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.68, 2010.
- MAUK, P. A.; HINE, R. B. Infection, colonization of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*, and development of black root rot caused by *Thielaviopsis basicola*. **Phytopathology**, 78: 1662-1667, 1988.
- MCHALE, L.K. **Global analysis of disease resistance genes in lettuce**. Ph.D. Thesis, **University of California**, Davis, CA, USA, 2008.
- MCHALE, L. K.; TRUCO, M. J.; KOZIK, A.; WROBLEWSKI, T.; OCHOA, O. E.; LAHRE, K. A.; KNAPP, S. J.; MICHELMORE, R. W. The genomic architecture of disease resistance in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 118: 565-580, 2009.
- MEDEIROS, M. A. D.; VILELA, N. J.; FRANÇA, F. H. Eficiência técnica e econômica do controle biológico da traça-do-tomateiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, 24: 180-184, 2006.
- MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 140 pp, 1998.
- MIMS, C. W.; COPES, W. E.; RICHARDSON, E. A. Ultrastructure of the penetration and infection of pansy roots by *Thielaviopsis basicola*. **Phytopathology**, 90: 843-850, 2000.
- MONAGHAN, J.; ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current opinion in Plant Biology**, 15:349-357, 2012.
- MORAES, G. J.; WANDERLEY, L. J.; COSTA, A. S. 1988. Surto de vira-cabeça na cultura de alface em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, 6: 24-25, 1986.

MOU, B. **Lettuce**. In: PROENZ, J.; NUEZ, F. (Ed.). *Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Cheonopiaceae, and Cucurbitaceae*. New York: **Springer**. p.75-118, 2008.

MYCOBANK-DATABASE (2022) **Disponível em:** <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/25461>. Acesso em: 16 junho, 2022.

NAGAI, H. Obtenção de novos cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) resistente ao mosaico e ao calor: Brasil-303 e 311. **Revista de Olericultura**, 18: 14-21, 1980.

NAGATA, R. T. Clip and wash method of emasculation for lettuce. **HortScience**, 27: 907-908, 1992.

NEHL, D. B.; ALLEN, S. J.; MONDAL, A. H.; LONERGAN, P. A. Black root rot: A pandemic in Australian cotton. **Australasian Plant Pathology**, 33, 87-95, 2004.

NEL, W. J.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; DE BEER, Z. W. A new genus and species for the globally important, multihost root pathogen *Thielaviopsis basicola*. **Plant Pathology**, 67: 871-882, 2018.

NELSON, R. R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, 16: 359-378, 1978.

NEWMAN, M. A.; SUNDELIN, T.; NIELSEN, J. T.; ERBS, G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, 4: 139, 2013.

NOZOMU, M. **Cultivo de Hortaliças**. 2ª ed. Brasília, DF: EMBRAPA, p.18, 1992.

OLIVEIRA, C. M. G.; KUBO, R. K.; ROSA, J. M. O. NEMATOIDES. In: COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R. **Boletim Técnico: Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface**. São Paulo: Instituto Biológico. p.1-126, 2017.

OLIVER, G. W. **New methods of plant breeding**. Washington, DC: United States Bureau of Plant Industry, 1910. p.12-13 (Bulletin 167).

PANSTRUGA, R.; DODDS, P. N. Terrific protein traffic: The mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. **Science**, 324: 748-750, 2009.

PAVAN, M. A.; KUROZAWA, C. Doenças da alface. **Manual de Fitopatologia**, 3ª ed. v.2, São Paulo. Editora Ceres, p.18-25, 1997.

PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATA, R.; KUROZAWA, C. **Doenças da alface**. In: KIMATI H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. 4. ed. Campinas: Agronômica Ceres, v. 2, p. 27-33, 2005.

PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; SILVA, N. D.; ZERBINI, F.M.; LE GALL, O. Virus diseases of lettuce in Brazil. **Plant Viruses**, 2: 35-41, 2008.

PEREG, L. L. Black root rot of cotton in Australia: The host, the pathogen and disease management. **Crop & Pasture Science**, 64: 1112-1126, 2013.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; DE CARVALHO, A. D. F. **Diagnose e controle alternativo de doenças em alface, alho, cebola e Brássicas**. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2013.

PEARSON, O. H. A simplified method for emasculating lettuce flowers. **Vegetable Improvement Newsletter**, 4: 4, 1962.

PESSOA, H. P.; MACHADO JÚNIOR. (2021) **Folhosas: Em destaque no cenário nacional**. Revista Campo e Negócios. Disponível em: < <https://revistacampoenegocios.com.br/folhosas-em-destaque-no-cenario-nacional/>>. Acesso em: 30 de maio, 2022.

PHILLIPS, C. A. Review: Modified Atmosphere Packing and its effects on the Microbiological quality and safety of produce. **International Journal of Food Science and Technology**, 31: 463-479, 1996.

PINOSA, F.; BUHOT, N.; KWAAITAAL, M.; FAHLBERG, P.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ELLERSTRÖM, M.; ANDERSSON, M. X. Arabidopsis phospholipase dd is involved in basal defense and nonhost resistance to powdery mildew fungi. **Plant Physiology**, 163: 896-906, 2013.

PORTER, K.; DAY, B. From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. **Journal of Integrative in Plant Biology**, 58: 299-311, 2016.

PRELL, H. H.; DAY, P. R. **Plant–fungal pathogen interaction. A classical and molecular view**. Springer: Berlin, 2001.

PUNJA, Z. K. Influence of culture conditions on mycelial growth and phialospore production and germination in *Chalara elegans*. **Canadian Journal of Botany**, 71: 447-456. 1993.

RAFIQI, M.; ELLIS, J. G.; LUDOWICI, V. A.; HARDHAM, A. R.; DODDS, P. N. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, 15: 477-482, 2012.

RAVENSDALE, M.; NEMRI, A.; THRALL, P. H.; ELLIS, J. G.; DODDS, P. N. Co-evolutionary interactions between host resistance and pathogen effector genes in flax rust disease. **Molecular Plant Pathology**, 12: 93-102, 2011.

Registro Nacional de Cultivares. Disponível em: https://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Acesso em: 29 junho de 2022.

RESENDE, F. V.; SAMINÊZ, T. C.; VIDAL, M. C.; SOUZA, R. B.; CLEMENTE, F. M. **Cultivo de alface em sistema orgânico de produção**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007.

REYES-CHIN-WO, S., WANG, Z., YANG, X., KOZIK, A., ARIKIT, S., SONG, C., XIA, L.; FROENICKE, L.; LAVELLE, D.; TRUCO, M. J.; XIA, R.; ZHU, S.; XU, C.; XU, H.; XU, X.; COX, K.; KORF, I.; MEYERS, B.; MICHELMORE, R. W. Genome assembly with in vitro proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. **Nature Communications**, 8: 1-11, 2017.

- ROBINSON, R. W.; MCCREIGHT, J. D.; RYDER, E. J. The genes of lettuce and closely related species. **Plant Breeding Reviews**, 1: 267-293, 1983
- RYDER E. J. **Lettuce breeding. Chapter V.** In: BASSETT M.J. (Ed.). **Breeding Vegetable Crops.** AVI Publishing Company, Westport: p. 433-474, 1986.
- RYDER, E. J. Ten lettuce genetic stocks with early flowering genes Ef-1ef-1 and Ef-2ef-2. **HortScience**, 31: 473-475, 1996.
- RYDER, E. J. **Lettuce, Endive and Chicory.** CABI Publishing, New York, 208p, 1999.
- RYDER, E. J. **The new salad crop revolution. Trends in new crops and new uses.** ASHS Press, Alexandria, VA, p. 408-412, 2002.
- SAKIYAMA, N. S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, 11: 204-206, 1993.
- SALA, F. C.; COSTA, C.; TEIXEIRA-YAÑEZ, L. D. D.; BLAT, S. F. Reação de alface a muchadeira (*Thielaviopsis basicola*). **Horticultura Brasileira**, 21: 336, 2003.
- SALA, F. C. **Reação de alface (*Lactuca sativa* L.) a *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris.** Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 103 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- SALA, F. C.; COSTA, C. P.; TEIXEIRA, L. D.; FABRI, E. G.; BLAT, S. F. Reação de cultivares de alface a *Thielaviopsis basicola*. **Horticultura Brasileira**, 26:398-400, 2008.
- SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, 30: 187-194, 2012.
- SALA, F. C.; COSTA, C. P. **Melhoramento de alface.** In: **Melhoramento de Hortaliças.** NICK, C. & BÓREM, A. (Eds.). UFV. Viçosa, MG, 2016.
- SANTOS, A. C. P. D. **Contribuições à genética e melhoramento de alfaces mediante cruzamentos e cultura de tecidos.** Tese Doutorado (Genética e Bioquímica) Universidade Federal de Uberlândia, 1996.
- SARRIS, P. F.; DUXBURY, Z.; HUH, S. U.; MA, Y.; SEGONZAC, C.; SKLENAR, J.; JONES, J. D. A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. **Cell**, 161: 1089-1100, 2015.
- SCHIPPERS, B. Survival of endoconidia of *Thielaviopsis basicola* in soil. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, 76: 206–211.
- SHEW, H. D.; MEYER, J. R. *Thielaviopsis*. In: **Methods for research on soilborne pathogenic fungi.** (Eds LL SINGLETON, JD MIHAIL, CM RUSH) pp. 171-174. **APS Press:** St Paul, MN, 1992.

SILVA, E. B.; RAPOSO, M. C. M.; DA CONCEIÇÃO, M. M.; DOS SANTOS, V. D. O. Capacidade antioxidante de frutas e hortaliças. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 10: 15, 2015.

SIMKO, I.; ATALLAH, A. J.; OCHOA, O. E.; ANTONISE, R.; GALEANO, C. H.; TRUCO, M. J.; MICHELMORE, R. W. Identification of QTLs conferring resistance to downy mildew in legacy cultivars of lettuce. **Scientific Reports**, 3: 1-10, 2013.

SOUSA, C. S.; KERR, W. E.; SANTOS, M. R.; ARRUDA, A. S.; SPINI, V. B.; JULIATTI, F. C.; TAKATSU, A. Mancha de Septoria da alface: isolamento, inoculação e avaliação de cultivares em condições de campo e casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, 28: 555- 558, 2003.

STAEEL, S.; KMIĘCIK, P.; WILLEMS, P.; VAN DER KELEN, K.; COLL, N. S.; TEIGE, M.; VAN BREUSEGEM, F. Plant innate immunity - sunny side up? **Trends in Plant Science**, 20: 3-11, 2015.

SOUZA, R. L. **Identificação molecular e patogenicidade de espécies de *Berkeleyomyces* associadas a hortaliças no Brasil com ênfase na cultura da alface**, 62 p. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2022.

STOVER, R. H. The black root rot disease of tobacco. I. Studies on the causal organism *Thielaviopsis basicola*. **Canadian Journal of Research**, 28: 445-470, 1950.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W. D.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, 35: 748-755, 2005.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K. 696 pp, 1980.

TAKKEN, F. L. W.; GOVERSE, A. How to build a pathogen detector: Structural basis of NB-LRR function. **Current Opinion in Plant Biology**, 15: 375-384, 2012.

TEIXEIRA-YAÑEZ, L. D. D. **Resistência genética, fungicidas e solarização para o controle de *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris na cultura de alface (*Lactuca sativa* L.)**. 103 f. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. **Manejo e métodos de controle de doenças fúngicas na cultura da alface**. Disponível em http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/pdf/prosaf/apostilas/doencas_alface.pdf Acesso em 18 de junho 2022.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Doenças causadas por fungos. In: COLARICCIO, A. & CHAVES, A. L. R. **Boletim Técnico: Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface**. São Paulo: Instituto Biológico. p.1-126, 2017.

TOKESHI, H.; CARVALHO, P. C. T. **Doenças do tomateiro**. In: GALLI, F. (Coord) **Manual de Fitopatologia – Doenças das Plantas Cultivadas**. 2ª ed, Piracicaba-SP, Agronômica Ceres, 1990.

- TRDÁ, L.; BOUTROT, F.; CLAVERIE, J.; BRULÉ, D.; DOREY, S.; POINSSOT, B. Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: Pattern recognition receptors in the frontline. **Frontiers in Plant Science**, 6: 219, 2015.
- TRUCO, M. J.; ANTONISE, R.; LAVELLE, D.; OCHOA, O.; KOZIK, A.; WITSENBOER, H.; FORT, S. B.; JEUKEN, M. J. W.; KESSELI, R. V.; LINDHOUT, P.; MICHELMORE, R. W.; PELEMAN, J. A high-density, integrated genetic linkage map of lettuce (*Lactuca* spp.). **Theoretical and Applied Genetics**, 115: 735-746, 2007.
- VANDERPLANK, J. E. **Plant Disease: Epidemics and Control**. New York: Academic Press, 1963.
- VANETTEN, H. D.; MANSFIELD, J. W.; BAILEY, J. A.; FARMER, E. E. Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus “phytoanticipins”. **Plant Cell**, 6: 1191-1192, 1994.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23: 4407-4414. 1995
- WAYCOTT, W.; FORT, S. B.; RYDER, E. J.; MICHELMORE, R. W. Mapping morphological genes relative to molecular markers in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Heredity**, 82: 245-251, 1999.
- WIN, J.; CHAPARRO-GARCIA, A.; BELHAJ, K.; SAUNDERS, D. G. O.; YOSHIDA, K.; DONG, S.; KAMOUN, S. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 77: 235-247, 2012.
- ZHANG, H.; WANG, C.; CHENG, Y.; WANG, X.; LI, F.; HAN, Q.; KANG, Z. Histological and molecular studies of the non-host interaction between wheat and *Uromyces fabae*. **Planta**, 234: 979-991, 2011.

CAPÍTULO II

Identification of stable sources of rate-reducing resistance to *Septoria lactucae* in lettuce germplasm.

Submitted: **Phytoparasitica**
1.809 (2021)
Impact factor

1 **Identification of stable sources of rate-reducing resistance to *Septoria***
2 ***lactucae* in lettuce germplasm**

3

4 **David Nataren Perdomo¹ • Tiago Bezerra Torres¹ • Cleberly Evangelista Santos² • Cleia**
5 **Santos Cabral³ • Ailton Reis^{1,4} • Leonardo Silva Boiteux^{1,2,4}**

6

7 ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife-PE,
8 Brazil;

9 ²UnB – Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-
10 900, Brasília-DF, Brazil,

11 ³UPIS, Brasília-DF, Brazil,

12 ⁴ Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, CEP 70275-970, Brasília-DF, Brazil.

13 Correspondence: Ailton Reis, ailton.reis@embrapa.br

14 ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5705-3002>

15 Received: xx xxx 2022 / Accepted: xx xxxx 2022 / Published online: xx xxx 2022

16 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31 **Abstract** *Septoria* leaf spot, caused by *Septoria lactucae*, is one of the major open-field diseases
32 of lettuce (*Lactuca sativa*) in tropical and subtropical regions. However, there are few available
33 studies dealing with the identification of useful sources of resistance to this disease. Here, a
34 genetically diverse collection of 42 lettuce accessions was evaluated for *Septoria* leaf spot
35 reaction under open-field conditions (natural inoculum) during the rainy season. The
36 experimental design was randomized blocks with three replications (16 plants each). Although
37 no immunity-like source was detected, 21 accessions displayed superior levels of rate-reducing
38 resistance with significant lower Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) values,
39 encompassing seven accessions of the ‘Crispy green loose-leaf’, eight of the ‘Crispy purple
40 loose-leaf’, two of the ‘Cos/Romaine’, two of the ‘Loose-leaf super crispy’, one accession of
41 the ‘Butterhead’, and one accession of the ‘Iceberg’ morphotype. A subgroup of nine accessions
42 with the highest levels of field resistance was also inoculated under greenhouse conditions with
43 four *S. lactucae* isolates (collected in distinct geographic areas) in two assays at two distinct
44 phenological stages. The cultivars ‘BRS Mediterrânea’ and ‘Vanda’ displayed lowest AUDPC
45 values at the late vegetative/reproductive phenological phase. The remaining accessions
46 displayed intermediate values of AUDPC, with the exception of the cultivar ‘Rubi’ (control),
47 which exhibited moderate levels of susceptibility. The availability for lettuce breeding
48 programs of genetic sources with higher and stable levels of resistance to *S. lactucae* will enable
49 the development of more adapted commercial cultivars, increasing the sustainability of this
50 crop across Neotropical regions.

51

52 **Keywords** *Lactuca sativa* • *Septoria* leaf spot • Plant resistance • Reaction of cultivars.

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65 **Introduction**

66 Lettuce (*Lactuca sativa* L.; Asteraceae family) is among the most economically important
67 vegetable crops around the world (Shatilov et al., 2019). In Brazil, the area employed for lettuce
68 cultivation has continually grown, encompassing \approx 87,000 hectares. The annual production is
69 around 1.5 million tons, involving \approx 670,000 farmers (Pessoa & Machado Júnior, 2021). The
70 Brazilian market is diversified, including distinct lettuce morphotypes, such as ‘Butterhead’,
71 ‘Crispy green loose-leaf’, ‘Iceberg’, ‘Batavian’, ‘Loose-leaf super crispy’ (= ‘Mimosa’),
72 ‘Cos/Romaine’, and ‘Crispy purple loose-leaf’ segments (Sala & Costa, 2012). The ‘Crispy
73 green loose-leaf’ is the leading morphotype, occupying around 53% of the total market share
74 (Pessoa & Machado Júnior 2021).

75

76 The phenological cycle of lettuce is subdivided into four main stages: germination,
77 transplantation, vegetative, and reproductive phases. During each of these stages, multiple
78 diseases can affect the development of lettuce plants. Septoria leaf spot has been a very common
79 disease in the vegetative phase in lettuce-producing regions with mild temperatures (20-24 °C)
80 and in places with rainy weather or sprinkler-irrigation systems (Blancard et al., 2006; Cabral
81 et al., 2022). The disease is more severe in the transition from the vegetative to the reproductive
82 stage, and can often affect stems and floral organs in seed production fields (Bedlan, 1999).
83 The first symptoms are observed on older leaves, being characterized by small, irregular,
84 chlorotic spots bordered by the leaf veins. These spots, as they evolve, might become necrotic
85 and surrounded by a yellowish halo. Lesions can coalesce and affect the entire leaf area, causing
86 total leaf blade blight and premature leaf fall. Under high moisture conditions, pycnidia are
87 formed and a mass of filiform, multiseptated, and hyaline conidia is observed in their upper
88 portion of these structures. Conidia can spread over short distances via wind and/or water
89 splashes, and host invasion occurs via stomata (Bedlan, 1999). The initial inoculum of *S.*
90 *lactucae* is often originated from infested/infected seeds, crop residues or from nearby affected
91 fields. The use of fungicides in conjunction with other disease management measures has not
92 been sufficient to reduce the fungal damage, especially when environmental conditions are
93 conducive to the causal agent.

94

95 Although Septoria leaf spot of lettuce has been reported to be induced by a complex of fungal
96 species of the genus *Septoria* in other continents (Bedlan, 1999; Lohmeier et al., 2013), recent
97 molecular characterization of a wide range of isolates indicated *Septoria lactucae* Passerini
98 (family Mycosphaerellaceae) as the sole causal agent of this disease under Brazilian conditions

99 (Cabral et al., 2022). The identification and incorporation of resistance/tolerance factors to *S.*
100 *lactucae* into commercial cultivars is a central strategy for Septoria leaf spot management as
101 well as other seed-borne pathogens (Cabral et al., 2019). In this context, the main objective of
102 the present study was to search for useful breeding sources of *S. lactucae* resistance/tolerance
103 in a genetically diverse lettuce germplasm collection.

