



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE CENOURA À QUEIMA DAS
FOLHAS, PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS, DIVERSIDADE
GENÉTICA E SENSIBILIDADE DE *Alternaria dauci* A
FUNGICIDAS.**

ELIANE TERUMI SHIBATA

**BRASÍLIA, DF
2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE CENOURA À QUEIMA DAS FOLHAS,
PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS, DIVERSIDADE GENÉTICA E
SENSIBILIDADE DE *Alternaria dauci* A FUNGICIDAS.**

ELIANE TERUMI SHIBATA

**Dissertação apresentada ao Departamento
de Fitopatologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Fitopatologia.**

**BRASÍLIA, DF
JUNHO/2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE CENOURA À QUEIMA DAS FOLHAS,
PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS, DIVERSIDADE GENÉTICA E
SENSIBILIDADE DE *Alternaria dauci* A FUNGICIDAS.**

ELIANE TERUMI SHIBATA

Orientador: Professor José Ricardo Peixoto

**Dissertação apresentada ao Departamento
de Fitopatologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Fitopatologia.**

**BRASÍLIA, DF
JUNHO/2008**

Trabalho executado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do Professor José Ricardo Peixoto, com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE CENOURA À QUEIMA DAS FOLHAS,
PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS, DIVERSIDADE GENÉTICA E
SENSIBILIDADE DE *Alternaria dauci* A FUNGICIDAS.**

Eliane Terumi Shibata

Aprovada por:

**Engº. Agrônomo José Ricardo Peixoto, Doutor
Universidade de Brasília – FAV
Orientador
E-mail: peixoto@unb.br**

**Engº. Agrônomo Adalberto Correa Café Filho, Doutor
Universidade de Brasília – Departamento de Fitopatologia
Examinador Interno
E-mail: cafeilh@unb.br**

**Engº. Maria Esther de Noronha Fonseca, Doutora
Embrapa Hortaliças - Análise Genômica
Examinador externo
E-mail: mesther@cnph.embrapa.br**

Brasília – DF, 26 de Junho de 2008.

FICHA CATALOGRÁFICA

Shibata, Eliane Terumi

Reação de cultivares de cenoura à queima das folhas, prevalência de patógenos, diversidade genética e sensibilidade de *Alternaria dauci* a fungicidas.

Orientação: José Ricardo Peixoto. Brasília, 2008. 98p.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Departamento de Fitopatologia, 2008.

1. Queima das folhas. 2. Prevalência. 3. Fungicidas. 4. Diversidade genética. I. Peixoto, J.R. II. Título.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Shibata, E.T. **Reação de cultivares de cenoura à queima das folhas, prevalência de patógenos, diversidade genética e sensibilidade de *Alternaria dauci* a fungicidas.** Brasília, Universidade de Brasília, 2008, 98p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Eliane Terumi Shibata

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Reação de cultivares de cenoura à queima das folhas, prevalência de patógenos, diversidade genética e sensibilidade de *Alternaria dauci* a fungicidas.

GRAU: MESTRE ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. À autora reservam-se os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora.

Eliane Terumi Shibata

CPF: 929.385.231-49

E-mail: terumi17@hotmail.com

“Não confunda jamais conhecimento com sabedoria.

Um ajuda a ganhar a vida; o outro a construir uma vida.”

Sandra Carey

*Aos meus pais, Ricardo Tetsuya e Mariko
Maria, pelos ensinamentos dos valores da vida;
Aos companheiros de todos os momentos: Meu
esposo, Daniel Alexandre e meus irmãos,
Adriana Harumi e Augusto Issamu;
As alegrias da tia: meus sobrinhos Paulo Akira
e Eduarda Yukari.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, que por todos os momentos esteve presente em minha vida, mesmo naqueles mais difíceis. Que permitiu, me concedeu força e sabedoria para conclusão de mais esta etapa tão importante;

Aos meus pais Ricardo Tetsuya Shibata e Mariko Maria Yamagata Shibata pelo carinho, incentivo e principalmente, por acreditarem incondicionalmente na minha capacidade;

Ao meu esposo Daniel Alexandre Coelho por toda dedicação, paciência, compreensão e palavras de carinho;

À toda minha família, em especial, meus irmãos Adriana Harumi e Augusto Issamu; sobrinhos Paulo Akira e Eduarda Yukari; cunhada Poliana Velasco, pelo incentivo em todos os momentos;

Aos novos familiares Maria do Socorro, Manuel (meus sogros), David e Denílson (cunhados) e Simone e Patrícia pelo apoio;

Aos meus velhos e eternos amigos: Danielle Persoli, Daniel Anacleto, Thiago Alves Borges, Uéllen Lisoski, por todo o incentivo e apoio;

Aos meus novos amigos: Keize Junqueira, Gisele Lousada, Patrícia Pereira, Anelise Orílio, Magno, Silvia, Ana Paula, Leonardo Braúna pela amizade e todos os momentos juntos de descontração e sofrimento até altas horas da noite (hehe);

Aos meus novos amigos da Embrapa Hortaliças: Helena, Ângela, Michelle, Carielle, Fabíola, Cléia, Maria, Leonardo, Clodoaldo, Bruno, pelo constante apoio e inesquecíveis momentos de diversão (Adoro vocês!)

À Lilian Pedrosa Marouelli pela gentileza, disponibilidade e preciosa ajuda.

À minha amiga e ex- orientadora Leide Rovênia, peça fundamental na minha escolha de prosseguir o estudo e especialização (grande incentivo);

Ao meu co-orientador Ailton Reis pela amizade, confiança e ensinamentos para toda a vida;

Ao meu orientador José Ricardo Peixoto pelo acompanhamento desde a graduação e amizade,

Ao Dr. Jairo Vidal Vieira e Dr. Giovani Olegário, pela ajuda e idéias na promoção deste trabalho e à equipe do projeto cenoura pela condução do experimento de campo e coleta de material;

À Dra Maria Esther pelo interesse, disponibilidade e orientação em parte deste trabalho;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília;

Aos produtores de cenoura da região de São Gotardo, Irecê, Distrito Federal e Padre Bernardo pelo fornecimento do material para análise;

Aos funcionários do Laboratório de Melhoramento genético da Embrapa Hortaliças pela ajuda, em especial ao Willian e Chico;

À todos os amigos da graduação, mestrado ou doutorado, que por um momento da vida nos encontramos em busca do mesmo ideal. Alguns apenas passageiros (mensageiros de Deus) que deixaram preciosos ensinamentos e grandes saudades, e outros que vieram para fazer parte de minha vida! Obrigada!

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

À todos que, de alguma forma,contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO GERAL -----	1
ABSTRACT -----	3
INTRODUÇÃO GERAL -----	5
Importância da cultura da cenoura -----	5
Resistência a doenças -----	5
REVISÃO DE LITERATURA -----	7
<i>Alternaria dauci</i> -----	8
<i>Cercospora carotae</i> -----	10
<i>Xanthomonas hortorum pv. carotae</i> -----	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	14
CAPÍTULO 1 - Reação de cultivares de cenoura a queima das folhas e prevalência e incidência dos patógenos associados à doença. -----	18
RESUMO -----	19
ABSTRACT -----	20
INTRODUÇÃO -----	21
MATERIAL E MÉTODOS -----	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	27
CONCLUSÕES -----	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	36
CAPÍTULO 2 - Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial de <i>Alternaria dauci in vitro</i>. -----	39

RESUMO -----	40
ABSTRACT -----	41
INTRODUÇÃO -----	42
MATERIAL E MÉTODOS -----	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	47
CONCLUSÕES -----	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	56
CAPÍTULO 3 - Diversidade genética de <i>Alternaria dauci</i> de cenoura, coentro e salsa. -----	59
RESUMO -----	60
ABSTRACT -----	61
INTRODUÇÃO -----	62
MATERIAL E MÉTODOS -----	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	67
CONCLUSÕES -----	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	74
ANEXO -----	77

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1.1 Relação das cultivares de cenoura utilizadas nas avaliações de resistência à queima das folhas em campo e casa da vegetação.-----	23
Tabela 1.2 Área abaixo da curva de progresso da queima das folhas em variedades de cenoura em campo, sob infestação natural.-----	27
Tabela 1.3 Área abaixo da curva de progresso da queima das folhas em variedades de cenoura em casa de vegetação, em parcelas inoculadas com <i>Alternaria dauci</i> ----	29
Tabela 1.4 Prevalência de patógenos causadores da queima das folhas em São Gotardo, Irecê e Distrito Federal e entorno do DF durante duas estações chuvosas.-	34
Tabela 2.1 Relação de isolados de <i>A. dauci</i> isoladas a partir de lesões de folhas da cenoura e respectivo local de coleta.-----	46
Tabela 2.2 Percentual de inibição de crescimento micelial (PIC) de 32 isolados de <i>A. dauci</i> nas concentrações 0; 0,1; 1; 10 e 100 ppm do fungicida azoxistrobin.-----	48
Tabela 2.3 Percentual de inibição de crescimento micelial (PIC) de 32 isolados de <i>A. dauci</i> nas concentrações 0; 0,1; 1; 10 e 100 ppm do fungicida iprodione.-----	50
Tabela 2.4 Percentual de inibição de crescimento micelial (PIC) de 32 isolados de <i>A. dauci</i> nas concentrações 0; 0,1; 1; 10 e 100 ppm do fungicida mancozeb.-----	52
Tabela 3.1 Relação de isolados de <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria porri</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Stemphylium</i> sp. e <i>Alternaria dauci</i> utilizados na análise molecular.-----	65

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 Incidência de <i>Alternaria dauci</i> , <i>Cercospora carotae</i> e <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i> em São Gotardo, em dois anos.-----	31
Figura 1.2 Incidência de <i>Alternaria dauci</i> , <i>Cercospora carotae</i> e <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i> em Irecê em dois anos.-----	31
Figura 1.3 Incidência de <i>Alternaria dauci</i> , <i>Cercospora carotae</i> e <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i> em lavouras convencionais do Distrito Federal e entorno do DF, em dois anos.-----	32
Figura 1.4 Incidência de <i>Alternaria dauci</i> , <i>Cercospora carotae</i> e <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i> em lavouras orgânicas do Distrito Federal e entorno do DF, em dois anos.-----	32
Figura 2.1 Padrão de crescimento micelial, com diferentes doses do fungicida azoxistrobin, de <i>A. dauci</i> após cinco dias de cultivo. -----	53
Figura 2.2 Padrão de crescimento micelial, com diferentes doses do fungicida iprodione, de <i>A. dauci</i> após cinco dias de cultivo. -----	54
Figura 3.1 Análise de agrupamento de 69 isolados de <i>Alternaria dauci</i> construído pelo método de agrupamento UPGMA, a partir do coeficiente de Dice.-----	69
Figura 3.2 Produtos de amplificação de DNA genômico de <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria porri</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Stemphylium</i> sp. e 69 isolados de <i>Alternaria dauci</i> obtidos a partir do primer P-203. -----	70
Figura 3.3 Produtos de amplificação de DNA genômico de <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria porri</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Stemphylium</i> sp. e 69 isolados de <i>Alternaria dauci</i> obtidos a partir do primer P-284.-----	71
Figura 3.4 Produtos de amplificação de DNA genômico de <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria porri</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Stemphylium</i> sp. e 69 isolados de <i>Alternaria dauci</i> obtidos a partir do primer P-285.-----	72

RESUMO GERAL

Reação de cultivares de cenoura à queima das folhas, prevalência de patógenos, diversidade genética e sensibilidade de *Alternaria dauci* a fungicidas.

A cenoura é uma cultura suscetível a diversas doenças, entre elas a de maior importância econômica, a queima das folhas. A doença é causada por um complexo etiológico envolvendo dois fungos, *Alternaria dauci* e *Cercospora carotae* e a bactéria *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* (sin. *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*). Este trabalho teve como objetivos: 1) avaliar a reação de 13 cultivares de cenoura à queima das folhas sob condições de campo e 14 em casa de vegetação; 2) avaliar a prevalência e incidência dos patógenos causadores da doença, através da análise etiológica, em amostras de campos de produção das regiões de São Gotardo – MG, Irecê – BA e Distrito Federal – DF entre Dezembro/2006 e Dezembro/2007; 3) avaliar a sensibilidade *in vitro* de 32 isolados de *Alternaria dauci* de cenoura, através do crescimento micelial, aos fungicidas azoxistrobin, iprodione e mancozeb e 4) estudar a diversidade genética, através de dados de RAPD, de isolados de *Alternaria dauci* coletados em folhas de cenoura, coentro e salsa de diferentes regiões do Brasil. Em campo, verificou-se que as cultivares Brasília (Embrapa), Karine F₁, Londrina e Esplanada apresentaram elevada resistência à doença, enquanto Forto Nantes e Bangor F₁ foram suscetíveis. Em casa de vegetação as cultivares Brasília importada, Karine F₁, Bangor F₁ e Juliana F₁ apresentaram-se resistentes e Brazlândia, Londrina, Brasília, Carandaí, Forto Nantes, AF-1641, Esplanada, Alvorada, Verão HT e AF-750 foram suscetíveis. Na análise etiológica verificou-se presença de *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* apenas no primeiro ano com grande incidência em São Gotardo. *Cercospora carotae* ocorreu com grande frequência nas lavouras orgânicas do Distrito Federal nos dois períodos avaliados. *Alternaria dauci* foi o patógeno que ocorreu com maior frequência nas lavouras avaliadas e é o mais comum agente causal da doença no campo durante todo o ano. Nos ensaios de fungicidas as análises de regressão indicaram que com o incremento das doses houve redução de crescimento micelial do fungo e que com a dose de 100 ppm obteve-se maior percentual de inibição. À esta concentração, o fungicida azoxistrobin não foi capaz de inibir totalmente o crescimento micelial dos isolados avaliados, com redução de 20 até 61,24%. Todos os isolados indicaram sensibilidade na concentração de 100 ppm do fungicida iprodione, com exceção do EH 590, EH 592, EH 1544 que apresentaram menor sensibilidade. A dose de 100 ppm de mancozeb reduziu o crescimento micelial de todos os isolados. No entanto, alguns deles foram menos

inibidos nesta concentração, mostrando que há diferença de sensibilidade entre os mesmos a este fungicida. Não houve influência na sensibilidade dos isolados, coletados nas diferentes regiões, para nenhum dos três fungicidas utilizados. Nas análises via RAPD, o dendrograma construído, pelo método UPGMA, usando o coeficiente de Dice foi eficiente na separação de espécies de *Alternaria*. Verificou-se também uma alta diversidade genética entre os isolados de *A. dauci*. Apenas o primer P203 resultou um padrão capaz de separar os isolados de diferentes hospedeiras dentro da espécie *A. dauci*.