104

105 **Material and methods**

106 **Location of the field and greenhouse assays**

107 All experimental activities were carried out in the field, greenhouses, and laboratories of
108 Embrapa Hortaliças (CNPq), located at an altitude of 996 meters above sea level and
109 geographical coordinates of 15°56'00" South latitude and 48°08'00" West longitude, in the
110 Administrative Region of Gama in Brasília-DF, Brazil.

111

112 **Screening germplasm accessions from distinct lettuce morphotypes to *Septoria lactucae*** 113 **with natural inoculum under open-field conditions**

114 The field experiment was carried out from January to March 2014. Forty-two (42) lettuce
115 accessions were evaluated. The seedlings were produced in styrofoam trays with 128 cells filled
116 with sterilized substrate (Plantmax[®]) and transplanted (after 21 days) into beds fertilized with
117 simple superphosphate. Over time, three topdressing fertilizations with urea (10 g/m²) were
118 carried out at ten, 20, and 30 days. Infestation with the inoculum of *S. lactucae* occurred
119 naturally from old lettuce fields located in the vicinity of the experiment. Evaluations were
120 performed by visual analysis of the leaf damage (= severity) induced by the pathogen at 50, 57,
121 64, and 71 days after sowing. The progress and degree of disease severity were evaluated
122 according to the following scale (Sousa et al., 2003): grade 1 (= 1 to 25%), grade 2 (= 26 to
123 50%), grade 3 (= 51 to 75%), grade 4 (= 76 to 100% of leaf tissue injured). From the seedling
124 transplant period until the last severity assessment, the average temperature was 21.7 °C (range
125 from 19.5 to 24.3 °C); the average accumulated precipitation was 86.0 mm (range from 40.0 to
126 148.0 mm) and the average relative humidity was 73.43 % (range from 54.2 to 82.9 %). In this
127 study, an experimental design of randomized blocks was used with 42 treatments (= lettuce
128 accessions) x three replications (= plots). The plots consisted of 16 plants in a spacing of 0.30
129 x 0.30 m.

130

131 **Field-selection of a subset of lettuce accessions for subsequent greenhouse assays aiming** 132 **to assess the *Septoria lactucae* resistance stability**

133 From the initial screening in the field, a subset of accessions classified as promising sources of
134 resistance/tolerance was selected. The cultivars ‘BRS Mediterrânea’ and ‘Romana LNS’
135 (identified as being tolerant accessions under commercial field conditions) were also included
136 in these subsequent assays. Seeds of the nine field-selected accessions/cultivars (‘Vera’,
137 ‘Vanda’, ‘Romana Lente New Selection’, ‘Rubi’, ‘Isabela’, ‘Elisa’, ‘Banchu New Red Fire’,
138 ‘BRS Mediterrânea’, and ‘Veneranda’) were sowed in styrofoam trays of 126 cells filled with
139 sterilized substrate (Plantmax[®]) and kept in a greenhouse. Seedlings (15 days after sowing)
140 were removed from the cells and then transplanted into plastic pots (1.0 L) containing a
141 previously sterilized mixture. The mixture was composed of 110 g of ammonium sulfate, 510
142 g of super simple fertilizer, 200 g of limestone, 20 liters of raw rice straw, 20 liters of carbonized
143 rice straw and 40 liters of cattle manure for every 200 liters of soil.

144

145 **Fungal isolates and inoculum production for the subsequent greenhouse bioassays**

146 Four *S. lactucae* isolates were employed in the bioassays viz. Sep13 (063.482 TRA –
147 Geographic origin: Goiás, Brazil), Sep26 (063.490 TRA – Geographic origin: Goiás, Brazil),
148 Sep34 (063.496 TRA – Geographic origin: Goiás, Brazil) and Sep39 (063.501 TRA –
149 Geographic origin: Distrito Federal, Brazil). All these isolates were classified as *S. lactucae* via
150 molecular analyses (Cabral et al., 2022). The isolates were cultivated in 9 cm diameter Petri
151 dishes containing oatmeal and agar culture medium (60 grams of oat flour + 18 grams of agar
152 + 1000 mL of distilled water) in an incubator type BOD at constant temperature of 17 °C (12
153 hours light and 12 hours dark) for 13 days until sporulation (Dhingra and Sinclair 1995) for
154 each isolate. For inoculum production (= conidial suspension for each isolate), 10 mL of sterile
155 distilled water was added to each plate. The conidia were released into the suspension using a
156 soft bristle brush and the spore suspension was subsequently filtered through a double layer of
157 gauze. The spore concentration was estimated by counting under an optical microscope using
158 a Neubauer chamber. The suspension was adjusted to a concentration of 2×10^5 conidia/mL.
159 In the final step, 1 mL of Tween 20[®] per liter of water, was added to the suspension aiming to
160 increase spore adhesion to inoculated leaves.

161

162 **Greenhouse assay for *Septoria lactucae* reaction of field-selected lettuce accessions at the** 163 **early vegetative phenological stage**

164 The experiment was carried out during the months of October and November 2021. One hour
165 before inoculation, the 1L-pots containing the lettuce plants were irrigated up to maximum soil
166 saturation. Then, the plants (27 days of sowing) were inoculated by spraying the leaves until

167 the beginning of the suspension run-off. After inoculation, the plants were kept in a humid
168 chamber ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) for 48 hours. Control plants were sprayed only with sterile distilled water
169 plus Tween 20[®]. In order to avoid cross-contamination between isolates, all plants treated with
170 different isolates were kept in different benches (at least one meter apart). Disease incidence
171 assessments were performed by counting the number of leaves with symptoms at 11 days after
172 inoculation and the severity at 11, 13, 19 and 23 days after inoculation, using a scale of scores
173 as a function of the degree of visual leaf damage (= severity). The experiment was carried out
174 in a completely randomized design in a 9×4 factorial arrangement (nine accessions \times four
175 isolates) with four replications and each replication constituted a pot with two plants each. The
176 cultivar ‘Rubi’ served as a susceptible control.

177

178 **Greenhouse assay for *Septoria lactucae* reaction of field-selected lettuce accessions at the** 179 **vegetative-reproductive phenological stage**

180 In May-June, 2022, a third bioassay was carried out with older lettuce plants of the same subset
181 of accessions that were inoculated in order to verify the reaction to fungus *S. lactucae* in the
182 transition of the vegetative to the early reproductive phenological stage. This assay was carried
183 out with identical methodological approaches of the first greenhouse assay with exception that
184 the plants were inoculated at the age of 50-days-old. Evaluations were performed by visual
185 analysis of the severity of leaf damage induced by the pathogen at 57, 64, and 71 days after
186 sowing. The progress and degree of disease severity were evaluated according to the following
187 scale of Sousa et al. (2003).

188

189 **Statistical analyses for all assays**

190 The Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was calculated from the pathogen
191 reaction data (= average severity grades) of each lettuce accession expressed by the arithmetic
192 mean of the scores of all evaluated plants. AUDPC was calculated using the following formula:
193 $\text{AUDPC} = \sum [((y_1 + y_2) / 2) * (t_2 - t_1)]$, where y_1 and y_2 are two consecutive evaluations performed
194 at times t_1 and t_2 , respectively. After obtaining the severity grade values for each lettuce
195 accession, the data were submitted to analysis of variance and the means were grouped by the
196 Scott-Knott test ($P \leq 0.05$) with the assistance of the SISVAR statistical program (Ferreira
197 2011).

198

199 **Results**

200 In the present work, 25 out of the 42 accessions under evaluation were classified as the ‘Crispy

201 loose-leaf' (with green and purple foliage), six as 'Iceberg', four as 'Cos/Romaine', four as
202 'Butterhead' and three as 'Loose-leaf super crispy' (= 'Mimosa') morphotypes (Figure 1). A
203 significant effect was observed among lettuce accessions for the levels of resistance and
204 susceptibility to *S. lactucae* (Table 1). The coefficient of variation for the "disease severity"
205 variable was 14.4%, indicating adequate experimental precision. In general, the lettuce
206 accessions were divided into two large reaction groups based on the comparison of AUDPC
207 means using the Scott-Knott test ($p < 0.05$). However, none of the accessions showed an
208 immune-like reaction. Among the evaluated accessions, 21 displayed superior levels of
209 resistance to *S. lactucae* with mean AUDPC values ranging from 46.00 to 64.50 (Table 1),
210 encompassing seven accessions of the 'Crispy green loose-leaf', eight of the 'Crispy purple
211 loose-leaf', two of the 'Cos/Romaine', two of the 'Mimosa', one accession of the 'Butterhead',
212 and one of the 'Iceberg' morphotype (Figure 1). In the field assay, 21 accessions showed a
213 reaction classified as susceptibility with mean AUDPC values ranging from 70.50 to 97.00
214 (Table 1). Of the group of susceptible accessions, nine were of the 'Crispy green loose-leaf, one
215 of the 'Crispy purple loose-leaf', five of the 'Iceberg', two of the 'Cos/Romaine', three of the
216 'Butterhead' and one of the 'Mimosa' morphotype (Figure 1).

217

218 In this bioassay, seven cultivars ('Vera', 'Vanda', 'Rubi', 'Isabela', 'Elisa', 'Banchu NRF', and
219 'Veneranda') belonging to the subgroup of accessions with the best performance under field
220 conditions were re-evaluated under greenhouse conditions (Table 2). The cultivars 'BRS
221 Mediterrânea' and 'Romana LNS' (both displaying high levels of resistance to *S. lactucae* under
222 commercial conditions) were also included in these trials. The expression of the typical disease
223 symptoms started at the third day after inoculation in all accessions, being characterized by
224 necrotic lesions in the leaf blade and by irregular and chlorotic areas delimited by veins.
225 Significant differences ($P \leq 0.05$) were observed among the cultivars in relation to the AUDPC
226 values. The coefficient of variation for the variable "disease severity" was 18.22%, indicating
227 good experimental precision. Based on the values of this index, the cultivar 'BRS
228 Mediterrânea', displayed a superior performance with significantly lower AUDPC values (=
229 12.28) than the remaining cultivars, indicating lower levels of severity/higher level of disease
230 resistance in this cultivar (Table 2). The accessions 'Elisa', 'Romana LNS', 'Vera',
231 'Veneranda', 'Vanda', 'Banchu NRF', and 'Isabela' displayed an intermediate reaction, with
232 mean AUDPC values ranging from 13.66 to 17.63. The cultivar 'Rubi' (used as susceptible
233 control), was moderately susceptible to the pathogen (AUDPC value = 23.72), but in significant
234 contrast to the other cultivars. No significant differences ($P \leq 0.05$) were observed in

235 aggressiveness among the *S. lactucae* isolates (Table 2), exhibiting similar levels of infected
236 leaf tissue. All isolates were pathogenic to all cultivars, indicating a lack of cultivar-specificity
237 of the tested isolates (Table 3).

238

239 In general, the accessions showed statistically significant differences ($P \leq 0.05$) for the reaction
240 to *S. lactucae* during the transition from the vegetative to the reproductive phenological phase
241 (Table 3). The experimental coefficient of variation for the variable “disease severity” was
242 15.48 %, indicating good levels of experimental precision. The cultivar ‘BRS Mediterrânea’
243 was statistically different from the other cultivars/accessions evaluated, displaying higher levels
244 of rate-reducing resistance with an average AUDPC of 17.09 versus 30.66 of AUDPC of the
245 cultivar ‘Rubi’ (susceptible control). The cultivars ‘Vanda’, ‘Veneranda’, ‘Vera’, and ‘Romana
246 LNS’ displayed intermediate values of AUDPC (ranging from 18.91 to 22.2), while a higher
247 disease severity was observed for the cultivars ‘Banchu NRF’ (AUDPC: 24.97) followed by
248 ‘Isabela’ (AUDPC: 25.50) and ‘Elisa’ (AUDPC: 28.13). However, we observed overall lower
249 AUDPC values and lower levels of aggressiveness of *S. lactucae* isolates under greenhouse
250 conditions (Tables 2 and 3) when compared with trials conducted under field conditions during
251 the rainy season (Table 1).

252

253 **Discussion**

254 Septoria leaf spot is considered one of the main fungal diseases in lettuce in Brazil. From an
255 epidemiological point of view, its incidence and severity are favored by conditions of high
256 humidity with temperatures ranging between 20-24 °C. The presence of dew and high relative
257 humidity allow the prompt germination of *S. lactucae* conidia that can subsequently penetrate
258 into the plant tissue, inducing the characteristic set of symptoms (Bedlan, 1999; Blancard et al.,
259 2006; Nao, 2008). The levels of disease observed under field conditions in the present
260 investigation corroborate the epidemiological parameters indicated as favorable to *S. lactucae*.
261 The assay was conducted coinciding with the months of January to March, when high levels of
262 rainfall are observed in Central Brazil. The weekly averages of temperature (21.7 °C),
263 precipitation (86.0 mm) and relative humidity (73.43 %) during the field assay are within the
264 appropriate range for disease onset and progression, providing ideal conditions for the
265 development of the pathogen.

266

267 In the field trial, it was possible to separate the accessions into two discrete reaction groups
268 based upon the comparison of their AUDPC means. Although no immunity-like source was

269 detected, 21 accessions were identified displaying higher levels of rate-reducing field resistance
270 to *S. lactucae* with significant lower AUDPC values, which is the major indicator of plant
271 accessions with improved levels of quantitative or field resistance (Vanderplank, 1984;
272 Campbell & Madden, 1990). In this trial, a better performance was observed, as a group, of the
273 cultivars of the ‘Crispy loose-leaf’. Accessions from this morphotype were in the top ten in
274 terms of rate-reducing resistance to *S. lactucae*.\

275

276 In general, the field-selected lettuce accessions displayed statistically significant differences
277 among themselves for the reaction to *S. lactucae* in the transition from the vegetative to the
278 reproductive phase, with special emphasis for the cultivars ‘BRS Mediterrânea’ and ‘Vanda’
279 that displayed significantly lower AUDPC values. Rate-reducing resistance is a complex
280 phenotype, resulting from the coordinated action of different defense mechanisms, either
281 impairing or avoiding the plant invasion and/or damage induced by variants of a given pathogen
282 species (Heath, 2000). The major phenotype associated with quantitative disease resistance in
283 different pathosystems is the ability of a subset of host accessions in reducing the rate of disease
284 progress, which can be demonstrated by significantly lower AUDPC values (Willoquet et al.,
285 2017). In general, quantitative/rate-reducing resistance is based on the presence of biochemical
286 barriers as well as distinct physical, anatomical, and morphological mechanisms (Dixon, 2001),
287 which were not yet evaluated in the lettuce \times *S. lactucae* pathosystem.

288

289 Septoria leaf spot in lettuce might be characterized as a typical “low-sugar disease” (*sensu*
290 Vanderplank, 1984), becoming more severe in the transition from the vegetative to the
291 reproductive phenological phase. For this reason, we evaluated the reaction of the selected
292 accession in two phenological stages (at the early vegetative and at vegetative-reproductive
293 phenological stages). Significant differences were also observed under greenhouse conditions
294 among seven field-selected accessions (‘Vera’, ‘Vanda’, ‘Rubi’, ‘Isabela’, ‘Elisa’, ‘Banchu
295 NRF’ and ‘Veneranda’) as well as the cultivars ‘BRS Mediterrânea’ and ‘Romana LNS’ for the
296 response to four *S. lactucae* isolates. Again, two cultivars of the ‘Crispy loose-leaf’ group
297 (‘BRS Mediterrânea’ and ‘Vanda’) displayed superior levels of stable performance against this
298 collection of fungal isolates in both phenological stages.

299

300 The lack of variability, in terms of aggressiveness, observed among our *S. lactucae* isolates can
301 be explained by the previous observations that the genetic diversity of these fungal populations
302 is extremely low under Brazilian conditions (Cabral et al., 2022). Probably one or a few isolates

303 of the pathogen were introduced in the country and they are being disseminated in the different
304 lettuce-producing regions, via contaminated seeds, resulting in no yet significant variations for
305 the aggressiveness profile within these *S. lactucae* populations.

306

307 Although no immunity-like source was detected, a subset of lettuce accessions displayed higher
308 levels of resistance of the rate-reducing resistance to *S. lactucae*. Our results indicate that there
309 are distinguishable levels of rate-reducing resistance across the different morphotypes of lettuce
310 with a higher frequency of promising accessions within the ‘Crispy green loose-leaf’ group.
311 Brazil is one of the few countries in the world where the ‘Crispy green loose-leaf’ lettuce
312 segment is the market leader, with the release in recent years of ≈ 380 new cultivars, with 70%
313 of them belonging to this morphotype. Thus, it is possible to speculate that the wide acceptance
314 (especially by the growers) of cultivars from this morphotype might be associated with their
315 superior adaptation traits to Brazilian Neotropical regions, including their higher levels of rate-
316 reducing resistance to foliar pathogens such as *S. lactucae*.

317

318 It is important to highlight, that accessions of different lettuce morphotypes were also detected
319 showing promising levels of rate-reducing resistance to *S. lactucae* and they can be incorporated
320 in breeding programs aiming to broaden the genetic basis of resistance. The identification of
321 genetic factors controlling resistance to *S. lactucae* is crucial since the development of cultivars
322 with characteristics of tolerance and/or resistance to this pathogen is an important strategy to
323 guarantee the sustainability of the production system of this vegetable across Neotropical
324 regions.

325

326 **Acknowledgments**

327 The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
328 for the support to the Postgraduate Program in Plant Pathology of the Federal Rural University
329 of Pernambuco – UFRPE. Ailton Reis and Leonardo S. Boiteux thank the CNPq for their
330 scholarship grants.

331

332 **Authors’ Contribution**

333 All authors contributed to the study design. DNP, LSB and AR developed the idea and wrote
334 the manuscript in equal parts. DNP, TBT, CDS and CSC performed the experiments, TBT,
335 CDS and CSC read and edited the preliminary version. All authors read, commented and
336 approved the final version of the manuscript.

337

338 **Declarations**339 **Conflicts of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.340 **Ethical approval:** This article does not contain any studies with human participants or
341 animals performed by any of the authors.

342

343 **References**

- 344 Bedlan, G. (1999) *Septoria birgittae* sp. nov., a new pathogen causing leaf spots on *Lactuca*
345 *sativa*. *Mycotaxon*, *70*, 51–53
- 346 Blancard, D., Lot, H., Maisonneuve, & B.A. (2006) Color atlas of diseases of lettuce and related
347 salad crops – observation, biology, and control. Academic Press, USA, pp 375
- 348 Cabral, C.S., Fonseca, M.E.N., Oliveira, V.R., Boiteux, L.S., & Reis, A. (2019) A single
349 dominant gene/locus model for control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1
350 resistance in lettuce (*Lactuca sativa*). *Euphytica*, *215*, 114. [https://doi.org/10.1007/s10681-](https://doi.org/10.1007/s10681-019-2441-2)
351 [019-2441-2](https://doi.org/10.1007/s10681-019-2441-2)
- 352 Cabral, C.S., Fonseca, M.E.N., Boiteux, L.S., Barboza, E.A., Veloso, J.S., Lourenço, V., &
353 Reis, A. (2022) Phenotypic and genetic variability of fungal isolates associated with the
354 *Septoria* leaf spot disease of lettuce (*Lactuca sativa*) in Brazil. *Journal of Plant Disease*
355 *and Protection*, *129*, 53–62 <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00537-9>
- 356 Campbell, C.L., Madden, L.V. (1990) Introduction to plant disease epidemiology. New York:
357 John Wiley & Sons, pp 532
- 358 Dhingra, O.D., & Sinclair, J.B. (1995) Basic Plant Pathology Methods. Lewis Publishers, Boca
359 Raton, Florida. pp 448
- 360 Dixon, R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* *411*: 843–847
- 361 Ferreira, D.F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*,
362 *35*, 1039–1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- 363 Heath, M.C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in*
364 *Plant Biology*, *3*, 315–319
- 365 Kim, B.R., Choi, Y.J., & Shin, H.D. (2020) First report of leaf spot caused by *Septoria lactucae*
366 on *Lactuca serriola* in Korea. *Plant Disease*, *104*, 581. [https://doi.org/10.1094/PDIS-08-](https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1639-PDN)
367 [19-1639-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1639-PDN)
- 368 Lohmeier, U., Farahani-Kofoet, R.D., Kofoet, A., & Grosch, R. (2013) Factors affecting
369 incidence and severity of leaf spot disease on lettuce caused by *Septoria birgittae*. *Annals*
370 *of Applied Biology*, *162*, 221–230. <https://doi.org/10.1111/aab.12016>

- 371 Nao, M. (2008) Effects of inoculum density, leaf wetness duration and nitrate concentration on
372 the occurrence of lettuce leaf spot. *Journal of General Plant Pathology*, 74, 208–212.
373 <https://doi.org/10.1007/s10327-008-0086-4>
- 374 Pessoa, H.P., & Machado Júnior, R. (2021) Folhosas: Em destaque no cenário nacional. *Revista*
375 *Campo e Negócios*, available: [https://revistacampoenegocios.com.br/folhosas-em-](https://revistacampoenegocios.com.br/folhosas-em-destaque-no-cenario-nacional)
376 [destaque-no-cenario-nacional](https://revistacampoenegocios.com.br/folhosas-em-destaque-no-cenario-nacional). Accessed 30 May 2022
- 377 Sala, F.C., & Costa, C.P. (2012) Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira.
378 *Horticultura Brasileira*, 30, 187–194
- 379 Saha, S., Kalia, P., Sureja, A.K., Srivastava, A., & Sarkar, S.K. (2016) Genetic analysis of
380 bioactive compounds and antioxidant properties in lettuce (*Lactuca sativa*). *Indian Journal*
381 *of Agricultural Science*, 86, 1471–1476
- 382 Shatilov, M.V., Razin, A.F., & Ivanova, M.I. (2019). Analysis of the world lettuce market. In:
383 IOP Conference Series: *Environmental Earth Science*, 395, 012053.
384 <https://doi.org/10.1088/1755-1315/395/1/012053>
- 385 Sousa, C.S., Kerr, W.E., Santos, M.R., Arruda, A.S., Spini, V.B.M.G., Juliatti, F.C., & Takatsu,
386 A. (2003) Lettuce Septoria leaf spot: Isolation, inoculation, cultivar evaluation in field and
387 greenhouse conditions. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 555–558.
388 <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000500016>
- 389 Vanderplank, J.E. (1984). *Disease Resistance in Plants*. 2nd Edition, Academic Press, Orlando-
390 Florida, USA. pp 191
- 391 Willocquet, L., Savary, S., & Yuen, J. (2017) Multiscale phenotyping and decision strategies
392 in breeding for resistance. *Trends Plant Sci* 22: 420–432.
393 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.01.009>
- 394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404

405 **Table 1** Mean values for the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) obtained from
 406 four evaluations of the severity levels of foliar damage induced by *Septoria lactucae* in a
 407 collection of accessions/cultivars of lettuce morphotypes evaluated under open-field conditions
 408 in Brasilia-DF, Brazil.

409

Accession	Morphotype*	Severity**	Accession	Morphotype*	Severity**
Beijupirá	CGL	46.00 a	Verônica	CGL	70.50 b
Romana LNS	ROM	46.83 a	Lavinia	MIM	70.50 b
Roxane	MIM	48.50 a	Livia	BHD	70.50 b
Vanda	CGL	49.00 a	AEX3-2	CGL	70.83 b
Vera	CGL	49.00 a	Scarlet	CPL	73.67 b
Karla	BHD	50.50 a	AC-5053-4	CGL	74.00 b
Isabela	CPL	51.33 a	AEX-57	CGL	76.00 b
Banchu Red Fire	CPL	51.50 a	Irene	ICE	76.17 b
Rubi	CPL	53.33 a	AC-5053-1	CGL	77.00 b
Romana Agrocinco	ROM	54.00 a	Gisele	ICE	77.00 b
Mimosa Bolinha	MIM	55.25 a	Romana Monter	ROM	77.00 b
Veneza Roxa	CPL	56.33 a	Mauren	ICE	77.33 b
SRV-2005	CGL	57.00 a	Saia Veia	BHD	77.50 b
Veneranda	CGL	57.00 a	Sem Rival	BHD	81.68 b
Açucena	CPL	57.00 a	Maisah	ICE	77.33 b
TPC-12047	CGL	59.00 a	AEX3-3	CGL	82.00 b
Laurel	ICE	59.00 a	Raider Plus	ICE	83.76 b
Bihai	CPL	60.00 a	AMX3-1	CGL	84.00 b
Rubra	CPL	60.00 a	AEX-147	CGL	84.50 b
Itapuã Super	CGL	63.50 a	Sophia	ROM	91.00 b
Rubia	CPL	64.50 a	AC-5053-2	CGL	97.00 b
CV (%): 14.40					

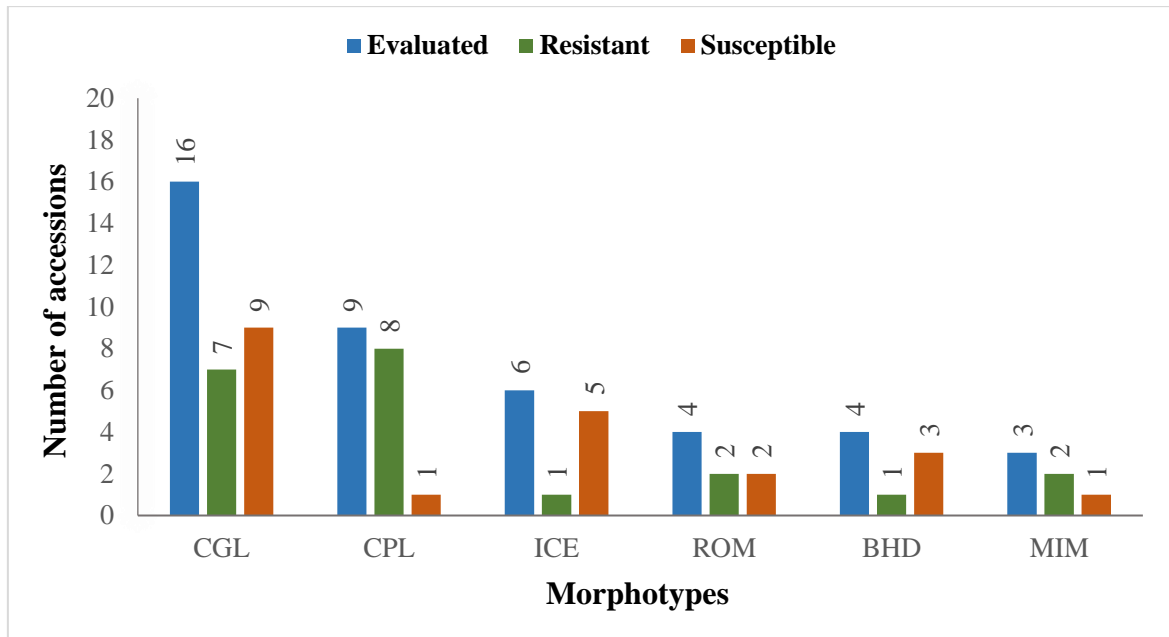
410

411 *Lettuce morphotypes: ‘Crispy Green Loose-Leaf’ (CGL), ‘Crispy Purple Loose-Leaf’ (CPL), ‘Iceberg’ (ICE),
 412 ‘Cos/Romaine’ (ROM), ‘Butterhead’ (BHD), and ‘Mimosa’ (MIM).

413 **Means followed by distinct lowercase letters in the column differ from each other, by the Scott-Knott test at 5%
 414 probability.

415

416



417

418 **Fig. 1** Classes of reaction (resistance or susceptibility) to *Septoria lactucae* of 42
 419 cultivars/accessions of different lettuce morphotypes evaluated under open-field conditions
 420 (natural inoculum) in Brasilia-DF, Brazil. Codification of the lettuce morphotypes: ‘Crispy
 421 Green Loose-Leaf’ (CGL), ‘Crispy Purple Loose-Leaf’ (CPL), ‘Iceberg’ (ICE), ‘Cos/Romaine’
 422 (ROM), ‘Butterhead’ (BHD), and ‘Mimosa’ (MIM).

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441 **Table 2** Mean values of the Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) observed in a
 442 greenhouse assessment of the severity of four *Septoria lactucae* isolates in a subgroup of field-
 443 selected lettuce accessions at the early vegetative phenological stage. Brasilia-DF, Brazil.
 444

Accession	Morphotype*	Severity / Isolate**				Mean
		Sep-13	Sep-26	Sep-34	Sep-39	
BRS Mediterrânea	CGL	13.13 Aa	11.13 Aa	12.63 Aa	12.25 Aa	12.28
Elisa	BHD	13.75 Aa	11.13 Aa	13.25 Aa	14.25 Aa	13.66
Romana LNS	ROM	14.00 Aa	14.63 Ab	14.88 Aa	13.00 Aa	14.13
Vera	CGL	14.75 Aa	15.00 Ab	14.50 Aa	14.25 Aa	14.62
Veneranda	CGL	13.13 Aa	15.75 Ab	14.00 Aa	16.13 Aa	14.75
Vanda	CGL	13.00 Aa	15.13 Ab	15.38 Aa	16.38 Aa	14.97
Banchu NRF	CPL	17.60 Bb	19.63 Bc	14.25 Aa	14.50 Aa	16.50
Isabela	CPL	16.38 Ab	15.50 Ab	18.63 Bb	20.00 Bb	17.63
Rubi	CPL	22.60 Ac	28.28 Bd	21.88 Ac	22.13 Ab	23.72
Mean		15.38	16.47	15.49	15.88	CV: 18.22

445

446

*Lettuce morphotypes: 'Crispy Green Loose-Leaf' (CGL), 'Crispy Purple Loose-Leaf' (CPL), 'Iceberg' (ICE), 'Cos/Romaine' (ROM),
 447 'Butterhead' (BHD), and 'Mimosa' (MIM).

448

**Means followed by different letters, uppercase in the line and lowercase in the column, differ from each other, using the Scott-Knott test at
 449 5% probability.

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466 **Table 3** Mean values of the Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) observed in a
 467 greenhouse assessment of the severity of four *Septoria lactucae* isolates in a subgroup of field-
 468 selected lettuce accessions at the late vegetative/reproductive phenological stage. Brasilia-DF,
 469 Brazil.

470

Accession	Morphotype*	Severity / Isolate**				Mean
		Sep-13	Sep-26	Sep-34	Sep-39	
BRS Mediterrânea	CGL	16.75 Aa	19.88 Ba	14.75 Aa	17.00 Aa	17.09
Vanda	CGL	19.38 Aa	17.13 Aa	20.75 Ab	18.38 Aa	18.91
Veneranda	CGL	20.25 Ba	16.38 Aa	19.63 Bb	20.75 Bb	19.25
Vera	CGL	25.13 Bb	17.38 Aa	21.88 Bb	21.38 Bb	21.44
Romana LNS	ROM	20.75 Aa	22.63 Ab	20.63 Ab	25.00 Ac	22.25
Banchu NRF	CPL	23.75 Ab	24.63 Ab	25.75 Ac	25.75 Ac	24.97
Isabela	CPL	24.38 Ab	24.63 Ab	29.00 Bd	24.00 Ac	25.50
Elisa	BHD	28.50 Ac	29.63 Ac	27.00 Ac	27.38 Ac	28.13
Rubi	CPL	31.00 Ac	28.25 Ac	30.88 Ad	32.50 Ad	30.66
Mean		23.32	22.28	23.36	23.57	CV: 15.48

471

472 *Lettuce morphotypes: 'Crispy Green Loose-Leaf' (CGL), 'Crispy Purple Loose-Leaf' (CPL), 'Iceberg' (ICE), 'Cos/Romaine' (ROM),
 473 'Butterhead' (BHD), and 'Mimosa' (MIM).

474 **Means followed by distinct lowercase letters in the column differ from each other, by the Scott-Knott test at 5% probability.

475

CAPÍTULO III

Sources of broad-spectrum resistance to *Berkeleyomyces basicola* and *B. rouxiae* isolates in lettuce (*Lactuca sativa*) germplasm.

Submitted: **Journal of Plant Diseases and Protection**
Impact factor = 1.847 (2021)

1 **Sources of broad-spectrum resistance to *Berkeleyomyces basicola* and *B.***
2 ***rouxiae* isolates in lettuce (*Lactuca sativa*) germplasm.**

3 • **David Nataren Perdomo¹ • Tiago Bezerra Torres¹ • Ruthe Lima de Souza¹ • Cleia Santos**
4 **Cabral² • Ailton Reis^{1,3} • Maria Esther de Noronha Fonseca³ • Leonardo Silva Boiteux^{1,3,4}**

5

6 ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
7 Recife-PE, Brazil;

8 ²UPIS, Brasília-DF, Brazil;

9 ³Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, Brazil;

10 ⁴Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF, Brazil,

11

12 Correspondência: Leonardo Silva Boiteux, leonardo.boiteux@embrapa.br.

13 **ORCID:** 0000-0002-5791-8002

Abstract

The widespread and traditional practice of carrying out successive plantings of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in the very same producing area has gradually increasing the incidence of soil-borne diseases under Brazilian conditions. One of the emerging problems has been the black root rot disease, caused by two species of the genus *Berkeleyomyces* (*B. basicola* and *B. rouxiae*). Nationwide surveys employing molecular characterization of the *Berkeleyomyces* isolates indicated similar levels of incidence of *B. basicola* and *B. rouxiae* in lettuce-producing areas. Resistance sources to *B. basicola* have already been identified in lettuce germplasm. However, there is yet no information available on sources of resistance in lettuce simultaneously effective against these two fungal species. In the present work, the reactions of genetically diverse germplasm collection of different lettuce morphotypes were evaluated in two bioassays. In the first bioassay, 68 lettuce accessions were inoculated with a *B. basicola* isolate. In the second bioassay, 33 cultivars identified as promising sources of resistance to the *B. basicola* isolate in the first bioassay were individually inoculated with two *B. basicola* and two *B. rouxiae* isolates. Although species-specific reactions were detected, a strong correlation was observed between resistance reactions for *B. basicola* and for *B. rouxiae* with the most promising accessions showing resistance to both pathogens. The morphotypes ‘Cos/Romaine’ and ‘Batavian’ showed higher frequency of resistant accessions. Heterogenous responses were observed across accessions of the morphotypes ‘Crispy green loose-leaf’, ‘Crispy purple loose-leaf’, ‘Mimosa’, and ‘Iceberg’. Most of the cultivars from the ‘Butterhead’ morphotype were classified as susceptible. The identification of resistance sources effective against both *B. basicola* and *B. rouxiae* in accessions of different morphotypes opens the opportunity for the lettuce breeding programs to incorporate these genetic factors in a wide range of commercial cultivars.

Keywords: *Lactuca sativa*, soil-borne pathogens, wilt, resistance, cultivar reaction, germplasm

Introduction

39
40 Lettuce (*Lactuca sativa* L.; Asteraceae family) is the most important leafy vegetable in Brazil,
41 occupying around 85,000 hectares and encompassing \approx 670,000 rural establishments (Pessoa
42 and Machado Júnior 2021). The lettuce market in Brazil is highly segmented, with a wide range
43 of morphotypes, including ‘Green crispy loose-leaf’ (market leader), ‘Butterhead’, ‘Iceberg’,
44 ‘Mimosa’ (= ‘Green and Red Salad Bowl’ or ‘Super crispy’ morphotypes) and ‘Cos/Romaine’
45 (Sala and Costa 2012). Although with increasing levels of production, many biotic problems
46 still affect lettuce cultivation in Neotropical regions.

47
48 The traditional practice of carrying out successive cultivations of lettuce in the same area has
49 gradually increasing the incidence of soil-borne diseases under Brazilian conditions. One of the
50 emerging lettuce problems has been the black root rot disease caused by species of the
51 hemibiotrophic genus *Berkeleyomyces* (Order Microascales, Family Ceratocystidaceae,
52 Phylum Ascomycota) (Nel et al. 2018). Taxonomic studies have reorganized the genus
53 *Berkeleyomyces* into two species: *B. basicola* (former *Thielaviospsis basicola*) and *B. rouxiae*
54 (Nel et al. 2018). *Berkeleyomyces* species do not show clear-cut host specificities, and they may
55 indistinctly infect around 170 plant species (Coumans et al. 2011; Pereg 2013; Borges et al.
56 2014; Shukla et al. 2021; Shukla et al. 2021; Farr and Rossman 2022). In the affected host
57 tissues, endoconidia (readily air-dispersed) and chlamydospores are formed (Pereg 2013). The
58 persistence of chlamydospores in the soil and the broad host range of *Berkeleyomyces* species
59 makes difficult to eradicate these pathogens from infested fields (De Beer et al. 2014; Nel et al.
60 2018). *Berkeleyomyces* species are favored by temperatures between 20 and 30 °C (Pereg 2013).
61 The infection cycle begins with a short biotrophic phase followed by a necrotrophic phase
62 where the pathogen induces the characteristic dark coloration of the roots, resulting in root rot,
63 stunting, wilting, and plant death (Mims et al. 2000; Nehl et al. 2004; Pereg 2013).

64
65 In Brazil, the disease was initially detected in lettuce in Rio de Janeiro State in the late 1990s
66 (Silva et al. 1999), and it is currently a limiting factor for the ‘Iceberg’ and ‘Butterhead’
67 morphotypes in all producing regions. (Sala et al. 2008; Souza 2022). In this scenario of
68 expansion of production areas contaminated with *B. basicola* and/or *B. rouxiae*, the
69 implementation of management alternatives is necessary. However, the available options for
70 cultural or chemical control after invasion of these pathogens in novel areas are scarce,
71 inefficient and/or costly (O’Brien and Davis 1994; Huang and Kang 2010; Lopes et al. 2010).

72

73 In this context, the use of resistant cultivars is one of the few sustainable methods to control
74 *Berkeleyomyces* species. Sources of resistance were detected only against *B. basicola* isolates
75 (Teixeira-Yañez 2005; Sala et al. 2008). However, lettuce cultivation can be equally affected
76 by *B. basicola* and *B. rouxiae*. In fact, recent surveys and molecular characterization of isolates
77 from different lettuce-producing regions indicated similar levels of incidence of *B. basicola* and
78 *B. rouxiae* in Brazil (Souza 2022). Thus, the main objective of the present work was to evaluate
79 a diversified germplasm collection composed of accessions from different *L. sativa*
80 morphotypes searching for sources of multiple genetic resistance against isolates of the causal
81 agents of the black root rot disease – *B. basicola* and *B. rouxiae*.

82

83

Material and methods

84 All bioassays were carried out during the year 2021 in the greenhouses and at the Plant
85 Pathology and Plant Breeding Laboratories of the Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças,
86 (CNPq, Embrapa Hortaliças) located at an altitude of 996 meters above sea level and
87 geographic coordinates of 15° 56' 00" South latitude and 48° 08' 00" west longitude, in the
88 Gama Administrative Region in Brasília-DF, Brazil.