Palavras chaves: *Alternaria dauci*, queima das folhas, cenoura.

ABSTRACT

Reaction of carrot cultivars to leaf blight, prevalence of pathogens, genetic diversity and sensitivity of *Alternaria dauci* to fungicides.

The carrot is a crop susceptible to various diseases, including that of greater importance, the leaf blight. The disease is caused by a complex etiological involving two fungi, *Alternaria dauci* and *Cercospora carotae* and bacterium *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* (syn. *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*). This study aimed to evaluate the reaction of thirteen varieties to leaf blight of carrot under field conditions and fourteen in a greenhouse, the prevalence and incidence of pathogens causing the disease, through analysis etiological in samples of picking fields of regions of São Gotardo - MG, Irecê - BA and the Distrito Federal- DF between December/2006 to December/2007, assess the sensibility *in vitro* of 32 isolates of *A. dauci* of carrot, through mycelial growth, the fungicides azoxystrobin, iprodione and mancozeb and finally, study the genetic diversity, through data from RAPD, isolated from *A. dauci* collected in leaves of carrot, cilantro and parsley from different regions of Brazil. In the field, it was found that the cultivars Brasília (Embrapa), Karine F1, Londrina and Esplanada showed high resistance to disease, while Forto Nantes and Bangor F1 were susceptible. In a greenhouse the cultivars Brasília importada, Karine F1, Bangor F1 and Juliana F1 showed up resistance and Brazlandia, Londrina, Brasília, Carandaí, Forto Nantes, AF-1641, Esplanada, Alvorada, Verão HT and AF-750 were susceptible. In the analysis etiological there was presence of *X. hortorum* pv. *carotae* only in the first year with great incidence to São Gotardo. *C. carotae* occurred with great frequency in the organic crops of Distrito Federal in two periods evaluated. *Alternaria dauci* was the pathogen that occurred frequently in crops evaluated and is the most common causal agent of the disease in the field throughout the year. In tests of the fungicides, analyses of regression indicated that the increase of doses reduced from mycelial growth of the fungus and the dose of 100 ppm had higher percentage inhibition. The 100 ppm, the fungicide azoxistrobin was unable to completely inhibit the growth of mycelial isolates, with a reduction from 20 to 61.24%. For iprodione all isolates showed sensibility to the concentration of 100 ppm of fungicide, with the exception of EH 590, EH 592, EH 1544 which had lower sensibility. For mancozeb, the dose of 100 ppm reduced the mycelial growth of all isolated, though some of them were less inhibited by this dose, indicating that there is a difference of sensibility between them in this fungicide. There was no

effect on the sensibility of the isolates, collected in different regions, for any of the three fungicides used. In analyses by RAPD, the dendrogram built by UPGMA method, using the coefficient of Dice was effective in separating species of *Alternaria*. There was also a high genetic diversity among isolated from *A. dauci*. Only the primer P203 resulted in a model capable of separating the isolates from different host within species *A. dauci*.

Key words: *Alternaria dauci*, leaf blight, carrot.

INTRODUÇÃO GERAL

Importância da cultura da cenoura

A cenoura (*Daucus carotae*) é uma hortaliça de elevado valor nutritivo, sendo provavelmente uma das melhores fontes de β -caroteno (provitamina A). A vitamina A é um nutriente fundamental para o crescimento, diferenciação e integridade do tecido epitelial, essencial nos períodos de gravidez e na primeira infância (Saunders, 2001). No ser humano, apenas cem gramas de cenoura são suficientes para suprir as necessidades diárias de vitamina A (cerca de 5.000 a 15.000 Unidades Internacionais).

Devido às suas qualidades, dentre elas a palatabilidade, o seu consumo tem sido crescente, sendo hoje, segundo pesquisas do IBGE (2003), a quinta hortaliça mais consumida no Brasil. É uma hortaliça mundialmente cultivada, sendo China, Estados Unidos e Rússia os maiores produtores mundiais (Rubatsky *et al.*, 1999).

A estimativa de produção e área plantada de cenoura no Brasil, em 2005, foi de aproximadamente 766 mil toneladas e 26 mil hectares. A produtividade média no ano foi de 29,5 ton/ha, porém em São Gotardo e Brasília tem-se alcançado produções de até 80 ton/ha. O valor total da produção em 2003 foi de 155 milhões de dólares, equivalente a 5,8% do valor total da produção de hortaliças (FAO, 2005).

Os principais municípios produtores no Brasil são: Carandaí, Santa Juliana e São Gotardo (Minas Gerais); Piedade, Ibiúna e Mogi das Cruzes (São Paulo); Marilândia (Paraná); Lapão e Irecê (Bahia). Embora seja uma hortaliça que produza melhor em áreas de clima ameno, nos últimos anos, devido ao desenvolvimento de cultivares tolerantes ao calor e com resistência às principais doenças de folhagem, principalmente a queima das folhas, o plantio de cenoura vem-se expandindo nos Estados da Bahia e de Goiás (Vieira, 2000).

Resistência a doenças

A ocorrência de doenças é considerada como o fator limitante para a produção de cenoura em épocas chuvosas, em destaque a queima das folhas. Os materiais de inverno representados principalmente pelo grupo Nantes (origem francesa) e Forto (origem holandesa) são altamente suscetíveis à doença, no entanto, possuem ótimas características físicas e organolépticas, tendo aceitabilidade pelo consumidor brasileiro. A partir destas características, diversos programas de melhoramento genético desenvolveram cultivares com elevado nível de resistência, possibilitando a produção

em épocas chuvosas, como as cultivares Brasília, Alvorada, Esplanada, Juliana, entre outras (Lopes *et al.*, 2000; Vieira, 2000; Pryor & Strandberg, 2002; Massola Jr, *et al.*, 2005).

Muitos trabalhos têm relatado a eficiência de fungicidas para controle da queima das folhas, porém maiores estudos são necessários para obter informações relacionadas à resistência dos patógenos a estes produtos (Aguilar *et al.*, 1986; Ben-Noon, *et al.*, 2001; Gugino & Abawi, 2005).

Recentemente pesquisas relataram a frequência dos fungos associados à doença na cultura da cenoura no Distrito Federal (Lopes *et al.*, 2000) e em Passo Fundo (Souza *et al.*, 2001), no entanto, poucas são as informações relacionadas à prevalência dos patógenos envolvidos nas principais regiões produtoras. Estes estudos são importantes para programas de melhoramento genético, uma vez que é possível obter dados tanto relacionados ao nível de resistência do material em teste, como do provável agente etiológico envolvido.

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a reação de cultivares de cenoura à queima das folhas, sob condições de campo e casa de vegetação, a prevalência e incidência de patógenos associados à doença, o efeito de fungicidas no crescimento micelial de *A. dauci* *in vitro* e avaliar a diversidade genética de isolados de *A. dauci* a partir de dados de RAPD.

REVISÃO DE LITERATURA

Dentre as doenças da cenoura a queima das folhas tem sido descrita como a principal doença e tem causado danos significativos em todas as regiões produtoras desta hortaliça (Lopes *et al.*, 2000; Pryor & Strandberg, 2002; Massola Jr, *et al.*, 2005).

No Brasil, a queima das folhas é a doença foliar mais importante da cenoura (Massola Jr, *et al.*, 2005), com ocorrência em praticamente todas as regiões onde se cultivam esta hortaliça, principalmente nas épocas mais quentes e úmidas do ano (Henz & Lopes, 2000). É uma doença causada por um complexo etiológico envolvendo dois fungos, *Alternaria dauci* e *Cercospora carotae* e a bactéria *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* (sin. *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*) (Reifschneider, 1980; Reifschneider, 1984), podendo ser encontrados na mesma planta ou lesão (Lopes, 1997). Os sintomas causados são freqüentemente confundidos no campo, necessitando de uma diagnose mais detalhada em laboratório para a confirmação do agente causal (Lopes *et al.*, 2000; Pryor & Strandberg, 2002).

Na maioria das lavouras comerciais do Brasil, tem sido observada principalmente a presença das duas espécies fúngicas (Lopes *et al.* 2000). No Canadá a queima de cercospora freqüentemente causa perdas maiores que *A. dauci* (Raid, 2002). Estudos realizados por Carvalho *et al* (2005) verificaram uma maior incidência de *C. carotae* em lavouras de cultivo orgânico.

Alternaria dauci

A queima das folhas tem como principal agente etiológico o fungo *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko 1944. Este fungo pertence à divisão Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Pleosporales, família *Pleosporaceae* (Rotem, 1994; Simmons, 1995). A doença causada por *Alternaria* foi primeiramente relatada na Alemanha no ano de 1855, quando causou perdas em diversos países do norte da Europa (Pryor & Strandberg, 2002). Na época, o agente causal foi identificado como *Sporidesmium exitiosum* Kühn v. *dauci* Kühn. Entretanto, ao longo de 90 anos, a doença não desempenhou um fator importante na produção Européia (Pryor & Strandberg, 2002).

A reprodução assexuada de *A. dauci* ocorre através de uma grande quantidade de conídios produzidos em conidióforos. Os conídios são elipsóides a clavados, marrom-oliváceo, com 5 a 11 septos transversais e um a vários septos longitudinais. Medem de 12 a 24µm de largura por 50 a 100µm de comprimento e possuem um longo apêndice terminal septado, freqüentemente medindo até três vezes o comprimento do corpo do conídio e eventualmente ramificado. Os conídios normalmente são produzidos individualmente no conidióforo ou, muito raramente, em cadeia de dois (Pryor & Strandberg, 2002; Massola Jr, *et al.*, 2005). A reprodução sexuada de *A. dauci* ainda é desconhecida.

É favorecida por temperaturas entre 16 a 25°C e prolongados períodos alta umidade, sendo que nestas condições as infecções podem ocorrer entre 8 a 12 horas. Os esporos germinam sobre a folha produzindo um ou mais tubos germinativos ramificados que penetram pelos estômatos. O fungo produz muitos esporos sobre os tecidos atacados sendo disseminado pelo vento para plantas vizinhas ou áreas próximas de produção. A liberação dos conídios a partir dos tecidos atacados ocorre pela manhã quando há redução da umidade relativa do ar (Pryor & Strandberg, 2002).

Como o patógeno pode infectar sementes, estas são consideradas a maior fonte de disseminação a longas distâncias e podem contribuir no estabelecimento da doença em novas áreas de cultivo (Maude, 1992). Externamente à semente, podem ser encontrados conídios do fungo, enquanto nos tecidos internos, além dos conídios encontra-se também micélio dormente (Massola Jr, *et al.*, 2005). O fungo sobrevive por vários anos associado às sementes, restos culturais ou conservado, em laboratório, pelo método do papel filtro (Strandberg, 1987).

Os sintomas nas folhas aparecem entre 8 a 10 dias após a infecção (Massola Jr, *et al.*, 2005). Inicia-se nas folhas e nos pecíolos como pequenas lesões necróticas de aspecto encharcado, quase sempre circundado por halos amarelos. Com o crescimento das lesões, os tecidos atacados tornam-se marrom escuro a pretos podendo coalescer e quando cerca de 40% da área foliar for afetada, a folha amarelece e morre. Com grande freqüência as folhas velhas são mais atacadas. Em níveis avançados da doença, em que há a destruição de grande parte das folhas a colheita torna-se difícil causando grandes perdas, principalmente em países em que a colheita é mecanizada (Strandberg, 1977).

O controle da queima das folhas causada por *Alternaria* é bastante difícil, principalmente quando em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença. Este deve iniciar com o uso de sementes livre de patógenos. O tratamento térmico e o uso de fungicidas são métodos utilizados que ajudam a reduzir os níveis de infestação da semente (Maude, 1992).

A medida de controle mais recomendada é o uso de cultivares adaptadas à estação do ano ou que apresentem resistência à doença. Principalmente quando as condições são favoráveis ao desenvolvimento desta. Cultivares como Brasília, Kuroda, Kuronan, Alvorada, Carandaí e Esplanada apresentam um bom nível de resistência, enquanto as cultivares do grupo Nantes são consideradas altamente suscetíveis (Massola Jr, *et al.*, 2005).

Apesar das diversas formas de controle existentes o uso de fungicidas é a primeira estratégia adotada pela maioria dos produtores, no entanto este método de controle é oneroso e nem sempre eficaz. À medida que a planta desenvolve-se ocorre o adensamento foliar e a adequada cobertura nas aplicações torna-se cada vez mais difícil. Além disso, diversos autores relatam que o uso contínuo de fungicida de ação específica, principalmente o iprodione, tem ocasionado o aparecimento de isolados resistentes ao princípio ativo (Fancelli *et al.*, 1991).

Cercospora carotae

A queima das folhas tem como um dos seus agentes causais *Cercospora carotae* (Pass.) Kazn. & Siemaszko (1929). Pertence à divisão Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Capnodiales, família *Mycosphaerellaceae* (Index Fungorum, 2007). Esta espécie é descrita apenas como patógeno de plantas do gênero *Daucus*. Possui micélio septado, hialino à marrom claro com aproximadamente 2 a 4µm de diâmetro. Os conidióforos são retos, não ramificados (cerca de 2 a 3µm de diâmetro) e marrons oliváceos. Surgem das cavidades subestomatais da folha em feixes, sobre um pseudoestroma. Os conídios são formados na extremidade dos conidióforos, são uni ou multisseptados, filiformes, cilíndricos (2,2 a 2,5 µm x 40 a 110 µm) e com coloração hialina à marrom pálido (Raid, 2002; Massola Jr, *et al.*, 2005).