89

90 ***Berkeleyomyces* isolates and inoculum production for the bioassays** – The isolates of *B.*
91 *basicola* and *B. rouxiae* used in the present study were obtained from symptomatic lettuce
92 plants and previously identified at species level via molecular analyses (Souza 2022). The
93 *Berkeleyomyces* isolates were collected in the following geographic regions of Brazil: The *B.*
94 *basicola* isolates (EH-2733 and EH-2740) were collected in Vargem Bonita, Distrito Federal-
95 DF (15° 47' 60" S; 47° 52' 58" W) and Paulínia, São Paulo-SP (22° 45' 40" S; 47° 9' 15" W) in
96 the year 2021. The *B. rouxiae* isolates (EH-2741 and EH-2743) were collected in Uberlândia,
97 Minas Gerais-MG (18° 55' 8" S; 48° 16' 37" W) and Santa Maria de Jetibá, Espírito Santo-ES
98 (20° 2' 27" S; 40° 44' 45" W), in 2021, respectively. These isolates were grown in Petri dishes
99 (9-cm-diameter), containing Potato Dextrose Agar (PDA-t) culture medium (20 g of potato, 20
100 g of dextrose, 20 g of agar, 1000 mL of distilled water and 30 mg of tetracycline/L), in a BOD
101 incubator at a constant temperature of 23°C (12 hours light and 12 hours dark) for 15 days
102 (Dhingra and Sinclair 1995). Conidia suspension was prepared by adding 10 mL of sterilized
103 distilled water to each plate, then the conidia were released with the aid of a soft bristle brush.
104 The spore suspension was subsequently filtered through a double-layer gauze. The spore
105 concentration was estimated under an optical microscope by counting them with the help of a
106 Neubauer chamber. In the final step, the suspension was adjusted to concentrations of 7.5×10^5

107 or 2×10^6 conidia/mL. For each isolate, the suspension was prepared, adjusted, and inoculated
108 separately.

109

110 **Seedling production and inoculation protocol employed in the bioassays** – Seeds of the
111 lettuce accessions were sown in 6.2 cm deep polystyrene trays with 128 cells, containing
112 previously sterilized substrate, sown at a depth of 3 mm and kept at a greenhouse where they
113 were irrigated twice a day. At 21 days after germination, the seedlings were gently removed
114 from the cells and washed in running water to eliminate the substrate adhered to the roots. Then
115 the root system of each seedling was immersed in 3 mL of the spore suspension (2×10^6
116 conidia/mL) for three minutes. The residual suspension was placed near the crown area of each
117 transplanted seedling with the aid of a micropipette. The seedlings were transplanted into trays
118 (72 cells) containing 1/3 of the substrate (Plantmax[®]) infested 10 days before with
119 *Berkeleyomyces* spores at a concentration of 7.5×10^5 conidia/gram of substrate. Control plants
120 were dipped into sterilized distilled water and transplanted to trays containing non-colonized
121 substrate and kept at least one meter away from the inoculated plants.

122

123 **Bioassay #1: Reaction of lettuce accessions inoculated with *Berkeleyomyces basicola* isolate**
124 **EH-2733** – Sixty-eight (68) lettuce accessions were initially evaluated (August and September
125 2021) for reaction to an isolate of *B. basicola* (EH-2733) in a greenhouse. Of the cultivars
126 evaluated, 22 were classified as belonging to the morphotype ‘Crispy green loose-leaf’, three
127 ‘Crispy purple loose-leaf’, 15 ‘Iceberg’, 14 ‘Butterhead’, nine ‘Cos/Romaine’, three ‘Mimosa’
128 (= ‘Loose-leaf super crispy’), and two varieties of the ‘Batavian’ morphotype. The experiment
129 was carried out in a completely randomized design with 68 lettuce accessions (with and without
130 inoculation) with three replications, each consisting of four seedlings. The cultivars ‘Elisa’
131 (‘Butterhead’ morphotype) and ‘La Brillante’ (‘Batavian’ morphotype) were used as
132 susceptible and resistant controls, respectively.

133

134 **Bioassay #2: Search for sources of broad-spectrum resistance against four isolates of two**
135 **species of *Berkeleyomyces* in a subset of promising accessions identified in bioassay #1** –
136 From the initial screening of bioassay #1 (**Table 1**), the most promising accessions within the
137 resistant reaction category (grades 1-2) were selected and employed in a second bioassay. This
138 subset of accessions was inoculated with two *B. basicola* isolates (EH-2733 and EH-2740) and
139 two *B. rouxiae* isolates (EH-2741 and EH-2743) (Souza 2022). The experiment was carried out
140 in a greenhouse in a completely randomized design with 33 accessions \times four isolates and three

141 replications (with four plants each). Due to lack of seed availability, the cultivars ‘Romaine
 142 Balão’, ‘Penlake’ and ‘Blonde de Paris’, grouped in bioassay #1 as resistant (**Table 1**), were
 143 not reevaluated in Bioassay #2. The cultivars ‘Branca de Paris’ (‘Cos/Romaine’), ‘Vanguard
 144 75’ = ‘PI 536812’ (‘Iceberg’), ‘Aurélia’, and ‘Elisa’ (both from the ‘Butterhead’ morphotype)
 145 were used as susceptible controls. In Bioassay #2, the accession ‘PI 342444’ (‘Butterhead’) was
 146 used as a resistant control (Sala et al. 2008).

147

148 **Disease severity grade assessment in the bioassay #1** – The disease assessment was
 149 performed 21 days after inoculation (DAI), using a visual scale based upon the degree of
 150 symptom severity on the lettuce roots as proposed by O’Brien and Davis (1994) where: **1** =
 151 absence of symptoms, **2** = traces of necrosis in the root system, **3** = up to 50% of the root system
 152 with necrosis, **4** = more than 50% and less than 90% of necrotic root system and **5** = more than
 153 90% of the root system severely affected (**Figure 1**). The average grade reaction of each
 154 material was calculated, expressed by the arithmetic mean of the scores. This characteristic was
 155 used to classify the lettuce germplasm accessions into three arbitrary categories of reaction
 156 namely: resistant plants (average severity scores between 1 and 2), intermediate plants (scores
 157 between 2.01 and 4) and susceptible plants (scores between 4.01 and 5) (Sala et al. 2003).

158

159 **Severity index assessment in the two bioassays** – A disease severity index (DSI) was
 160 calculated from the data of the average grade reaction of each cultivar according to McKinney
 161 (1923), where $DSI = [\Sigma (\text{reaction grade} \times \text{frequency}) / (\text{total number of units} \times \text{maximum scale}$
 162 $\text{grade})] \times 100$. After obtaining the DSI for each germplasm accession, the data were submitted
 163 to analysis of variance. The DSI was transformed into a square root of $x+1$ to normalize its
 164 distribution. Subsequently, the average indices were compared and grouped using the Scott-
 165 Knott test ($P \leq 0.05$) with the aid of the SISVAR statistical program (Ferreira 2011).

166

167

Results

168 **Bioassay #1: Reaction of lettuce accessions to *Berkeleyomyces basicola* isolate EH-2733** –
 169 Among the 68 lettuce accessions evaluated for the severity grade assessment (O’Brien and
 170 Davis 1994), 31 were classified as resistant, 32 intermediate and five susceptible to *B. basicola*
 171 EH-2733 (**Table 1**). All accessions belonging to the morphotypes ‘Mimosa’, ‘Batavian’, and
 172 ‘Crispy purple loose-leaf’ were resistant to *B. basicola* (**Figure 2**). Six out of the nine
 173 ‘Cos/Romaine’ accessions were classified as resistant, two were classified in the intermediate
 174 category and one as susceptible. Thirteen (13) out of the 22 accessions of the ‘Crispy green

175 loose-leaf' morphotype were classified as resistant and nine displayed intermediate
 176 performance. In the group of accessions from the 'Butterhead' morphotype, only three of the
 177 14 accessions were classified as resistant, nine displayed intermediate reaction and two cultivars
 178 were classified as susceptible to *B. basicola* (**Figure 2**). The accession 'PI 342444' (from the
 179 'Butterhead' morphotype) was used as a resistant control and it displayed high levels of
 180 resistance to the pathogen, corroborating data obtained in previous trials (Sala et al. 2008). From
 181 the 'Iceberg' morphotype, only one (out of 15 accessions) was classified as resistant, 12
 182 displayed intermediate responses and two were susceptible (**Figure 2**). In terms of accessions
 183 displaying resistant reaction within each morphotype we identified 13 'Crispy green loose-leaf',
 184 six 'Cos/Romaine', three 'Crispy purple loose-leaf', three 'Mimosa', three 'Butterhead', one
 185 'Iceberg' and two 'Batavian' accessions (**Table 1**). In the intermediate reaction category, we
 186 detected 12 accessions of the 'Iceberg' morphotype, nine of the 'Crispy green loose-leaf', nine
 187 of the 'Butterhead' and two accessions of the 'Cos/Romaine' morphotype. One 'Cos/Romaine',
 188 two 'Iceberg' and two 'Butterhead' accessions were classified as susceptible. Interestingly, no
 189 accessions with susceptible reaction were observed in the morphotypes 'Mimosa', 'Batavian',
 190 'Crispy green loose-leaf', and 'Crispy purple loose-leaf' (**Table 1**).

191

192 **Bioassay #2: Evaluation of 33 most promising accessions identified in bioassay #1 with**
 193 **four isolates of two *Berkeleyomyces* species** – The disease severity index (McKinney 1923)
 194 values displayed significant differences among the 33 lettuce accessions in response to the four
 195 isolates of two *Berkeleyomyces* species. A consistent correlation was observed between the
 196 accessions for their reaction to *B. basicola* and for *B. rouxiae*, displaying an overall uniformity
 197 of response against all four isolates (**Table 2**). However, 'Crispy loose-leaf' (both with green
 198 and purple foliage) and 'Iceberg' accessions displayed some level of heterogenous responses
 199 among them. Nevertheless, most accessions of these morphotypes were resistant to both
 200 pathogens (**Table 2**). Most of 'Butterhead' accessions (viz. 'Aurelia', 'Elisa', and 'Regina de
 201 Verão') behaved as susceptible. The accessions 'Litte Gem' (= 'PI 617959'), 'Maravilha 4
 202 Estações', 'Salvius', 'Argeles', and 'La Brillante' displayed phenotypically stable levels of
 203 resistance against all four isolates of the two *Berkeleyomyces* species (**Table 2**).

204

205 **Levels of aggressiveness and virulence profile of the *Berkeleyomyces basicola* and**
 206 ***Berkeleyomyces rouxiae* isolates in lettuce accessions** – All isolates were pathogenic,
 207 inducing susceptible reaction in a large array of accessions (**Table 2**). There was no significant
 208 difference ($P \leq 0.05$) in aggressiveness among the different isolates. The four isolates showed

209 similar levels in the percentage of root tissue colonized in most of the analyzed accessions.

210

211 **Identification of accessions with heterogeneous responses to the *Berkeleyomyces basicola***
 212 **and *Berkeleyomyces rouxiae* isolates** – A subgroup of accessions including ‘Hanson’, ‘BRS
 213 Lélia’ and ‘Crespa Verão’ (‘Crispy green loose-leaf’), ‘PI 342444’ (‘Butterhead’) and ‘Prado
 214 Mimosa’ (‘Mimosa’ morphotype) displayed a peculiar type of species-specific resistance to *B.*
 215 *basicola*. Nevertheless, the same cultivars were susceptible to *B. rouxiae* isolates (**Table 2**).
 216 The accessions ‘Salinas 88’, ‘PI 342444’ and ‘BRS Mediterrânea’ showed a resistance reaction
 217 against isolates of *B. basicola*, but displayed heterogeneous responses against both isolates of
 218 *B. rouxiae* (**Table 2**). The accession ‘Vitoria de Santo Antão’ exhibited an interesting pattern
 219 of heterogeneous response, showing superior levels of resistance to three isolates (two *B.*
 220 *basicola* and one *B. rouxiae*), but displayed a susceptible reaction to the *B. rouxiae* EH-2733
 221 isolate.

222

Discussion

223 In the present investigation, significant differences for the reaction to *B. basicola* and
 224 *B. rouxiae* isolates were observed between accessions of different morphotypes belonging to a
 225 genetically diverse collection of *L. sativa* germplasm. In the first trial, 68 accessions were
 226 evaluated for the reaction to a *B. basicola* isolate. At least one accession with superior levels of
 227 resistance was detected within each morphotype germplasm, including 13 ‘Crispy green loose-
 228 leaf’ accessions, three ‘Crispy purple loose-leaf’, six ‘Cos/Romaine’, three ‘Mimosa’, three
 229 ‘Butterhead’, one ‘Iceberg’ and two ‘Batavian’ accessions.

230 Previous screening work indicated a heterogeneous response to *B. basicola* isolates
 231 among the different lettuce morphotypes. Cultivars of the ‘Butterhead’ segment often show
 232 high levels of susceptibility to *B. basicola*. Conversely, most cultivars of the ‘Crispy green
 233 loose-leaf’, ‘Crispy purple loose-leaf’, and ‘Batavian’ morphotypes displayed resistant
 234 reaction, whereas the ‘Iceberg’ accessions showed heterogenous reaction to *B. basicola* isolates
 235 (Teixeira-Yañez, 2005; Sala et al. 2008). Similarly, the negative performance in our assays was
 236 also observed in the ‘Butterhead’ and ‘Iceberg’ accessions, although few exceptions were
 237 detected. The cultivars ‘Elisa’ and ‘Aurelia’ (morphotype ‘Butterhead’) were highly susceptible
 238 to the *B. basicola* isolate EH-2733. Similar variation among morphotypes was also observed
 239 for the fungus *B. basicola* under field and greenhouse conditions in California (Koike 2008),
 240 with the highest levels of susceptibility observed in ‘Iceberg’ cultivars. Under greenhouse, the
 241 cultivar ‘Winchester’ (‘Cos/Romaine’) showed a stable resistance response against eight North
 242 American *B. basicola* isolates (Koike 2008). In our bioassay #1, six ‘Cos/Romaine’ accessions

243 also showed resistance responses to the *B. basicola* isolate.

244 In the evaluations carried out under greenhouse conditions, it was also possible to
245 discriminate differences in the levels of disease severity against four isolates of the two
246 *Berkeleyomyces* species among a subset of accessions selected in the bioassay #1. A strong
247 correlation was observed between the categorization of reactions to *B. basicola* and *B. rouxiae*,
248 but some exceptions were detected. The accessions ‘Little Gem’ (‘Cos/Romaine’), ‘Maravilha
249 4 Estações’ (‘Butterhead’), ‘Salvius’ (‘Cos/Romaine’), ‘Argeles’ (‘Crispy green loose-leaf’)
250 and ‘La Brillante’ (‘Batavian’) displayed a phenotypically stable resistance reaction against all
251 four isolates of the two *Berkeleyomyces* species. In turn, the ‘Regina de Verão’, ‘Elisa’, and
252 ‘Aurélia’ (morphotype ‘Butterhead’) were susceptible to all isolates. The identification of
253 accessions with contrasting reactions for the two *Berkeleyomyces* species will allow the
254 employment of them as parental lines in additional inheritance as well as in genetic mapping
255 studies of the resistance factor(s) for both pathogens in segregating populations.

256 Again, a low frequency of susceptible accessions for the *B. basicola* and for *B. rouxiae*
257 isolates was observed in the morphotypes ‘Mimosa’, ‘Batavian’, ‘Crispy green loose-leaf’, and
258 ‘Crispy purple loose-leaf’. This observation is of extreme interest from the breeding standpoint.
259 ‘Crispy green loose-leaf’ is the most economically important morphotype under Brazilian
260 conditions (Sala and Costa, 2012; Pessoa and Machado Júnior 2021). The morphotypes
261 ‘Cos/Romaine’, ‘Batavian’, and ‘Mimosa’ are increasing their market share in the country over
262 the last few decades. However, the most impressive cultivation and consumption increase in
263 recent years was observed in the ‘Iceberg’ morphotype (Sala and Costa 2012; Resende et al.
264 2017). In fact, the ‘Iceberg’ is the most challenging morphotype in terms of genetic
265 improvement for resistance to *Berkeleyomyces* species, since it displayed a low frequency of
266 accessions with adequate levels of resistance. The cultivar ‘Salinas 88’ (‘Iceberg’) showed
267 specific resistance against *B. basicola* isolates, confirming previous data of Sala et al. (2008).
268 However, this accession did not show adequate levels of resistance to *B. rouxiae* isolates.

269 The association between morphological lettuce traits and reaction to *Berkeleyomyces*
270 species has been observed in all the screening assays carried out thus far (present work,
271 Teixeira-Yañez, 2005; Sala et al. 2008). In fact, several genes controlling morphological
272 diversity, degree of foliar overlapping, and leaf coloration have been characterized in lettuce
273 germplasm (Ryder 1999). Inheritance studies conducted by Sala et al. (2003) proposed a
274 dominant monogenic model (called *Tb* gene/locus) controlling resistance to *B. basicola* (= *T.*
275 *basicola*). The high frequency of the resistance phenotype in the cultivars of the ‘Crisp loose
276 leaf’ and ‘Batavian’ morphotypes could be explained by a putative linkage between

277 genes/alleles controlling major morphological traits and the *Tb* locus. In the present work,
278 cultivars of morphotypes ‘Cos/Romaine’ and ‘Batavian’ and the vast majority of accessions of
279 ‘Crispy loose-leaf’ were resistant to both *Berkeleyomyces* species, indicating that the *Tb* locus
280 might also control resistance to the species *B. rouxiae*. Another possibility is the presence of
281 two distinct genes (one controlling resistance for *B. rouxiae* and other for *B. basicola*) in close
282 linkage within a single cluster of resistance genes that have been reported in lettuce genome
283 (Michelmore and Meyers 1998; Truco et al. al. 2007; McHale et al. 2009; Christopoulou et al.
284 2015). In fact, differential resistance patterns between different morphotypes have been
285 observed in other pathosystems involving lettuce. The cultivars of the morphotypes
286 ‘Cos/Romaine’ and ‘Mimosa’ behave as the most resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp.
287 *lactucae*, while the majority of the cultivars from the ‘Iceberg’ morphotype displayed high
288 levels of susceptibility (Garibaldi et al. 2004; Cabral et al. 2019).

289 Regarding the variability of the two *Berkeleyomyces* species, the four isolates induced
290 similar amount of necrotic root tissue in most of the evaluated accessions, demonstrating the
291 absence of a clear host specificity pattern of the two fungal species in relation to lettuce.
292 However, a slight variability in the aggressiveness of the isolates was observed within
293 subgroups of accessions. The accessions ‘Hanson’, ‘Lélia’, ‘Crespa Verão’, ‘PI 342444’, and
294 ‘Prado Mimosa’ displayed resistance to *B. basicola* isolates EH-2733 and EH-2740, but they
295 were susceptible to *B. rouxiae* EH-2741 and EH-2743 isolates. These differences in the reaction
296 to a range of isolates can be attributed to different quantitative resistance factors of each
297 cultivar. It is important to highlight that these four *Berkeleyomyces* isolates were collected in
298 four different geographic regions of Brazil, which may represent a more representative
299 sampling of the potential genetic variants for pathogenic components of these fungi in lettuce,
300 which may have influenced the different levels of colonization capacity in a given subgroup of
301 lettuce accessions. Differential pathogenicity patterns among isolates from both
302 *Berkeleyomyces* species have been recently reported (Nakane et al. 2019; Souza 2022),
303 suggesting the presence of putative fungal pathotypes.