Sementes infectadas, restos culturais e plantas espontâneas do gênero *Daucus* são as primeiras fontes de inóculo. Os conídios podem ser dispersos pelo vento, respingos da chuva, irrigação, equipamentos e máquinas agrícolas. Para que haja infecção, o esporo requer o mínimo de 12 horas de alta umidade (molhamento foliar) e temperaturas entre 20 e 30°C, com ótimo de 28°C. Os primeiros sintomas após o período de incubação surgem dentro de cinco dias em média, com lesões típicas visíveis, aproximadamente, a partir do décimo dia, principalmente nas folhas mais novas (Raid, 2002).

As lesões iniciam-se com pequenos pontos necróticos no limbo foliar, que evoluem aumentando de tamanho e adquirindo uma coloração castanha, podendo ou não ser circundada por um halo amarelo, geralmente com centro claro e acinzentado. Em casos de epidemias severas, as lesões tornam-se grandes e escuras atingindo até a margem foliar, que pode coalescer e causar a queda das folhas, apresentando sintomas similares à queima por *A. dauci* e *X. hortorum* pv. *carotae*. Podem também ocorrer lesões alongadas e escuras, elípticas no pecíolo das folhas. A doença tem sido descrita como mais severa em folhas novas, geralmente precedendo a queima causada por *A. dauci* que ocorre principalmente no final do ciclo da cultura (Raid, 2002).

Durante períodos de alta umidade, as lesões podem apresentar-se com coloração acinzentada, devido à alta produção de esporos do patógeno sobre o tecido necrosado.

Por ser uma doença de difícil controle, a prevenção é dada como a melhor estratégia. A primeira e mais vantajosa é o uso de cultivar resistente. Em termos gerais, não há cultivares de cenoura totalmente resistente a queima das folhas, apenas com diferentes graus de resistência (Raid, 2002).

As cultivares Brasília, Alvorada, Esplanada, entre outras apresentam alta resistência, entretanto não há estudos específicos que comprove ao certo o comportamento das diferentes cultivares e genótipos de cenoura quanto à resistência a cada um dos patógenos individualmente.

Dentro das práticas de manejo, a rotação de cultura e a retirada e destruição de material residual infectado do campo são medidas que contribuem para a redução do inóculo inicial para as próximas plantações. O uso de sementes saudáveis e adequadamente tratadas também é importante para a baixa incidência inicial da doença. Dentre outras medidas, o uso de fungicidas protetores e sistêmicos tem contribuído para o controle de possíveis epidemias da doença (Raid, 2002; Massola Jr, *et al.*, 2005).

Xanthomonas hortorum* pv. *carotae

A queima das folhas ou crestamento bacteriano também é causada pela bactéria *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*, descrita pela primeira vez por Kendrick em 1934 (sin. *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*) e reclassificado em 1995 por Vauterin, Hoste, Kersters & Swings. Foi relatada pela primeira vez no Brasil por Takatsu & Reifschneider (1980) em diversos campos de produção de cenoura do Distrito Federal.

Caracteriza-se por ser uma bactéria gram negativa, com forma de bastonetes simples medindo de 1,5 a 2,4 x 0,5 a 0,8µm e com um único flagelo polar. As colônias variam entre as colorações amarelo-limão a amarelo-laranja (presença de xantomonadinas), crescendo em meio NDA (Nutriente Dextrose Ágar), por 72 horas à 28°C, de 2 a 5 mm, mucóides (goma xantana), circulares, convexas altas e com bordos inteiros (Reischneider *et al.*, 1984).

Esta bactéria é encontrada comumente em sementes, tanto externa como internamente, consistindo em uma importante fonte de inóculo primário e eficiente disseminador a longas distâncias. Tem sido comumente encontrado em lesões com *A. dauci* e/ou *C. carotae* (Reischneider, 1980).

As sementes infectadas pela bactéria podem ter sua germinação comprometida. Segundo Baker (1972) pouco se conhece sobre o nível de contaminação das sementes e que aparentemente a bactéria penetra nos cotilédones através dos estômatos durante a germinação. Em estudos realizados por Umesh *et al.* (1998) em ambiente árido da Califórnia, detectaram que níveis moderados a altos (quantidades maiores que 10⁴ UFC/g de semente) de contaminação são necessários para que haja sintoma em campos irrigados e que para que uma epidemia se desenvolva é necessário uma alta contaminação (10⁷ UFC/g de semente).

As condições ambientais favoráveis para a ocorrência da doença são temperaturas entre 25 a 30°C e chuvas frequentes ou irrigação por aspersão. A bactéria sobrevive no solo, em restos de culturas e plantas espontâneas da hospedeira. Infecta naturalmente cenoura e coentro e tem sido encontrada também em mais de sessenta espécies de umbelíferas (Massola Jr *et al.*, 2005).

A bactéria pode infectar as raízes, folhas, hastes, umbelas e sementes (Gilbertson, 2002). Os sintomas iniciam-se no limbo foliar como pequenas manchas amarelas com contornos angulares. Quando em condições favoráveis, as lesões tornam-se maiores, irregulares e escurecidas, com aspecto encharcado, geralmente nas extremidades dos folíolos, frequentemente em forma de “V”, conferindo um aspecto de

queima das folhas. Nos pecíolos, as lesões se alongavam até 3 a 4 cm de comprimento, tornando-se escuras e ficando limitadas pelas nervuras (Reischneider *et al.*, 1984).

Quebra de hastes florais e decréscimos de até 80% na altura destas são observados em plantas severamente atacadas. As lesões associadas às hastes florais podem atingir as umbelas ocasionando a formação de pequenas inflorescências e até aborto de flores (Gilbertson, 2002; Massola Jr, *et al.*, 2005).

O controle da queima das folhas causada pela bactéria envolve medidas integradas, iniciando-se pela utilização de sementes de boa qualidade. Sementes produzidas em áreas de baixa precipitação e sem irrigação por aspersão ajudam a evitar sua contaminação e proliferação. Diversos autores sugerem o tratamento térmico para sementes contaminadas com a bactéria, com imersão em água a 52°C por 25 minutos, para reduzir o percentual de contaminação (Ark *et al.*, 1944; Reischneider *et al.*, 1984; Gilbertson, 2002; Massola Jr, *et al.*, 2005). A aplicação de fungicida-bactericida cúprico auxilia na redução da doença no campo, particularmente quando as aplicações iniciam-se ainda nas plantas novas. A rotação de 2 a 3 anos da cultura, remoção ou incorporação dos restos de cultivo reduzem o inóculo presente no solo (Gilbertson, 2002).

Além das medidas preventivas adotadas, o rápido diagnóstico do agente etiológico envolvido é de extrema importância, visto que, a medida ideal poderá ser adotada somente após sua confirmação. O método de diagnose convencional é geralmente demorado, uma vez que diversos testes deverão ser realizados, inclusive o cumprimento do Postulado de Koch (Ark *et al.*, 1944; Reischneider *et al.*, 1984; Gilbertson, 2002; Massola Jr, *et al.*, 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, J.A.E.; REISCHNEIDER, F. J. B.; ROSSO, P.F.E.; DELLA VECCHIA, P.T. Nível de resistência de cenoura a *Alternaria dauci* e interação com tratamento químico. Horticultura Brasileira, 4: 19-22. 1986.

ARK, P. A., AND GARDNER, M. W. Carrot bacterial blight as it affects the roots. Phytopathology, 34: 416-420. 1944.

BAKER, K. F. Seed pathology. In: Seed Biology. T. T. KOZLOWSKI, Academic Press, N.Y., p. 318- 416. 1972.

BEN-NOON, E., SHTIENBERG, D., SHLEVIN, E., VINTAL, H., AND DINOOR, A. Optimization of chemical suppression of *Alternaria dauci*, the causal agent of *Alternaria* leaf blight in carrots. Plant Disease. 85: 1149-1156. 2001.

CARVALHO, A.M.; JUNQUEIRA, A.M.R.; VIEIRA, J.V.; REIS, A.; SILVA, J.B.C. Produtividade, florescimento prematuro e queima-das-folhas em cenoura cultivada em sistema orgânico e convencional. Horticultura Brasileira, 23: 250-254. 2005.

FANCELLI, M. I., AND KIMATI, H. Occurrence of iprodione resistant strains of *Alternaria dauci*. Summa. Phytopathologica, 17: 135-146. 1991.

FAOSTAT database results. Disponível em: <<http://www.apps.fao.org>>, acessado em: 10/10/2007

GILBERTSON, R. L. Bacterial leaf blight of carrot. In: Compendium of Umbelliferous Crop Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. p. 11-12. 2002.

GUGINO, B. & ABAWI, G. Carrot leaf blight: current management options and fungicide update. Department of Plant Pathology, NYSAES, Cornell University. 2005. Disponível em: <www.nysipm.cornell.edu/factsheets/vegetables/misc/clb.pdf>

HENZ, G.P.; LOPES, C.A. Doenças das apiáceas. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (eds.). Controle de Doenças de Plantas – Hortaliças. Viçosa: UFV, 2: 445-522. 2000.

INDEX FUNGORUM Disponível em: <www.indexfungorum.org>, Acessado em: 18/10/2007.

KENDRICK, J.B. Bacterial blight of carrot. Journal of Agricultural Research, 49: 493–510. 1934.

LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. & CHARCHAR, J.M. Principais doenças e controle. In: Vieira, J.V.; Pessoa, H.B.S.V. & Makishima, N. (Eds.) Cultivo da cenoura. Brasília. Embrapa Hortaliças. Instruções técnicas, 13: 14-16. 1997.

LOPES, C.A.; RITSCHER, P.S.; VIEIRA, J.V.; LIMA, D.B. Comportamento de genótipos de cenoura para verão em localidades com diferentes etiologias de queimadas-folhas. Horticultura Brasileira, 18: 119-122. 2000.

MASSOLA Jr., N.S.; MARTINS, M.C.; GLORIA, R. & JESUS Jr., W.C. Doenças da cenoura. In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. & Resende, J.A.M. (Eds) Manual de Fitopatologia v.2: Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo. Ed. Agr. Ceres, p. 223-229. 2005.

MAUDE, R. B. Strategies for control of seed-borne *Alternaria dauci* leaf blight of carrots in priming and process engineering systems. Plant Pathology, 41: 204-214. 1992.

PRYOR, B. M. & STRANDBERG, J. O. *Alternaria* leaf blight of carrot. In: Compendium of Umbelliferous Crop Diseases. The American Phytopathological Society, APS PRESS, p. 15-16. 2002.

RAID, R. N. *Cercospora* leaf blight of carrot. In: Compendium of Umbelliferous Crop Diseases. The American Phytopathological Society, APS PRESS, p. 18. 2002.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; TAKATSU, A. LOPES, C.A. Crestamento bacteriano da cenoura causada por *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* no Distrito Federal. Fitopatologia Brasileira, 9: 189-192. 1984.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; Queima das folhas de cenoura, um complexo patológico. Fitopatologia Brasileira, 5: 445-446. 1980.

ROTEM, J. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 1994.

RUBATSKY, V. E., QUIROS, C. F., AND SIMON, P.W. Carrots and Related Vegetable Umbelliferae. CABI Publishing, New York, 1999.

SAUNDERS C., RAMALHO R.A., LEAL M.C. Estado nutricional de vitamina A no grupo materno-infantil. Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil, 1: 9-12. 2001.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* themes and variations (112-144). Mycotaxon 55: 55-163. 1995.

SOUZA, R.T.; FORCELINI, C.A.; REIS, E.M. & CALVETE, E.O. Frequência de *Alternaria dauci* e *Cercospora carotae* como agentes da queima das folhas da cenoura em Passo Fundo, RS. Fitopatologia Brasileira, 26: 614-618. 2001.

STRANDBERG, J. O. Isolation, storage, and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. Phytopathology, 77: 1008-1012. 1987.

STRANDBERG, J.O Spore production and dispersal of *Alternaria dauci*. Phytopathology, 76: 1262-1266. 1977.

TAKATSU, A. & REIFSCHNEIDER, F. J. B. Ocorrência de crestamento bacteriano de cenoura (*Daucus carota* L.) no Distrito Federal. Fitopatologia Brasileira, 5: 461-462. 1980.

UMESH, K. C., DAVIS, R. M., AND GILBERTSON, R. L. Seed contamination thresholds for development of carrot bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*. Plant Disease, 82: 1271-1275. 1998.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology, 45: 472– 489. 1995.

VIEIRA, J. V.; MAKISHIMA, N. & COLABORADORES O cultivo da cenoura. Sistemas de produção, 2, CNPH - Embrapa Hortaliças, 2000. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cenoura/autores.htm>>. Acessado em: 5/10/2007.

CAPÍTULO 1

Reação de cultivares de cenoura a queima das folhas e prevalência e incidência dos patógenos associados à doença.

RESUMO

Reação de cultivares de cenoura a queima das folhas e prevalência e incidência dos patógenos associados à doença.

Instalou-se dois experimentos visando avaliar a resistência de cultivares de cenoura à queima das folhas em campo e casa de vegetação, e avaliou-se a prevalência e incidência dos patógenos causadores da doença em amostras de campos de produção das regiões de São Gotardo–MG, Irecê–BA e Distrito Federal–DF entre Dezembro/2006 à Dezembro/2007. O experimento de campo constou de 13 cultivares, em delineamento em blocos casualizados com três repetições. Foram realizadas três avaliações semanais a partir do 90º dia após o semeio. A avaliação de casa de vegetação foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado com 14 cultivares e quatro repetições. Plântulas com 30 dias foram inoculadas com 5×10^3 conídios/mL de *Alternaria dauci* e avaliadas semanalmente a partir do 13º dia após a inoculação. Para a avaliação de campo e casa de vegetação foi utilizada uma escala de notas que variou de 1 a 5 onde 1 representou ausência de doenças e 5 queima total das folhas. Na análise etiológica lesões típicas da doença, em folhas, foram analisadas em microscópio óptico quanto ao agente etiológico envolvido. Em campo, verificou-se que as cultivares Brasília (Embrapa), Karine F₁, Londrina e Esplanada apresentaram elevada resistência à doença, enquanto Forto Nantes e Bangor F₁ foram suscetíveis. Em casa de vegetação as cultivares Brasília importada, Karine F₁, Bangor F₁ e Juliana F₁ apresentaram-se resistentes e Brazlândia, Londrina, Brasília, Carandaí, Forto Nantes, AF-1641, Esplanada, Alvorada, Verão HT e AF-750 foram suscetíveis. Na análise etiológica verificou-se presença de *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* apenas no primeiro ano com grande incidência em São Gotardo. *Cercospora carotae* ocorreu com grande frequência nas lavouras orgânicas do Distrito Federal nos dois períodos avaliados. *Alternaria dauci* foi o patógeno que ocorreu com maior frequência nas lavouras avaliadas, sendo o mais comum agente causal da doença no campo durante todo o ano.