304 One of the few sustainable and durable methods for controlling pathogens is
305 pyramiding multiple disease resistance genes into a single cultivar (Mundt 2018). Effective
306 resistance factors against other lettuce pathogens are also present in the five accessions (viz.
307 ‘Litte Gem’, ‘Maravilha 4 Estações’, ‘Salvius’, ‘Argeles’, and ‘La Brillante’) that exhibited the
308 highest levels of multiple resistance against isolates of the two *Berkeleyomyces* species. The
309 cultivar ‘Little Gem’ (‘Cos/Romaine’) was reported to be a source of resistance to *Xanthomonas*
310 *campestris* pv. *vitians* (Bull et al. 2007), while the cultivar ‘Argeles’ was identified as the best

311 source of resistance against all Brazilian isolates of *Bremia lactucae* (Franco et al. 2021). The
312 cultivar ‘La Brillante’ is another germplasm of extreme interest from the breeding standpoint,
313 showing high levels of resistance against all isolated from both of *Berkeleyomyces* species as
314 well as a resistance reaction to *Bremia lactucae*, *Verticillium dahliae*, tomato spotted wilt virus,
315 impatiens necrotic spot virus, and *X. campestris* pv. *vitians* (Sala et al. 2008; Hayes et al. 2011;
316 Hayes et al. 2014; Simko et al. 2015; Simko et al. 2018; Fontes et al. 2019). In turn, the cultivar
317 ‘Salvius’ (‘Cos/Romaine’) displayed high levels of tolerance for heat-associated physiological
318 disorders, including tip burn and premature bolting (Holmes et al. 2019). Thus, the use of this
319 subgroup of accessions as potential sources of genes of interest would be a judicious strategy
320 for breeding programs aiming at the development of new multi-resistant cultivars and/or
321 adapted to warm climates.

322 Dynamic plant cells-fungal interactions have been investigated in different
323 pathosystems involving *Berkeleyomyces* species and dicotyledonous hosts (Mauk and Hine
324 1988; Hood and Shew 1997; Mims et al. 2000). A subset of resistant accessions reacted to
325 *Berkeleyomyces* isolates by exhibiting papillae and callose formation in sites of fungal invasion
326 in epidermal cells (Hood and Shew 1997; Mims et al. 2000). This phenotypic response suggests
327 the potential involvement NBS-LRR-like resistance genes to *Berkeleyomyces* (Wang et al.
328 2021). However, in the lettuce \times *Berkeleyomyces* pathosystem, the genetic factors as well as the
329 biochemical and cytological mechanisms have not yet been fully characterized. In the lettuce
330 genome, numerous genes potentially involved in resistance responses have already been
331 characterized, including factors that encode NBS-LLR-like proteins (Truco et al. 2007; McHale
332 et al. 2009; Christopoulou et al. 2015). The identification of sources with high levels of
333 resistance for both *B. basicola* and *B. rouxiae* in accessions of different morphotypes opens the
334 breeding opportunity to incorporate these genetic factors in a wide range of commercial lettuce
335 cultivars from distinct morphotypes. Therefore, genetic studies aimed at characterizing the
336 multiple resistance factors identified in the accessions reported here is a crucial future research
337 action aimed at developing lettuce cultivars with stable and durable resistance against
338 *Berkeleyomyces* species.

339

340 **Acknowledgments**

341 The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
342 (CAPES) for granting a scholarship to David N. Perdomo. The authors also thank CNPq for the
343 research productivity grants of A. Reis, M. E. N. Fonseca, and L.S. Boiteux. Thanks also to the
344 Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, for the financial and

345 structural support to develop this research and for the supply of seeds and inputs for conducting
346 the trials.

347

348 **Authors' Contribution**

349 All authors contributed to the study design. LSB, AR, and DNP developed the idea and
350 organized the manuscript into equal parts. DNP, TBT, RLS, MENF CSC performed the
351 experiments and characterized the *Berkeleyomyces* isolates. All authors read, commented, and
352 approved the final version of the manuscript.

353

354 **Declarations**

355 **Conflicts of interest:** The authors declare that there is no conflict of interest.

356 **Consent for publication:** All authors give their consent for the manuscript to be published in
357 the Journal of Plant Diseases and Protection.

358

359

References

- 360 Borges RCF, Santos MDM, Macedo MA, Martins I, Nascimento AG, Boiteux LS, Mello SCM
361 (2014) First report of a wilt disease of *Tectona grandis* caused by *Thielaviopsis basicola* in
362 Brazil. New Dis Rep 30: 17. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.030.017>
- 363 Bull CT, Goldman PH, Hayes R, Madden LV, Koike ST, Ryder E (2007) Genetic diversity of
364 lettuce for resistance to bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.
365 Plant Health Prog 8: 11. <https://doi.org/10.1094/PHP-2007-0917-02-RS>
- 366 Cabral CS, Fonseca, MEN, Oliveira VR, Boiteux LS, Reis A (2019) A single dominant
367 gene/locus model for control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 resistance in
368 lettuce (*Lactuca sativa*). Euphytica 215: 114. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2441-2>
- 369 Christopoulou M, McHale LK, Kozik A, Reyes-Chin Wo S, Wroblewski T, Michelmore RW
370 (2015) Dissection of two complex clusters of resistance genes in lettuce (*Lactuca sativa*).
371 Mol Plant-Microbe Interact 28: 751–765. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0175-R>
- 372 Coumans JVF, Harvey J, Backhouse D, Poljak A, Raftery MJ, Nehl D, Pereg L (2011)
373 Proteomic assessment of host-associated microevolution in the fungus *Thielaviopsis*
374 *basicola*. Environ Microbiol 13: 576–588. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02358.x>
- 375

- 376 De Beer ZW, Duong, TA, Barnes I, Wingfield BD, Wingfield MJ (2014) Redefining
377 *Ceratocystis* and allied genera. *Stud Mycol* 79: 187–219.
378 <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.001>
- 379 Dhingra OD, Sinclair JB (1995) *Basic Plant Pathol Methods.*, 2nd Ed. (Lewis Publishers: Boca
380 Raton, FL).
- 381 Farr DF, Rossman AY (2022) Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS,
382 USDA. Retrieved January 18, Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.
383 Accessed 18 June 2022.
- 384 Ferreira DF (2011) SISVAR: A computer statistical analysis system. *Ciência Agrotec* 35: 1039–
385 1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- 386 Fontes MG, Cabral CS, Lima MF, Fonseca MEN, Boiteux LS (2019) Phenotypic expression
387 and species-specific reaction of *Lactuca sativa* ‘PI 342444’ to groundnut ringspot virus
388 (GRSV) and tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates. *Eur J Plant Pathol* 155: 231–238.
389 <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01766-3>
- 390 Franco CA, Marin, MV, Silva, EHC, Soares, RS, Candido, WS, Souza, LN, Caprio CH, Vidal
391 RL, Panizzi RC, Braz LT (2021) Monitoring virulence of *Bremia lactucae* as a breeding
392 tool against lettuce downy mildew from south and southwest Brazilian regions. *Eur J Plant*
393 *Pathol* 159: 179-189. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02154-y>
- 394 Garibaldi A, Gilardi G, Gullino ML (2004) Varietal resistance of lettuce to *Fusarium*
395 *oxysporum* f. sp. *lactucae*. *J Crop Prot* 23: 845–851.
396 <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.01.005>
- 397 Hayes RJ, McHale LK, Vallad GE, Truco MJ, Michelmore RW, Klosterman SJ, Subbarao KV
398 (2011) The inheritance of resistance to *Verticillium* wilt caused by race 1 isolates of
399 *Verticillium dahliae* in the lettuce cultivar La Brillante. *Theor Appl Genet* 123: 509–517.
400 <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1603-y>
- 401 Hayes RJ, Trent MA, Truco MJ, Antonise R, Michelmore RW, Bull CT (2014) The inheritance
402 of resistance to bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*
403 in three lettuce cultivars. *Hortic Res* 1: 14066 <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.66>
- 404 Holmes SC, Wells DE, Pickens JM, Kemble JM (2019) Selection of heat tolerant lettuce
405 (*Lactuca sativa* L.) cultivars grown in deep water culture and their marketability.
406 *Horticulturae* 5: 50. <http://dx.doi.org/10.3390/horticulturae5030050>
- 407 Hood ME, Shew HD (1997) Initial cellular interactions between *Thielaviopsis basicola* and
408 tobacco root hairs. *J Phytopathol* 87: 228–235.
409 <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.3.228>

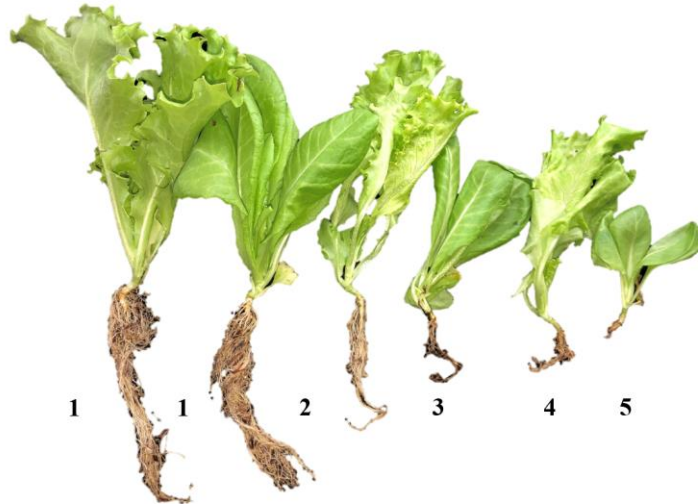
- 410 Huang J, Kang Z (2010) Detection of *Thielaviopsis basicola* in soil with real-time quantitative
411 PCR assays. *Microbiol Res* 165: 411–417. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2009.09.001>
- 412 Koike ST (2008) Black root rot caused by *Thielaviopsis basicola* on lettuce in California. *Plant*
413 *Dis* 92: 1368. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-9-1368A>
- 414 Lopes CA, Quezado-Duval MA, Reis A (2010) Doenças da alface. Brasília-DF: Embrapa
415 Hortaliças, 68p.
- 416 Mauk P, Hine R (1988) Infection, colonization of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*, and
417 development of black root rot caused by *Thielaviopsis basicola*. *J Phytopathol*, 78: 1662–
418 1667. <https://doi.org/10.1094/Phyto-78-1662>
- 419 McHale LK, Truco MJ, Kozik A, Wroblewski T, Ochoa OE, Lahre KA, Michelmore RW
420 (2009) The genomic architecture of disease resistance in lettuce. *Theor Appl Genet* 118:
421 565–580. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0921-1>
- 422 McKinney RH (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat
423 seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J Agric Res* 6:195–218.
- 424 Michelmore RW, Meyers BC (1998) Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent
425 selection and a birth-and-death process. *Genome Res* 8: 1113–1130.
426 <https://doi.org/10.1101/gr.8.11.1113>
- 427 Mims CW, Copes WE, Richardson EA (2000) Ultrastructure of the penetration and infection
428 of pansy roots by *Thielaviopsis basicola*. *J Phytopathol*, 90: 843–850.
429 <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.843>
- 430 Mundt CC (2018) Pyramiding for resistance durability: theory and practice. *Phytopathology*,
431 108, 7, 792-802. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0426-RVW>
- 432 Nakane R, Miki S, Ikeda K, Sakai H, Hayashi K, Usami T (2019) First report of black root rot
433 of lettuce in Japan caused by *Berkeleyomyces rouxiae*. *J Gen Plant Pathol* 85: 436–439.
434 <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00860-y>
- 435 Nehl DB, Allen SJ, Mondal AH, Lonergan PA (2004) Black root rot: A pandemic in Australian
436 cotton. *Australas Plant Pathol* 33: 87–95. <https://doi.org/0815-3191/04/010087>
- 437 Nel WJ, Duong TA, Wingfield BD, Wingfield MJ, De Beer ZW (2018) A new genus and
438 species for the globally important, multihost root pathogen *Thielaviopsis basicola*. *Plant*
439 *Pathol* 67: 871–882. <https://doi.org/10.1111/ppa.12803>
- 440 O'Brien RG, Davis RD (1994) Lettuce black root rot-a disease caused by *Chalara elegans*.
441 *Australas Plant Pathol* 23: 106–111.
- 442 Pereg LL (2013) Black root rot of cotton in Australia: The host, the pathogen and disease
443 management. *Crop Pasture Sci* 64: 1112–1126. <https://doi.org/10.1071/CP13231>

- 444 Pessoa HP, Machado Junior R (2021) Folhosas: Em destaque no cenário nacional. Revista
445 Campo & Negócios. [https://revistacampoenegocios.com.br/folhosas-em-destaque-no-](https://revistacampoenegocios.com.br/folhosas-em-destaque-no-cenario-nacional/)
446 [cenario-nacional/](https://revistacampoenegocios.com.br/folhosas-em-destaque-no-cenario-nacional/). Accessed 18 May 2022.
- 447 Prinsloo GC, Baard SW, Ferreira JF (1993) Resistance of chicory and endive to black root rot
448 and the effect of their exudates on the *Thielaviopsis basicola*. *Phytophylactica* 25: 107–
449 114.
- 450 Resende GM, Costa, ND, Yuri JE, Mota JH (2017) Adaptação de genótipos de alface crespa
451 em condições semiáridas. *Rev Bras Agric Irrig* 11: 1145–1154.
452 <https://doi.org/10.7127/rbai.v11n100553>
- 453 Ryder EJ (1999) Lettuce, endive and chicory. CAB International. New York, USA, 208p.
- 454 Sala FC, Costa C, Teixeira-Yañez LDD, Blat SF (2003) Reação de alface a muchadeira
455 (*Thielaviopsis basicola*). *Hortic. Bras* 21: 336.
456 [http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/olfs4053%20](http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/olfs4053%20c.pdf)
457 [c.pdf](http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/olfs4053%20c.pdf)
- 458 Sala FC, Costa CP, Teixeira LDD, Fabri EG, Blat, SF (2008) Lettuce reaction to black root rot
459 caused by *Thielaviopsis basicola*. *Hort Bras* 26: 398–400. [https://doi.org/10.1590/S0102-](https://doi.org/10.1590/S0102-05362008000300021)
460 [05362008000300021](https://doi.org/10.1590/S0102-05362008000300021)
- 461 Sala FC, Costa, CPD (2012) Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. *Hort Bras* 30:
462 187–194. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362012000200002>
- 463 Shukla PK, Fatima T, Kumari N (2021) First report of *Berkeleyomyces basicola* causing mango
464 root rot and decline in India. *Plant Dis* 105: 1214. [https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-](https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2133-PDN)
465 [2133-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2133-PDN)
- 466 Silva AMS, Akiba F, Carvalho AO, Ribeiro RLD, Araújo JSP (1999) Podridão negra de raízes
467 de quiabeiro e alface incitada por *Thielaviopsis* spp. In: 32º Congresso Brasileiro
468 Fitopatologia, Book of Abstracts. Brasília: SBF. (CD-ROM).
- 469 Simko I, Ochoa OE, Pel MA, Tsuchida C, Fonti Forcada C, Hayes RJ, Michelmore RW (2015)
470 Resistance to downy mildew in lettuce ‘La Brillante’ is conferred by *Dm50* gene and
471 multiple QTL. *Phytopathology* 105: 1220–1228. [https://doi.org/10.1094/PHTO-02-15-](https://doi.org/10.1094/PHTO-02-15-0057-R)
472 [0057-R](https://doi.org/10.1094/PHTO-02-15-0057-R)
- 473 Simko I, Richardson CE, Wintermantel WM (2018) Variation within *Lactuca* spp. for
474 resistance to *Impatiens necrotic spot virus*. *Plant Dis* 102: 341–348.
475 <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0790-RE>
- 476 Sousa RL (2022) Identificação molecular e patogenicidade de espécies de *Berkeleyomyces*
477 associadas a hortaliças no Brasil com ênfase na cultura da alface (Master Degree Thesis –

- 478 Plant Pathology) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil. 62 pages.
- 479 Teixeira-Yañez LDD (2005) Resistência genética, fungicidas e solarização para o controle de
480 *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris na cultura de alface (*Lactuca sativa* L.).
481 (Doctor Degree Thesis – Agronomy) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
482 Piracicaba-SP, Brazil. 103 pages.
- 483 Truco MJ, Antonise, R, Lavelle D, Ochoa O, Kozik A, Witsenboer H, Peleman J (2007) A high-
484 density, integrated genetic linkage map of lettuce (*Lactuca* spp.). Theor Appl Genet 115:
485 735–746. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0599-9>
- 486 Wang Y, Li X, Fan B, Zhu C & Chen Z (2021) Regulation and function of defense-related
487 callose deposition in plants. International Journal of Molecular Sciences 22: 2393.
488 <https://doi.org/10.3390/ijms22052393>
- 489

490

491

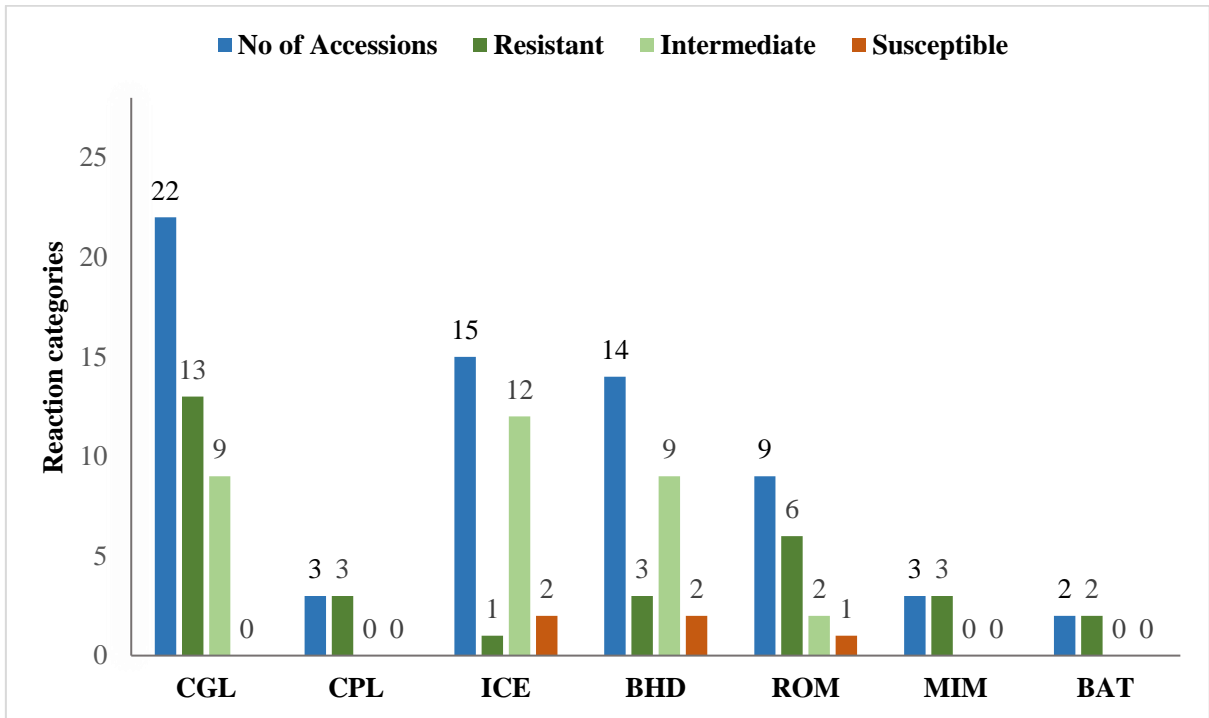


492

493

494 **Fig. 1** Rating/grading scale adapted from O'Brien and Davis (1994) for quantifying the severity
495 of the symptoms induced by *Berkeleyomyces* species in lettuce (*Lactuca sativa*) roots **1** =
496 absence of symptoms, **2** = traces of necrosis in the root system, **3** = up to 50% of the root system
497 with necrosis, **4** = more than 50% and less than 90% of necrotic root system and **5** = more than
498 90% of the root system severely affected.