Palavras chaves: *Alternaria dauci*, *Cercospora carotae*, *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*

ABSTRACT

Reaction of carrot cultivars to leaf blight and prevalence and incidence of pathogens that causes the disease.

Two experiments were carried out aiming to evaluate the resistance of carrot varieties to leaf blight in greenhouse and field conditions. It was also evaluate the prevalence and incidence of pathogens that causes the disease in samples of production fields in the regions of São Gotardo–MG, Irecê–BA and Distrito Federal–DF between December/2006 to December/2007. The field experiment consisted of thirteen varieties, in randomized block design with three replications. Three evaluations were conducted weekly from the 90th day after planting. The greenhouse assessment was conducted in a entirely randomized design with fourteen varieties and four repetitions. Seedlings with 30 days were inoculated with 5×10^3 conidia/mL of *Alternaria dauci* and evaluated each week from 13th day after inoculation. For the field evaluation and greenhouse it was used a scale of notes that ranged from 1 to 5, where 1 represents absence of disease and 5 total blighting of leaves. In etiological analysis typical lesions of the disease in leaves were analyzed in optical microscope looking for the etiological agent involved. In the field, it was found that the cultivars Brasília (Embrapa), Karine F1, Londrina and Esplanada showed high resistance to the disease, while Forto Nantes and Bangor F1 were susceptible. In the greenhouse the cultivars Brasília (imported), Karine F1, Bangor F1 and Juliana F1 showed up resistant and Brazlândia, Londrina, Brasília, Carandaí, Forto Nantes, AF-1641, Esplanada, Alvorada, Verão HT and AF-750 were susceptible. In etiological analysis it was verified the presence of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* only in the first year with great incidence in São Gotardo. *Cercospora carotae* occurred with hight frequency in Distrito Federal organic crops in both evaluated periods. *Alternaria dauci* was the pathogen that occurred more frequently in crops evaluated and is the greater causal agent of the disease in the field throughout the year.

Key words: Leaf blight, resistance, prevalence.

INTRODUÇÃO

A cenoura (*Daucus carotae*) é muito sensível às condições ambientais, o que determina a recomendação do genótipo de acordo com o local e época de cultivo. As cultivares importadas são recomendadas para o plantio de outono-inverno, são em sua maioria de origem européia e representadas principalmente pelo grupo Nantes (origem francesa) e Forto (origem holandesa). Apresentam raízes longas, cilíndricas, de excelente aspecto, coloração e sabor. Caracterizam-se por serem altamente suscetíveis a doenças. As cultivares nacionais são recomendadas para o cultivo de verão por apresentarem boa resistência a doenças, incluindo a queima das folhas (Cardoso & Della Vecchia, 1995; Carvalho *et al*, 2005).

O melhoramento genético de cenoura no Brasil iniciou-se a partir da década de 50 na ESALQ-USP, visando desenvolver cultivares adaptadas às condições edafoclimáticas brasileiras. Segundo Vieira & Casali (1984) o objetivo principal no melhoramento é aumentar a frequência de alelos desejáveis e criar condições para a obtenção de populações superiores. Desde então diversas cultivares com diferentes graus de resistência foram desenvolvidas, como: Tropical (ESALQ/USP,1974), Brasília (Embrapa Hortaliças,1981), Kuronan (Embrapa Hortaliças e a ESALQ-USP, 1983), Alvorada (Embrapa Hortaliças, 2000), Esplanada (Embrapa Hortaliças, 2005). Muitos trabalhos têm sido realizados com intuito de selecionar cultivares quanto a resistência à queima das folhas no verão (Sonnenberg *et al*, 1979; Muniz *et al*, 1984; Aguilar *et al*, 1986, Juliatti *et al*, 1987; Muniz *et al*, 1988; Lopes *et al*, 2000; Brito *et al*,1997; Oliveira Filho, 1990; Reis & Vieira, 2006).

Levantamentos fitopatológicos têm como objetivos fornecer informações sobre a importância relativa das doenças, monitorar flutuações nas suas intensidades e verificar a eficiência e aceitação de práticas recomendadas de controle (King, 1980), constituindo-se, desta forma, num importante instrumento para o desenvolvimento de programas de manejo integrado de doenças (Campbell & Madden, 1990).

A cultura da cenoura tem como principal doença a queima das folhas, causada pelo complexo fitopatológico *Alternaria dauci*, *Cercospora carotae* e *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*. Lopes (2000) verificou que nas diferentes regiões produtoras desta cultura houve prevalência das duas espécies fúngicas, onde em alguns locais prevaleceu *A. dauci* e em outras *C. carotae* e há ainda regiões em que as duas aparecem em frequência semelhante, podendo variar de um ano para outro. Segundo Lopes *et al*, (2000) a avaliação final dos materiais dos programas de melhoramento genético deve

ser realizada em várias regiões, com diferentes condições edafoclimáticas e frequências dos patógenos. Esta avaliação tem sido realizada geralmente, em condições de campo, onde não se sabe ao certo a composição dos patógenos envolvidos. Neste caso não é possível identificar, individualmente, o nível de resistência do material.

Recentemente, Carvalho *et al* (2005) verificaram maior prevalência de *A. dauci* em relação à *C. carotae* em lavouras convencionais e maior ocorrência de *C. carotae* em lavouras de cultivo orgânico. Avaliações em amostras de folhas de cenoura do Distrito Federal, Reifschneider *et al* (1984) verificaram ocorrência de fluxo bacteriano, identificada como *X. hortorum* pv. *carotae*. Lopes *et al.* (2000) em análise de prevalência de patógeno da doença verificaram a presença da bactéria em quase todas as lavouras, sempre com incidência menor que as espécies fúngicas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de cultivares de cenoura à queima das folhas sob condições de campo e casa de vegetação e analisar a prevalência e incidência dos patógenos associados à doença nesta cultura, em três regiões produtoras do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados na Embrapa Hortaliças (CNPQ) entre os períodos de novembro de 2007 a janeiro de 2008. Foram realizados dois ensaios, um em casa de vegetação e outro em campo, com 14 cultivares comerciais, de inverno e de verão (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Relação das cultivares de cenoura utilizadas nas avaliações de resistência à queima das folhas em campo e casa de vegetação.