499 **Fig. 2** Frequency of each reaction of 68 lettuce morphotypes (*Lactuca sativa*) accessions from
 500 distinct morphotypes to the *Berkeleyomyces basicola* isolate EH-2733 according to O'Brien
 501 and Davis (1994). Brasilia-DF, Brazil. 2021.
 502



503

504 *Lettuce morphotypes: Crispy Green Loose-Leaf (CGL), Crispy Purple Loose-Leaf (CPL), Iceberg (ICE),
 505 Butterhead (BHD), Cos/Romaine (ROM), Mimosa (MIM), and Batavian (BAT).

506

507 **Table 1.** Screening 68 lettuce (*Lactuca sativa*) accessions to the *Berkeleyomyces basicola*
 508 isolate EH-2733 under greenhouse conditions. Brasilia-DF, Brazil. 2021.
 509

Accession	Morphotype*	Disease class		Severity (%) ³	Accession	Morphotype*	Disease class		Severity (%) ³
		Note ¹	Reaction ²				Note ¹	Reaction ²	
BRS Mediterrânea	CGL	1.42	R	28.33 a ⁴	Babá de Verão	BHD	2.17	I	43.33 a
La brilhante	BAT	1.42	R	28.33 a	UCO 7105	CGL	2.17	I	43.33 a
Flashy Trouts Back	ROM	1.50	R	30.00 a	Ninja	CGL	2.25	I	45.00 a
Litte Gem PI617959	ROM	1.50	R	30.00 a	Versaï	BHD	2.25	I	45.00 a
BRS Lelia	CGL	1.56	R	31.66 a	CGDM 16	ICE	2.33	I	46.67 a
Romana Balão	ROM	1.58	R	31.66 a	Hilde	BHD	2.33	I	46.67 a
Crespa Itapuã Super	CGL	1.60	R	31.66 a	Pavane PI667705	ICE	2.42	I	48.33 a
Argeles	CGL	1.75	R	35.00 a	Tiffany	ICE	2.42	I	48.33 a
Maravilha 4 Estações	BHD	1.75	R	35.00 a	Sem Rival	BHD	2.58	I	51.67 b
Salinas 88	ICE	1.75	R	35.00 a	Grand Rapids TBR	CGL	2.60	I	51.67 b
Salvius	ROM	1.75	R	35.00 a	Iceberg	ICE	2.67	I	53.33 b
Vitoria de Santo Antônio	BHD	1.75	R	35.00 a	Belford	ICE	2.67	I	53.33 b
Prado Mimosa	MIM	1.82	R	36.66 a	Capitan	BHD	2.75	I	55.00 b
Balesta	CGL	1.83	R	36.66 a	Green Towers PI601336	ROM	2.75	I	55.00 b
Betania	CPL	1.83	R	36.66 a	Vanda	CGL	2.83	I	56.67 b
NUM DM 17	CGL	1.83	R	36.66 a	Gallega de Invierno	BHD	2.90	I	58.33 b
Veneranda	CGL	1.83	R	36.66 a	Crocantela	CGL	3.00	I	60.00 b
Crespa Repolhuda	CGL	1.92	R	38.33 a	Patriot	ROM	3.00	I	60.00 b
Crespa Verão	CGL	1.92	R	38.33 a	Samira	CGL	3.00	I	60.00 b
Hanson	CGL	1.92	R	38.33 a	Grand Rapids	CGL	3.08	I	61.66 b
BRS Leila	CGL	1.92	R	38.33 a	Great Lakes 659	ICE	3.08	I	61.66 b
Penlake PI536753	ROM	1.92	R	38.33 a	Vanguard 75 PI536852	ICE	3.08	I	61.66 b
Simpson	CGL	1.92	R	38.33 a	Sabine	ICE	3.10	I	61.66 b
Valmaine PI543959	ROM	1.92	R	38.33 a	Ithaca PI536844	ICE	3.17	I	63.33 b
Blonde de Paris	BAT	2.00	R	40.00 a	UCO 2206	CGL	3.17	I	63.33 b
Crespa Verde	CGL	2.00	R	40.00 a	R4T57D	CGL	3.25	I	65.00 b
Joker	CPL	2.00	R	40.00 a	RYZ 2164	ICE	3.25	I	65.00 b
Salad Bowl	MIM	2.00	R	40.00 a	Cohban Green PI612637	ICE	3.40	I	68.33 b
Regina de Verão	BHD	2.00	R	40.00 a	Hilde II	BHD	3.42	I	68.33 b
Rubi Crespa	CPL	2.00	R	40.00 a	Aurélia	BHD	4.08	S	81.67 c
UCO 7107	MIM	2.00	R	40.00 a	Dandie	ICE	4.08	S	81.67 c
Bourguignonne	BHD	2.08	I	41.66 a	Vanguard PI536812	ICE	4.08	S	81.67 c
Fenke	BHD	2.08	I	41.66 a	Branca de Paris	ROM	4.17	S	83.33 c
Lednicky PI674756	ICE	2.08	I	41.66 a	Elisa	BHD	4.25	S	85.00 c

CV: 19.75

510

511

¹Mean disease reaction according to a rating scale ranging from 0 to 5.

512

²Disease reaction categories: Resistant (R), Intermediate (I), Susceptible (S) according to Sala et al. (2003).

513

³Disease severity, calculated by the McKinney index (1923), using the frequencies of disease classes considering a scale of grades from 1 to 5.

514

515

⁴Means followed by the same letter in the column do not differ significantly from each other by the Scott-Knott test ($P < 0.05$). **To obtain the letters and CV, the disease index was transformed by the square root of X+1.

516

517

*Lettuce morphotypes: Crispy Green Loose-Leaf (CGL), Crispy Purple Loose-Leaf (CPL), Iceberg (ICE), Butterhead (BHD), Cos/Romaine (ROM) Mimosa (MIM) and Batavian (BAT).

518

519 **Table 2.** Screening under greenhouse conditions of 33 lettuce (*Lactuca sativa*) accessions
 520 against two isolates of *Berkeleyomyces basicola* (EH-2733 and EH-2740) and two *B. rouxiae*
 521 isolates (EH-2741 and EH-2743). Brasilia-DF, Brazil. 2021.
 522

Accession	Morphotype*	Severity Index/Isolate ¹				Mean
		EH-2733	EH-2740	EH-2741	EH-2743	
Litte Gem (PI 617959)	ROM	30.00 Aa	20.00 Aa	30.00 Aa	30.00 Aa ²	27.50
Maravilha 4 Estações	BHD	23.33 Aa	26.67 Aa	30.00 Aa	30.00 Aa	27.50
Salvius	ROM	33.33 Aa	26.67 Aa	23.33 Aa	26.67 Aa	27.50
Argeles	CGL	33.33 Aa	30.00 Aa	30.00 Aa	23.33 Aa	29.17
La Brillante	BAT	30.00 Aa	26.67 Aa	30.00 Aa	30.00 Aa	29.17
Balesta	CGL	20.00 Aa	26.67 Aa	30.00 Aa	43.33 Ab	30.00
Betânia	CPL	30.00 Aa	30.00 Aa	23.33 Aa	40.00 Ab	30.83
Branca de Paris	ROM	30.00 Aa	30.00 Aa	23.33 Aa	40.00 Ab	30.83
Joker	CPL	30.00 Aa	30.00 Aa	30.00 Aa	40.00 Ab	32.50
NUM DM 17	CGL	33.33 Aa	30.00 Aa	46.67 Ab	23.33 Aa	33.33
Vitoria de Santo Antônio	BHD	33.33 Aa	23.33 Aa	23.33 Aa	60.00 Ab	35.00
Crespa Repolhuda	CGL	33.33 Aa	26.67 Aa	23.33 Aa	66.67 Bc	37.50
Valmaine (PI 543959)	ROM	36.67 Aa	26.67 Aa	36.67 Ab	46.67 Ab	36.66
Flashy Trouts Back	ROM	36.67 Aa	46.67 Aa	26.67 Aa	43.33 Ab	38.33
Veneranda	CGL	40.00 Aa	30.00 Aa	46.67 Ab	33.33 Aa	37.50
Hanson	CGL	30.00 Aa	23.33 Aa	63.33 Bc	50.00 Bb	41.66
Rubi Crespa	CPL	53.33 Ab	43.33 Aa	33.33 Aa	33.33 Aa	40.83
BRS Mediterrânea	CGL	36.67 Aa	33.33 Aa	30.00 Aa	70.00 Bc	42.50
Salinas 88	ICE	30.00 Aa	33.33 Aa	66.67 Bc	40.00 Ab	42.50
Crespa Itapuã Super	CGL	56.67 Ab	40.00 Aa	43.33 Ab	46.67 Ab	46.67
PI342444	BHD	40.00 Aa	30.00 Aa	70.00 Bc	50.00 Bb	47.50
Vanguard 75 (PI 536812)	ICE	70.00 Bc	43.33 Aa	60.00 Bc	26.67 Aa	50.00
Prado Mimosa	MIM	40.00 Aa	33.33 Aa	60.00 Bc	70.00 Bc	50.83
Salad Bowl	MIM	33.33 Aa	40.00 Aa	46.67 Ab	83.33 Bd	50.83
Crespa Verde	CGL	43.33 Aa	66.67 Bb	66.67 Bc	43.33 Ab	55.00
Simpson	CGL	40.00 Aa	50.00 Aa	53.33 Ac	100.00 Bd	60.83
BRS Lélia	CGL	43.33 Ba	23.33 Aa	93.33 Cd	90.00 Cd	62.50
Crespa Verão	CGL	40.00 Aa	33.33 Aa	80.00 Bd	100.00 Bd	63.33
UCO 7107	MIM	53.33 Bb	33.33 Aa	66.67 Bc	96.67 Cd	62.50
BRS Leila	CGL	63.33 Bb	70.00 Bb	83.33 Bd	46.67 Ab	65.83
Aurélia	BHD	76.66 Ac	56.67 Ab	70.00 Ac	83.33 Ad	71.67
Elisa	BHD	76.66 Ac	100.00 Ac	90.00 Ad	93.33 Ad	90.00
Regina de Verão	BHD	90.00 Ac	100.00 Ac	96.67 Ad	83.33 Ad	92.50
Mean	-----	42.12	38.89	49.29	54.04	
CV:	-----			20.25		

523 ¹Disease severity, calculated by the McKinney index (1923), using the frequencies of disease classes considering a scale of grades from 0 to
 524 5.

525 ²**Means followed by different letters, uppercase in the line and lowercase in the column, differ from each other, using the Scott-Knott test at
 526 5% probability. **To obtain the letters and CV, the disease index was transformed by the square root of X+1.

527 *Lettuce morphotypes: Crispy Green Loose-Leaf (CGL), Crispy Purple Loose-Leaf (CPL), Iceberg (ICE), Butterhead (BHD), Cos/Romaine
 528 (ROM) Mimosa (MIM) and Batavian (BAT).

CAPÍTULO IV

A monogenic dominant resistance to *Berkeleyomyces rouxiae* and *Berkeleyomyces basicola* in lettuce (*Lactuca sativa*) ‘La Brillante’.

Submission: **Euphytica**
Impact factor = 2.185 (2021)

A monogenic dominant resistance to *Berkeleyomyces rouxiae* and *Berkeleyomyces basicola* in lettuce (*Lactuca sativa*) ‘La Brillante’.

David N. Perdomo¹ • Stéfani S. Leite¹ • Tiago B. Torres¹ • Cleberly E. Santos² • Maria E. N. Fonseca⁴ • Cleia S. Cabral³ • Ailton Reis^{1,4} • Leonardo S. Boiteux^{1,2,4}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife–PE, Brazil; ²UnB – Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília–DF, Brazil; ³UPIS, Brasília–DF, Brazil; ⁴Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças, Embrapa Hortaliças, (CNPq), Brasília–DF, Brazil.

Correspondence: Leonardo Silva Boiteux, leonardo.boiteux@embrapa.br.

ORCID: [0000-0002-5791-8002](https://orcid.org/0000-0002-5791-8002)

Abstract Black root rot, caused by two *Berkeleyomyces* species, is a major disease of lettuce worldwide. The most promising management strategy of these polyphagous and aggressive pathogens is the deployment of genetic resistance. The cultivar ‘La Brillante’ displayed resistant reaction against a broad range of isolates of both *Berkeleyomyces* species (*B. basicola* and *B. rouxiae*). Inheritance studies investigating the resistance of ‘La Brillante’ to both pathogens were conducted separately employing F₂ populations derived from crosses with the highly susceptible cultivar ‘Elisa’. The hybrid origin of individual F₁ plants was assessed via RAPD marker genotyping. Two *bona-fide* F₁ plants were then self-fertilized to obtain two independent F₂ segregating populations. Altogether, 413 F₂ seedlings were separately inoculated with *B. rouxiae* (247 seedlings) and *B. basicola* (166 seedlings). Two groups of 29 and 27 plants of the contrasting parents were also inoculated with each pathogen. Chi-square test was employed to assess the goodness of fit of the observed segregation patterns to predicted Mendelian ratios. All ‘Elisa’ plants displayed highly susceptible reactions to both pathogens, whereas all ‘La Brillante’ plants were resistant, indicating high levels of phenotypic penetrance of this trait. The F₂ populations inoculated with either *B. basicola* or *B. rouxiae* displayed a good fit to 3:1 resistant/susceptible segregation ratios, indicating monogenic dominant resistance to both pathogens. This simple monogenic genetic control of *B. basicola* and *B. rouxiae* resistance will facilitate the incorporation of these traits into elite lettuce breeding lines and cultivars.

Keywords: Asteraceae, Soil-borne pathogen, black root rot, inheritance, resistance, breeding.

Introduction

Lettuce (*Lactuca sativa* L.; Asteraceae family) is a major vegetable crop around the world, being an important source of income in rural areas. Lettuce is a diploid ($2n=2x=18$ chromosomes) and autogamous species with a large genome (Reyes-Chin-Wo et al. 2017), displaying inflorescences in capitula with 10 to 25 hermaphrodite flowers. As the flowers of each capitulum open, the pistil elongates through a tubular corolla, releasing pollen grains from the anthers and ensuring self-fertilization (Ryder 1986; Harris 1995). From the breeding standpoint, the cleistogamic features of the lettuce flowers make the production of hybrid plants difficult, even under controlled crosses adopting emasculation/depollination techniques, since variable levels of self-fertilization can still occur (Nagata 1992; D'Andrea et al. 2008).

The area of lettuce cultivation is expanding continually in Brazil, encompassing around 87,000 hectares. However, lettuce breeding for the tropical Brazilian conditions is a great challenge since the cultivation of this vegetable crop is carried out by a large number of small farmers, in a wide territorial area, adopting distinct production systems and a multitude of cultivars/morphotypes. In addition, lettuce cultivation in the Neotropics is challenging due to a large number of diseases that affect this crop. Biotic stresses increase the costs, limit the period of production, and reduce lettuce yield and quality.

One of the emerging lettuce problems has been the black root rot disease caused by two *Berkeleyomyces* species: *B. basicola* and *B. rouxiae* (Nel et al. 2018). In Brazil, the black root rot was initially detected in lettuce in the South-East region in the late 1990s (Silva et al. 1999), and it is currently a major limiting factor for the 'Iceberg' and 'Butterhead' morphotypes in all producing regions (Sala et al. 2008; Souza 2022). The symptoms induced by *Berkeleyomyces* species in their host species are characterized by rotting of the root cortex, dark brown discoloration of the root tissues, stunting, and wilt/collapse of the infected plants (Allen 2001). In addition, the infection by *Berkeleyomyces* species can facilitate a simultaneous infection/invasion of the host root tissues by root-knot nematodes as well as *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium* species (Walker et al. 1998).

The available cultural and chemical management options to the black root rot disease are quite limited, costly, and often times ineffective (O'Brien and Davis 1994; Huang and Kang 2010). Given this scenario, the use of resistance lettuce cultivars would represent the most sustainable

strategy for management of this disease. The phenotypic response of resistant lettuce accessions to *Berkeleyomyces* species suggest that this trait might be under either qualitative and quantitative control, according to the germplasm source (Teixeira-Yañez 2005; Sala et al. 2008; Perdomo et al. 2022a). In fact, previous inheritance studies indicated that resistance to *B. basicola* in the accession *L. sativa* ‘PI 342444’ may be under control of a single dominant gene, tentatively named as *Tb* (= *Thielaviopsis basicola*) resistance gene (Sala et al. 2003).

Recent nationwide surveys indicated similar levels of incidence as well as overlapping geographical distribution of both pathogens (*B. basicola* and *B. rouxiae*) across major lettuce-producing areas of Brazil (Souza 2022). One sustainable and durable method for controlling complex pathogens is pyramiding multiple disease resistance genes into a single cultivar (Mundt 2018). More recently, broad-spectrum resistance to *Berkeleyomyces* species were identified in the five lettuce accessions viz. ‘Litte Gem’, ‘Maravilha 4 Estações’, ‘Salvius’, ‘Argeles’, and ‘La Brillante’ (Perdomo et al. 2022a). Among them, the cultivar ‘La Brillante’ (‘Batavian’ morphotype) is of extreme interest from the breeding standpoint, since it displayed high levels of resistance with phenotypic stability against all isolates from both *Berkeleyomyces* species (Perdomo et al. 2022a).

Elucidating the inheritance of traits of agronomic/horticultural interest is the first step to establish efficient breeding strategies for incorporation of the corresponding genetic factor(s) into elite cultivars. Thus, the main objective of the present work was to study the inheritance of the multiple resistance against isolates of both *B. basicola* and *B. rouxiae* identified in the cultivar ‘La Brillante’. Inheritance studies were carried out with isolates of the two pathogens, employing segregating populations derived from crosses between ‘La Brillante’ and ‘Elisa’ (a highly susceptible ‘Butterhead’ cultivar). The results reported here indicated ‘La Brillante’ as a promising source of major gene(s) for broad-spectrum resistance to isolates of *Berkeleyomyces* species, which will be useful for lettuce breeding programs worldwide.

Material and methods

Geographical location of the experiments – This work was carried out in the Plant Pathology and Plant Breeding Laboratories and in the greenhouses of the Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (CNPQ), Embrapa Hortaliças, located at an altitude of 996 meters above sea level and geographical coordinates of 15°56’00” South latitude and 48°08’00” longitude to the West, in the Administrative Region of Gama in Brasília-DF, Central Brazil, during the years 2021 and

2022.

Characteristics of the contrasting parental cultivars – Controlled crosses between contrasting cultivars were carried out in order to investigate the mode of inheritance of resistance to different isolates of the two *Berkeleyomyces* species. The hybridization process was carried out between the cultivar ‘Elisa’, used as a susceptible male (♂) parent and ‘La Brillante’ employed as the resistant female (♀) parent. ‘La Brillante’ is an heirloom cultivar developed in the 1930s in Europe; it has bright green leaves and multiple disease resistance traits (Sala et al. 2008; Hayes et al. 2011; 2014; Simko et al. 2015; Perdomo et al. 2022a). The cultivar ‘Elisa’ has large plants with light green foliage, cubic shape, and smooth leaves. ‘Elisa’ is resistant to lettuce mosaic virus (LMV) pathotype II, but displays susceptibility to *Septoria lactucae*, *B. basicola*, and *B. rouxiae* (Sala et al. 2008; Perdomo et al. 2022a; 2022b).

***Berkeleyomyces* isolates and inoculum production for the bioassays** – The isolates of *B. basicola* and *B. rouxiae* used in the present study were obtained from symptomatic lettuce plants and previously identified at species level via molecular analyses (Souza 2022). The isolates *B. rouxiae* (EH-2743 and EH-2763) were collected in Santa Maria de Jetibá, Espírito Santo–ES (20° 2’ 27” S; 40° 44’ 45” W) and Campinas, São Paulo–SP (47° 04’ 40” W; 22° 53’ 20” S), in the year 2021. The *B. basicola* isolates (EH-2783 and EH-2784) were collected in Teresópolis, Rio de Janeiro–RJ (22° 24’ 44” S; 42° 57’ 59” W) and Sumidouro, Rio de Janeiro–RJ (22° 02’ 46” S; 42° 41’ 22” W), in 2021 respectively. These isolates were grown in Petri dishes (9-cm-diameter), containing Potato Dextrose Agar (PDA-t) culture medium (200 g of potato, 20 g of dextrose, 20 g of agar, 1000 mL of distilled water and 30 mg of tetracycline/L), in a BOD incubator at a constant temperature of 23°C (12 hours light and 12 hours dark) for 15 days (Dhingra and Sinclair 1995). Conidia suspension was prepared by adding 10 mL of sterilized distilled water to each plate, then the conidia were released with the aid of a brush. The spore suspension was subsequently filtered through a double-layer gauze. The spore concentration was estimated under an optical microscope by counting them with the assistance of a Neubauer’s chamber. In the final step, the suspension was adjusted to concentrations of either 7.5×10^5 or 2×10^6 conidia per mL.

Inoculation protocol – At 21 days after germination, the seedlings were gently removed from the cells and washed in running tap water to get rid of the substrate adhered to the roots. The root system of each seedling was then immersed into 3 mL of the spore suspension (2×10^6

conidia/mL) for three minutes. The residual suspension was placed near the crown area of each transplanted seedling with the aid of a micropipette. The seedlings were transplanted into trays (72 cells) containing 1/3 of the substrate (Plantmax®) infested 10 days before with *Berkeleyomyces* spores at a concentration of 7.5×10^5 conidia/gram of substrate. Control (mock-inoculated) plants were dipped into sterilized distilled water and transplanted to trays containing non-colonized substrate and kept in the same environmental conditions, but at least one meter away from the inoculated plants.

Controlled crossings for production of F₁ hybrid plants, and development of F₂ segregating populations – Seeds of the contrasting cultivars ‘Elisa’ and ‘La Brillante’ were sown (3 mm depth) in 6.2 cm deep polystyrene trays with 128 cells (containing previously sterilized substrate) at 7-day intervals during three consecutive weeks. With this scheme, a greater coincidence of flowering between the contrasting male and female parental plants was obtained. The flower buds of the cultivar ‘La Brillante’ (chosen to be the ♀ parent), before anthesis, were emasculated and washed, according to the pollen removal technique proposed by Nagata (1992), which combines two traditional lettuce breeding methods (Oliver 1910; Pearson 1962). Emasculation was carried out with a sharp blade by cutting the upper third of each bud, thus cutting the anthers of the flowers of the recipient female plant, at the intersection of the corolla with the floral envelope, before sunrise (5:00 – 6:00 am). Then, after exposition of the stigma in development of the female parent, we proceed with the elimination of pollen grains in the floral stigma, with the help of a jet of water via a manual sprayer. Once the stigma was bifid and fully receptive, cross-pollination procedure was carried out using freshly-collected pollen grains from the cultivar ‘Elisa’ (chosen to be the ♂ parent). Fully open flowers were collected from ‘Elisa’ plants and then rubbed into each previously emasculated flower bud of the female parent. Subsequently, each pollinated flower bud was identified and covered with a paper bag. After the ripening of the seeds in the female parent, only previously emasculated and pollinated flowers were harvested. The seeds were then cleaned, packed, identified as having putative F₁ origin and stored in a cold chamber.

Evaluation of the reaction to *Berkeleyomyces* isolates of putative F₁ plants – These putative F₁ seeds were subsequently sown in trays of 128 cells and 21-days after seed germination 300 F₁ seedlings were inoculated with the isolates *B. rouxiae* EH-2763 (150 seedlings) and *B. basicola* EH-2783 (150 seedlings) and evaluated for the reaction to both fungi (**data not shown**). Then, leaf samples of plants identified as resistant to either *B. rouxiae* or *B. basicola*

and displaying morphologically distinct features in comparison with the original parents were collected, aiming to confirm their hybrid origin. The selection of truly hybrid plants was carried out via genotyping with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers (see section below).

DNA extraction from the contrasting parents and individuals from the F₁ populations and confirmation of their hybrid origin via RAPD marker genotyping – DNA was extracted individually from each plant of the parents and from putative F₁ individuals, according to a slightly modified 2X CTAB methodology (Boiteux et al. 1999). DNA samples were quantified using 1.5% agarose gel in 0.5X TBE buffer (Tris-borate-EDTA), stained with GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA) and visualized in a photodocumentator L-Pix ST (Loccus Biotechnology). The quantified DNA samples were diluted with TE + RNase to a concentration of 75 ng/μL and used as template in the RAPD assays. The final volume of the reaction was 12.5 μL, consisting of 2 μL of DNA, 5.95 μL of Milli-Q water; 1.25 μL of 10X buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0.6 μL of MgCl₂, 0.5 μL of dNTPs, 0.2 μL of *Taq* DNA polymerase and 2 μL of primer. Forty-eight primers (Operon random primer kit; Operon Technologies, Alameda, CA) were used to search for polymorphisms between the contrasting cultivars ‘Elisa’ and ‘La Brillante’. Template DNA of cultivars ‘BRS Mediterrânea’, ‘PI 342444’, and ‘Salinas 88’ cultivars were used as controls for primer selection in the RAPD assays. The primer OP-H7 was selected due to its ability to generate a sharp band putatively present in the ♂ parent and absent in the ♀ parent. This primer was then used for genotyping putative F₁ individuals. Polymerase chain reaction (PCR) assays were performed using a Veriti® thermocycler, Applied Biosystems (ABI). The PCR program consisted of an initial cycle of 94°C for 2 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds (denaturation), 36°C for 1 minute (primer annealing), and 72°C for 1.5 minutes (extension), followed by a final cycle of 68° for 10 minutes and 4°C for an indefinite period of time (∞). The PCR products (amplicons) were analyzed in agarose gels (1.5%) stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light, using the 1 Kb Plus DNALadder® marker (Invitrogen) for analysis of the products obtained.

Study of the segregation patterns of resistance to two species of *Berkeleyomyces* in the contrasting parents, F₁ hybrids and in F₂ populations –The hybrid origin of individual F₁ plants was assessed via RAPD marker genotyping. Two *bona-fide* F₁ plants were then self-fertilized to obtain two independent F₂ generations. Altogether, 413 F₂ seedlings (21-day-old)

were separately inoculated with *B. rouxiae* ‘EH-2743’ (247 seedlings) and *B. basicola* ‘EH-2784’ (166 seedlings). Two groups of 30 plants of the contrasting parents were also inoculated with each pathogen.

Disease severity assessment and statistical analysis – The disease assessment was performed 30 days after inoculation (DAI), using the disease severity scale based upon the degree of visual severity of the roots evaluated according to the scale proposed by O’Brien and Davis (1994) where: grade score 1 = absence of symptoms; grade 2 = traces of necrosis in the radicles; grade 3 = less than 50 % of necrotic roots; grade 4 = more than 50% and less than 90% of necrotic roots, and grade 5 = more than 90% of the roots severely affected. To determine the mode of inheritance, an arbitrary evaluation criterion was adopted, where: plants with scores between 1 and 2 were classified as resistant and plants with scores between 3 and 5 as susceptible. The data obtained for genetic analysis were evaluated by the chi-square (χ^2) significance test at 5% probability to check the goodness of fit to predicted Mendelian ratios. The expression for the chi-square significance test was $\chi^2 = \sum [(O-E) / E]^2$, where: O = observed frequency in the segregating population and E = expected frequency in the segregating population. Plants classified as resistant were transplanted into plastic pots (5L), containing a mixture of 110 g of ammonium sulfate, 510 g of super simple, 200 g of limestone, 20 liters of raw rice straw, 20 liters of rice straw and 40 liters of cattle manure for every 200 liters of soil. The pots with the transplanted plants were placed in a greenhouse to advance the F₃ progenies via controlled self-fertilization of individual F₂ plants.

Results

Selection of RAPD markers and genotyping of putative ‘La Brillante’ x ‘Elisa’ hybrid plants – Forty-eight RAPD primers were used in the initial screenings to identify polymorphisms between the resistant ♀ parent ‘La Brillante’ and the susceptible ♂ parent ‘Elisa’ as well as among the accessions ‘BRS Mediterrânea’, ‘PI 342444’, and ‘Salinas 88’ (used as controls) (**Figure 1**). Of these primers, the primer OP-H7 was selected due to its ability to generate a sharp band putatively present in the nuclear ♂ parent and absent in the ♀ parent genome, assuming uniparental maternal inheritance (Daniell 2007). As expected, stable polymorphic amplicons were able to differentiate both parents and allowed for the identification of truly F₁ plants (**Figure 2**). Two genotyped hybrid plants were then self-pollinated and their progenies were used in subsequent inheritance studies.

Segregation patterns of resistance/susceptibility in F₂ populations inoculated with two *Berkeleyomyces* species – The disease severity in the F₂ populations derived from the cross between the resistant cultivar ‘La Brillante’ and the susceptible cultivar ‘Elisa’ was the parameter used to quantify the resistance factors for *B. rouxiae* and *B. basicola* (**Figure 3; Panels A and B**). The parental ‘La Brillante’ exhibited 100% resistant plants for both *B. basicola* and *B. rouxiae* isolates, whereas the parental ‘Elisa’ displayed 100% of symptomatic plants, confirming the adequate levels of experimental control of the inoculation procedure with both *Berkeleyomyces* species (**Tables 1 and 2**). In the F₂ generations, in 247 plants inoculated with *B. rouxiae*, resistance was observed in 173 (70.04%) and susceptibility in 74 plants (29.96%) (**Table 1**). The 166 F₂ plants inoculated with *B. basicola*, 134 (80.72%) showed a resistant-like response and 32 (19.28%) showed a susceptible response (**Table 2**). These results indicated the involvement of a single dominant gene in the cultivar ‘La Brillante’ controlling resistance to *Berkeleyomyces* species. The chi-square tests of observed segregation patterns in the F₂ generations displayed a good fit to the 3:1 Mendelian ratios (**Tables 1 and 2**).

Discussion

In lettuce breeding, controlled hybridizations are carried out aiming to combine, into a single genotype, desirable genes from the contrasting parents. However, obtaining seeds via cross-pollination is very laborious, demanding skilled labor (Azevedo et al. 2013). The cleistogamic features of the lettuce flowers make the production of hybrid plants difficult, even under controlled crosses, since considerable levels self-fertilization can still occur (D’Andrea et al. 2008). Identification of truly hybrid plants based upon visual analyses is often times not accurate, especially when the controlled crosses are made between phenotypically similar cultivars/morphotypes (Sala and Nascimento 2014). This is especially true to in our assays, where seedlings of ‘La Brillante’ and ‘Elisa’ are phenotypically quite similar. Most flowering plants, such as lettuce, show uniparental maternal inheritance of plastid and mitochondrial genomes (Daniell 2007). In this context, the use of molecular markers exclusively present in pollen-donor parents is a very efficient tool to discriminate truly hybrid from self-fertilized plants (Truco et al. 2007). Simple marker technologies (such as RAPD) have been used to verify *bona-fide* F₁ lettuce plants (D’Andrea et al. 2008; Cabral et al. 2019). In the present study, the RAPD markers also proved to be excellent tools to verify the absence/occurrence of cross-fertilization between the contrasting lettuce cultivars.

For this investigation, both contrasting parents were selected based upon previous screenings to isolates of *Berkeleyomyces* species as well as for their agronomic/horticultural traits, increasing the prospect of generating progenies combining multi-resistance, high-yield and quality traits. By computing the incidence of extreme values for the evaluation of the damages in the roots of the contrasting parents, it was verified a clear-cut reaction with the parental ‘Elisa’ presenting 100% of the plants with severe symptoms (uniform dark brown discoloration of the root system) and the parental ‘La Brillante’ presenting 100% of the plants free of symptoms, confirming previous indication of sharp contrasting reactions between both parental cultivars (Sala et al. 2008; Perdomo et al. 2022a).

Regarding the phenotypic distribution in segregating populations, the classification of plants as resistant or susceptible based upon a standard categorization methodology (O’Brien and Davis 1994) allowed a reliable discrimination of these reactions within the F₂ population for both species of *Berkeleyomyces*. Considering all F₂ individuals inoculated with both fungal species, the average of the plants displaying scores between 1 and 2 (= resistant) was 74.33%, which is very close to the 75% expected in this generation for a 3:1 monogenic inheritance for this trait. The presence of 100% of the parental plants free of symptoms in addition to distribution of plants classified as resistant in the F₂ generation populations reinforce the hypothesis that the resistance factor(s) to *Berkeleyomyces* species of ‘La Brillante’ is controlled by a monogenic dominant gene/locus and with high degree of phenotypic penetrance. In the present work, the F₂ lettuce seedlings were evaluated under very harsh conditions. The seedlings were removed from the cells and washed in running water and then immersed in 3 mL of the spore suspension (2×10^6 conidia/mL) for three minutes. Finally, the seedlings were transplanted into trays containing 1/3 of the substrate pre-infested 10 days before with *Berkeleyomyces* spores at a concentration of 7.5×10^5 conidia per gram of substrate. Therefore, our results also indicated that the resistance gene(s) in ‘La Brillante’ might have high levels of phenotypic stability.

The results obtained here represent the first report on the inheritance of the reaction of lettuce against the two *Berkeleyomyces* species. In previous studies of inheritance in lettuce, a dominant gene (named as *Tb* gene) was also found to be responsible for conferring resistance to *B. basicola* isolates in progenies derived from the cultivar ‘Tinto’ (= ‘PI 342444’) as the source of resistance (Sala et al. 2008). There are thus far no molecular mapping studies characterizing either the *Tb* gene or other host resistance factors in the *Berkeleyomyces*-lettuce pathosystem. In this sense, the mapping of the genes(s) responsible for conferring resistance

against this pathogen in this pathosystem will allow to clarify if the dominant gene(s) reported here is/are allelic to *Tb* gene. Additional research actions will also involve mapping and chromosomal localization of the resistance factor(s) and verifying whether the resistances to *B. rouxiae* and *B. basicola* are controlled by either distinct or the same (allelic) gene(s). The reaction to both pathogens in F₃ progenies derived from the individual F₂ plants evaluated here can be employed in such extensive analyses. It is also interesting to verify if the resistance gene(s) present in ‘La Brillante’ are different from the previously described *Tb* gene in ‘PI 342444’ (Sala et al. 2008), involving in this study the analysis of populations derived from crosses between these two accessions.

Our observations of the progenies from the crosses between the cultivar ‘La Brillante’ and ‘Elisa’ indicated that they are promising sources of a superior combination of desirable horticultural traits, generating plants with attractive morphological characteristics, such as the size, color, and shape of the leaves that can be widely accepted in the global market. From the breeding standpoint, the progenies derived from the crosses evaluated here are also superior sources of multiple disease resistance genes, since the cultivar ‘La Brillante’ displays high levels of resistance against all isolates of the *Berkeleyomyces* species as well as a resistance to *Bremia lactucae* races (*Dm50* gene), *Verticillium dahliae*, tomato spotted wilt virus (TSWV), impatiens necrotic spot virus (INSV), and *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (Sala et al. 2008; Hayes et al. 2011; 2014; Simko et al. 2015; 2018; Fontes et al. 2019). On the other hand, the cultivar ‘Elisa’ displays high levels of resistance to lettuce mosaic virus (LMV) pathotype II (Sala et al. 2008). Thus, the employment of progenies derived from ‘La Brillante’ x ‘Elisa’ as potential sources of multiple resistance genes to *Berkeleyomyces* species will also contribute for the development by worldwide lettuce breeding programs of cultivars with adequate levels of Neotropical adaptation.

Acknowledgments – The authors would like to thank the CNPq and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for supporting the Graduate Program in Plant Pathology at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). The authors also thank the Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (CNPq), Embrapa Hortaliças, for the financial and structural support to develop this research and for the supply of seeds and inputs for conducting the trials. The authors thank Mr. Antonio Francisco Costa (CNPq) for his skillful assistance with the RAPD analyses. The authors A. Reis, MEN Fonseca, and LS Boiteux thank CNPq for the fellowships.

Authors' contributions – All authors contributed to the design and overall organization of the study. DNP, LSB, and AR developed the idea and wrote the manuscript in equal parts. DNP, SSL, CES, TBT, MENF, and CSC help with the lab assays, greenhouse works, inoculation procedures, and crossings. All authors read, commented and approved the final version of the manuscript.

Declarations

Conflicts of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Consent for publication: All authors give their consent for the publication of the manuscript to *Euphytica*.

References

- Allen SJ (2001) Black Root Rot. In Compendium of Cotton Diseases, 2nd ed.; Kirkpatrick T, Rothrock C, Eds.; APS Press: St Paul, MN, USA.
- Azevedo AM, Andrade Júnior VC, Oliveira CM, Fernandes JSC, Pedrosa CE, Dornas MFS, Castro BMC (2013) Seleção de genótipos de alface para cultivo protegido: Divergência genética e importância de caracteres. *Hortic Bras* 31: 260–265. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000200014>.
- Boiteux LS, Fonseca MEN, Simon PW (1999) Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *J Am Soc Hort Sci* 124: 32–38. <https://doi.org/10.21273/JASHS.124.1.32>.
- Cabral CS, Fonseca MEN, Oliveira VR, Boiteux LS, Reis A (2019) A single dominant gene/locus model for control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 resistance in lettuce (*Lactuca sativa*). *Euphytica* 215: 114. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2441-2>.
- D'Andrea L, Felber F, Guadagnuolo R (2008) Hybridization rates between lettuce (*Lactuca sativa*) and its wild relative (*L. serriola*) under field conditions. *Environ Biosafety Res* 7: 61–71. <https://doi.org/10.1051/ebr:2008006>.
- Daniell H (2007) Transgene containment by maternal inheritance: Effective or elusive? *Proc Natl Acad Sci* 104(17): 6879–6880. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702219104>.
- Dhingra OD, Sinclair JB (1995) *Basic Plant Pathol Methods.*, 2nd Ed. (Lewis Publishers: Boca Raton, FL).
- Harris EM (1995) Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: A synthesis of historical and current concepts. *Bot Rev* 61: 93–278.
- Hayes RJ, McHale LK, Vallad GE, Truco MJ, Michelmore RW, Klosterman SJ, Subbarao K.

- V (2011) The inheritance of resistance to *Verticillium* wilt caused by race 1 isolates of *Verticillium dahliae* in the lettuce cultivar La Brillante. *Theor Appl Genet* 123: 509–517. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1603-y>.
- Hayes RJ, Trent MA, Truco MJ, Antonise R, Michelmore RW, Bull CT (2014) The inheritance of resistance to bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in three lettuce cultivars. *Hort Res* 1: 14066 <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.66>.
- Mundt CC (2018) Pyramiding for resistance durability: Theory and practice. *Phytopathology* 108: 792–802.
- Nagata RT (1992) Clip-and-wash method of emasculation for lettuce. *HortScience* 27: 907–908. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.8.907>.
- Nel WJ, Duong TA, Wingfield BD, Wingfield MJ, De Beer ZW (2018) A new genus and species for the globally important, multihost root pathogen *Thielaviopsis basicola*. *Plant Pathol* 67: 871–882. <https://doi.org/10.1111/ppa.12803>.
- O'Brien RG, Davis RD (1994) Lettuce black root rot—a disease caused by *Chalara elegans*. *Australas Plant Pathol* 23: 106–111.
- Oliver GW (1910) *New Methods of Plant Breeding*. Washington, DC: United States Bureau of Plant Industry (Bulletin 167).
- Pearson OH (1962) A simplified method for emasculating lettuce flowers. *Veget Improv Newsl* 4: 4.
- Perdomo DN, Torres TB, Souza RL, Cabral CS, Reis A, Fonseca MEN, Boiteux LS (2022a) Genetic sources of multiple immune-like resistance to *Berkeleyomyces basicola* and *Berkeleyomyces rouxiae* in lettuce (*Lactuca sativa*) germplasm. *J Plant Dis Prot* (submitted).
- Perdomo DN, Torres TB, Santos CE, Cabral CS, Reis A, Boiteux LS (2022b) Identification of stable sources of rate-reducing resistance to *Septoria lactucae* in lettuce germplasm. *Phytoparasitica* (submitted).
- Reyes-Chin-Wo S, Wang Z, Yang X, Kozik A, Arikat S, Song C, Xia L, Froenicke L, Lavelle D, Truco MJ, Xia R, Zhu S, Xu C, Xu H, Xu X, Cox K, Korf I, Meyers B, Michelmore RW (2017) Genome assembly with in vitro proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. *Nat Commun* 8: 1–11, <https://doi.org/10.1038/ncomms14953>.
- Ryder EJ. Lettuce Breeding, pages 433–474, In: Bassett MJ (1986) *Breeding Vegetable Crops*. AVI Publishing Company, Westport, Connecticut, USA.
- Sala FC, Costa C, Teixeira-Yañez LDD, Blat SF (2003) Reação de alface a murchadeira (*Thielaviopsis basicola*). *Hortic Bras* 21: 336.

<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/olfs4053%20c.pdf>.

- Sala FC, Costa CP, Teixeira LDD, Fabri EG, Blat, SF (2008) Lettuce reaction to black root rot caused by *Thielaviopsis basicola*. Horticultura Brasileira 26: 398–400. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362008000300021>.
- Sala FC, Nascimento WM (2014) Produção de sementes de alface. In: Nascimento WM (ed.). Produção de Sementes de Hortaliças. Embrapa. Brasília, DF.
- Simko I, Ochoa OE, Pel MA, Tsuchida C, Fonti Forcada C, Hayes RJ, Michelmore RW (2015) Resistance to downy mildew in lettuce ‘La Brillante’ is conferred by *Dm50* gene and multiple QTL. Phytopathology 105: 1220–1228. <https://doi.org/10.1094/PHTO-02-15-0057-R>.
- Sousa RL (2022) Identificação molecular e patogenicidade de espécies de *Berkeleyomyces* associadas a hortaliças no Brasil com ênfase na cultura da Alface, 62 p. Master Degree Thesis, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. Brazil.
- Truco MJ, Antonise, R, Lavelle D, Ochoa O, Kozik A, Witsenboer H, Peleman J (2007) A high-density, integrated genetic linkage map of lettuce (*Lactuca* spp.). Theor Appl. Genet 115: 735–746. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0599-9>.
- Walker NR, Kirkpatrick TL, Rothrock C (1998) Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Thielaviopsis basicola* on cotton (*Gossypium hirsutum*). J Nematol 30: 415.

Table 1 Segregation ratio of resistance (R) and susceptibility (S) to *Berkeleyomyces rouxiae* in 247 plants of the F₂ generation derived from crosses between the contrasting parental lettuce (*Lactuca sativa*) cultivar ‘Elisa’ (susceptible male ♂ parent) and ‘La Brillante’ (resistant female ♀ parent). Brasília-DF, Brazil, 2022.

Contrasting parents and F ₂ generation		Number of evaluated plants			Expected ratio (R:S)	χ^2 tabulated	χ^2 calculated
		Total	Resistant	Susceptible			
La Brillante	P ₁	15	15	0	0:1	-	-
Elisa	P ₂	14	0	14	1:0	-	-
P ₁ x P ₂	F ₂	247	173	74	3:1	3.84	3.24*

*Chi-square values at the 5% probability level

Table 2 Segregation ratio of resistance (R) and susceptibility (S) to *Berkeleyomyces basicola* in 166 plants of the F₂ generation derived from crosses between the contrasting parental lettuce (*Lactuca sativa*) cultivar ‘Elisa’ (susceptible male ♂ parent) and ‘La Brillante’ (resistant female ♀ parent). Brasília-DF, Brazil, 2022.

Contrasting parents and F ₂ generation		Number of evaluated plants			Expected ratio (R:S)	χ ² tabulated	χ ² calculated
		Total	Resistant	Susceptible			
La Brillante	P ₁	14	14	0	0:1	-	-
Elisa	P ₂	13	0	13	1:0	-	-
P ₁ x P ₂	F ₂	166	134	32	3:1	3.84	2.90*

*Chi-square values at the 5% probability level

Fig. 1 Patterns of amplicons generated by a subset of 48 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) primers (including some replica of the RAPD reactions), using as template DNA samples from the constating lettuce cultivars ‘La Brillante’ (resistant to *Berkeleyomyces* species) ‘Elisa’ (highly susceptible to *Berkeleyomyces* species). The cultivars ‘BRS Mediterrânea’ (= Medit.), ‘PI 342444’ (= PI) and ‘Salinas’ were also included in these analyses. The ‘M’ code indicates the 1 kb molecular weight marker line plus DNA ladder (Invitrogen). The primer designation corresponding to each RAPD profile is listed in the bottom of each panel.

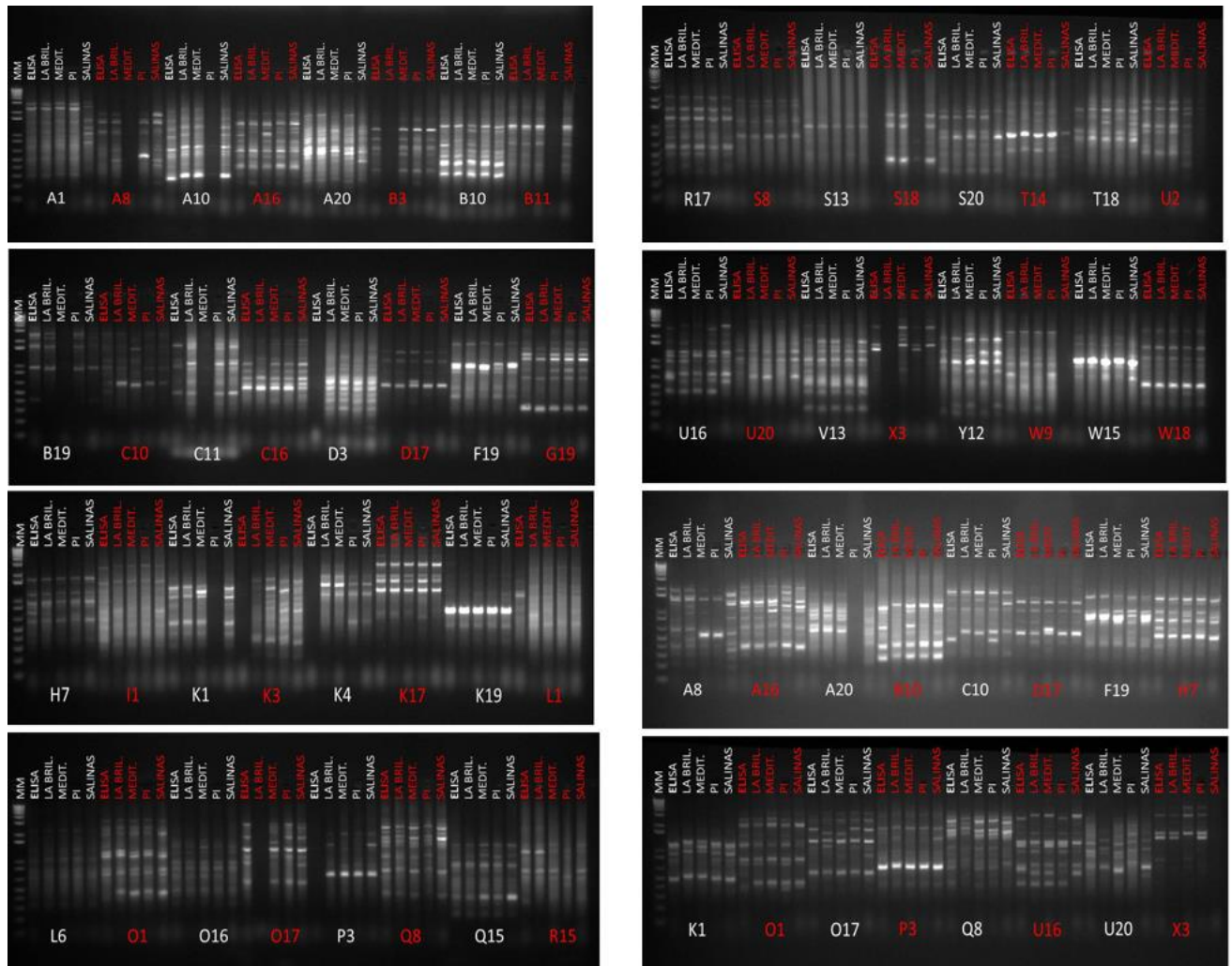


Fig. 1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) amplicon profiles (using the primer OP-H7) using as template DNA extracted from the lines ‘Elisa’ = E (male ♂ pollen donor parent), ‘La Brillante’ = LB (female ♀ parent) and a sample of four putative F₁ hybrid plants (**LB.E-1-1**; **LB.E-1-3**; **LB.E-2-1**, and **LB.E-2-2**). Truly hybrid plants displayed a stable polymorphic RAPD amplicon (green arrow), which is present exclusively in the male parental cultivar ‘Elisa’ and in three bona-fide hybrid plants (**LB.E-1-1**; **LB.E-1-3**; and **LB.E-2-2**) and absent in the DNA of self-fertilized female cultivar ‘La Brillante’ and in one pseudo hybrid plant (= **LB.E-2-1**).

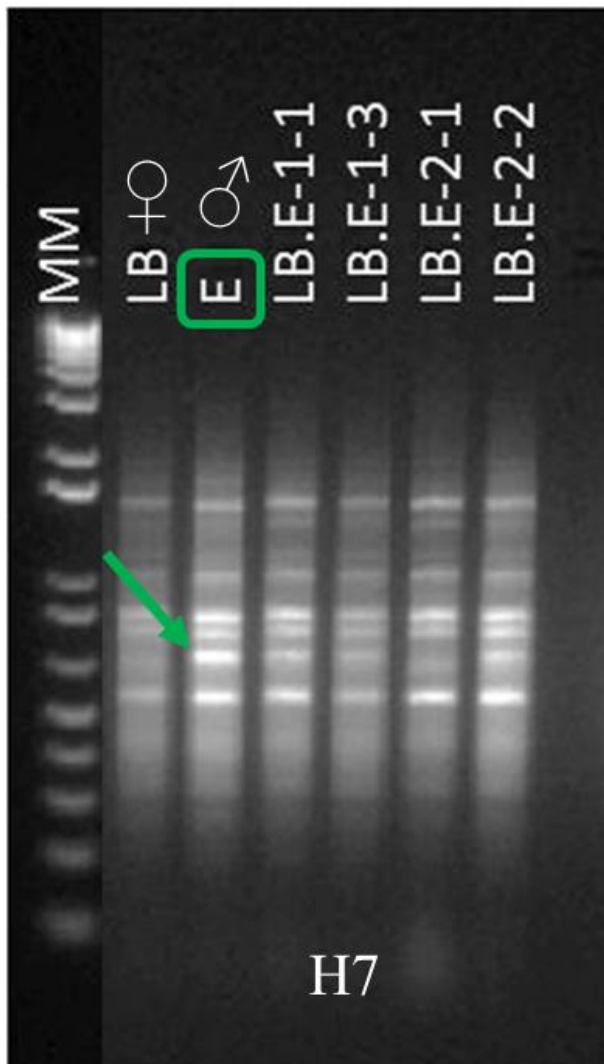
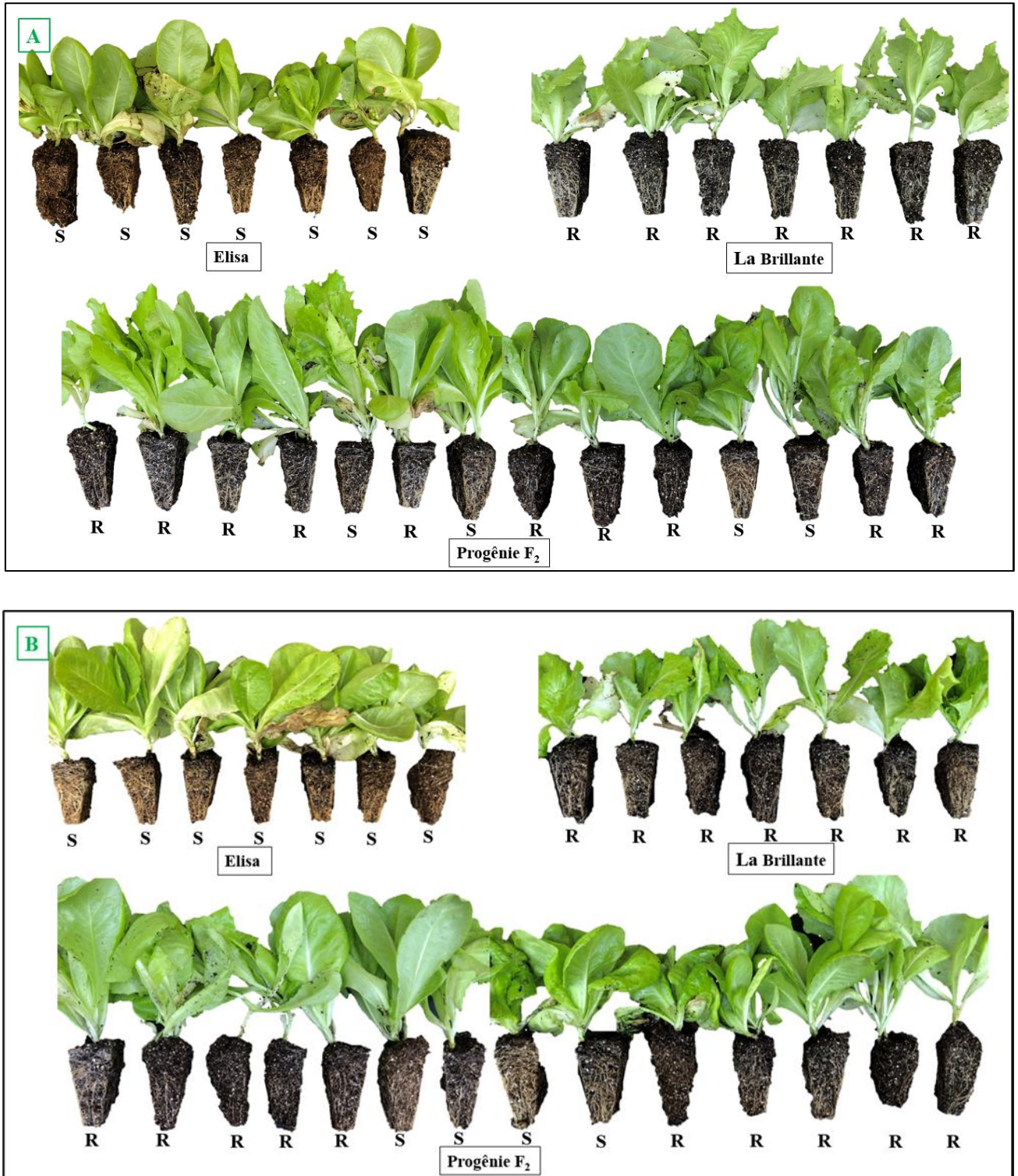


Fig. 3 Variation of black root rot symptoms in lettuce 30 days after inoculation with spores of *Berkeleyomyces* species in the cultivars ‘Elisa’ (susceptible parent); ‘La Brillante’ (resistant parent) and in samples of the F₂ progenies. **Panel A:** Plants inoculated with *B. rouxiae*. **Panel B:** plants inoculated with *B. basicola*. The susceptible reaction can be easily visualized by the dark brown discoloration of the root tissues. Brasília-DF, Brazil, 2022.



CAPÍTULO V

Conclusões.

CONCLUSÕES – CAPÍTULOS

Artigo 1 (Capítulo II). Vinte e um (21) acessos (15 do morfotipo ‘Crespa’) foram identificados com níveis superiores de resistência do tipo redutora de taxa da septoriose. As cultivares ‘BRS Mediterrânea’ e ‘Vanda’ mostraram menores valores de Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). As demais cultivares mostraram menores níveis de resistência, apresentando valores intermediários de AACPD. Uma exceção foi a cultivar ‘Rubi’ (testemunha) que mostrou moderada suscetibilidade aos diferentes isolados do patógeno.

Artigo 2 (Capítulo III). Cultivares do morfotipo ‘Romana’ e ‘Batávia’ apresentaram uma frequência mais elevada de acessos resistentes a isolados de duas espécies de *Berkeleyomyces*. Foi observada uma variação intervarietal entre acessos dos morfotipos ‘Crespa’, ‘Mimosa’ e ‘Americana’. A maioria das alfices do segmento ‘Lisa’ se mostraram suscetíveis. Os acessos ‘Little Gem’ (‘Romana’), ‘Maravilha 4 Estações’ (‘Lisa’), ‘Salvius’ (‘Romana’), ‘Argeles’ (‘Crespa’) e ‘La Brillante’ (‘Batávia’) apresentaram resistência fenotipicamente estável contra todos os isolados de *Berkeleyomyces*. Esses acessos podem ser recomendados como parentais em programas de melhoramento de alfice, visando a obtenção de cultivares resistentes a estes patógenos.

Artigo 3 (Capítulo IV).

A cultivar ‘La Brillante’ apresentou, em ensaios prévios, níveis superiores de resistência contra isolados de ambas as espécies de *Berkeleyomyces* (*B. basicola* e *B. rouxiae*). Estudos de herança foram conduzidos para investigar o controle genético dessa resistência a ambos os patógenos. Inoculações controladas foram conduzidas separadamente, empregando populações derivadas de cruzamentos entre ‘La Brillante’ e ‘Elisa’ (parental suscetível). Os testes de qui-quadrado indicaram padrões de segregação de acordo com a proporção Mendeliana 3:1, indicando uma resistência monogênica dominante para ambos os patógenos. Este controle genético simples da resistência a *B. basicola* e *B. rouxiae* facilitará a incorporação dessas características em linhagens e cultivares elites de alfice.

CONCLUSÕES – GERAIS

- Em conclusão, os resultados obtidos na presente tese indicam haver distintos padrões de respostas dos diferentes morfotipos varietais de alface em relação aos níveis de resistência/suscetibilidade a isolados das espécies de *Berkeleyomyces* e *S. lactucae*.
- A identificação e caracterização genética de novas fontes de resistência contra esses patógenos representa uma importante contribuição para melhoramento da alface.
- O manejo destas doenças, via utilização de cultivares resistentes, pode garantir níveis maiores de sustentabilidade do cultivo desta hortaliça em regiões tropicais e subtropicais do Brasil e do mundo.