Nº	Variedades	Empresa
1	Carandaí	Embrapa
2	Verão HT	Hortec
3	Brasília	Embrapa
4	AF - 750	Sakata
5	Alvorada	Embrapa
6	Esplanada	Embrapa
7	Brazlândia	Embrapa
8	Híbrida AF - 1641	Sakata
9	Brasília Importada	Agristar
10	Karine	Agristar
11	Londrina	<i>Landrace</i>
12	Forto nantes	Seminis
13	Bangor F1	Carota Bejo
14	Juliana	Seminis

Seleção em casa de vegetação

Obtenção das plantas

Sementes das cultivares de cenoura foram separadas, tratadas com fungicidas, identificadas e semeadas em vasos de três litros de solo esterilizado. Aos vinte e cinco dias após a semeadura, foi realizado o desbaste, de forma a permanecer cinco plantas por vaso de três litros.

Obtenção e preparo do inóculo

Os isolados utilizados foram provenientes de culturas monospóricas da coleção micológica do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças. O protocolo utilizado foi adaptado de Rodrigues (2005). Foram utilizados os isolados EH 590, EH 1058, EH 1683 e EH 1591 provenientes das regiões de Carandaí-MG, Itajaí-SC, São Gotardo-MG, Irecê-BA, respectivamente. Inicialmente foram recuperados em meio

BDA e mantidos em BOD à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h. Após sete dias, fragmentos da borda da colônia foram transferidos para erlenmeyers contendo BD (Batata dextrose) e mantidas no escuro sob agitação constante (110 rpm) por mais sete dias. Em seguida, o micélio produzido foi triturado com o auxílio do triturador ACE Homogenizer Nissei® modelo AM-11S. Da suspensão de fragmentos de micélio em meio de cultura, alíquotas de 15 mL foram retiradas e vertidas em placas de Petri contendo 15 mL do meio V8 (100 mL de suco V8, 1,0g de carbonato de cálcio e 900mL de água destilada) contendo o antibiótico Rifampicina. As placas foram colocadas abertas em BOD à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz branca e 12 horas de luz negra, por cerca de 60 horas. A suspensão de inóculo foi preparada adicionando-se 20 mL de água em cada placa contendo os esporos. Em seguida a superfície das placas foram raspadas, com o auxílio de uma alça de Drigalsky e filtradas em duas camadas de gaze. A contagem de conídios foi feita utilizando-se um hemacitômetro (câmara de Neubauer). A concentração da suspensão foi ajustada para 5×10^3 conídios/mL e foi feita a partir da mistura dos isolados.

Inoculação

Imediatamente após o preparo da suspensão, plantas de cenoura com 30 dias após a semeadura foram pulverizadas com o inóculo sobre as folhas até o ponto de escorrimento. Em seguida os vasos foram cobertos com sacos plásticos molhados (câmara úmida), para que ocorresse a infecção, por 24 horas. Diariamente as plantas foram irrigadas, de forma que todas as folhas fossem molhadas igualmente.

Avaliações

A primeira avaliação foi realizada aos 13 dias após a inoculação, quando houve os primeiros sintomas típicos da doença. As leituras foram semanais, até o início da queda das folhas totalizando seis leituras. Para a avaliação foi utilizada uma escala de notas que variou de 1 a 5, modificada de Aguilar *et al* (1986), em que 1 = ausência de sintomas, 2 = percepção de pequenas lesões esparsas, 3 = lesões maiores e mais freqüentes circundadas por halo amarelado, 4 = lesões abundantes seguidas por forte presença de halo amarelado e 5 = lesões por toda a folha, apresentando sinais de senescência. As folhas novas não foram avaliadas, uma vez que houve pouca infecção secundária. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Seleção em campo

O ensaio foi realizado utilizando as mesmas cultivares do teste em casa de vegetação. A semeadura foi realizada no campo experimental da Embrapa Hortaliças,

em área caracterizada por ser utilizada no programa de melhoramento de cenoura com incorporação de restos culturais com inóculo de doenças todos os anos. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com três repetições. Cada repetição foi composta de uma parcela de 1m², onde as cenouras foram semeadas em linhas espaçadas de 15 cm. Trinta dias após o plantio foi realizado o desbaste, mantendo-se 4 cm entre plantas. Não houve inoculação em campo, sendo que a doença foi de ocorrência natural. As avaliações foram realizadas aos 90, 97 e 104 dias após o plantio. Para avaliação foi utilizada a escala de severidade de Aguilar *et al* (1986) com adaptações que consiste em uma escala de notas de 1 a 5, onde: 1 = ausência de doenças; 2 = lesões escassas nas folhas inferiores; 3 = lesões presentes nas folhas inferiores e abundantes nas inferiores; 4 = lesões abundantes nas folhas inferiores e superiores e 5 = maior parte das folhas superiores e maior parte das inferiores mortas.

Análise estatística

A partir das notas obtidas nas avaliações de severidade da doença, obteve-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e então os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (1974), utilizando-se o programa estatístico SisVar v.4.2 (Ferreira, 2003).

Prevalência de patógenos

Folhas de cenoura apresentando sintomas de queima foram coletadas em lavouras comerciais das regiões de São Gotardo-MG, Irecê-BA e Distrito Federal, em dois períodos chuvosos, em Dez/2006 a Jan/2007 e Dez/2007 a Fev/2008 e um período de inverno no Distrito Federal, em Jun/2007 a Ago/2007 e analisadas quanto a prevalência e incidência de infecção por *A. dauci*, *C. carotae* e *X. hortorum* pv. *carotae*. Foram amostradas 10 lavouras em cada período em São Gotardo, Irecê e no Distrito Federal. No Distrito Federal as amostragens constaram de 6 lavouras convencionais e 4 orgânicas. Na análise de inverno, foram analisadas somente amostras das 6 lavouras convencionais. Foram coletadas 50 folhas por lavoura que apresentavam sintoma característico da doença. A metodologia utilizada foi a descrita por Lopes *et al.* (2000). Para a análise etiológica, as folhas foram submetidas à câmara úmida por 24 a 48 horas. A seguir, foram analisadas cinco lesões por folha, cada lesão cortada pela metade, com auxílio de um bisturi previamente esterilizado, colocados em lâminas e examinados em microscópio óptico para determinação de presença de esporos ou estruturas fúngicas e de exsudação de fluxo bacteriano. Foi calculada a prevalência (nº de áreas com o patógeno, dividido pelo número total de áreas amostradas em cada região), incidência

dos patógenos em cada região e sua frequência (em porcentagem) em cada lavoura. Todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação de cultivares

Foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,01$) quanto aos efeitos diretos das cultivares nas avaliações de campo e casa de vegetação, indicando que há diferenças de resistência à doença entre as cultivares testadas. Dados experimentais indicaram baixo coeficiente de variação demonstrando boa precisão experimental (Tabelas A1 e A2 -Anexo).

Na seleção de campo, das 14 cultivares semeadas apenas 13 foram avaliadas, uma vez que a cultivar Brasília importada não apresentou germinação satisfatória.

O teste de Scott Knott permitiu separar as cultivares em quatro níveis de resistência no campo (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 Área abaixo da curva de progresso da queima das folhas em cultivares de cenoura em campo, sob infestação natural, Brasília, 2008.

Variedade	Empresa	Média AACPD*
Esplanada	Embrapa	35,66 a **
Londrina	Landrace	38,66 a
Karine F₁	Agristar	40,00 a
Brasília	Embrapa	41,00 a
Juliana F₁	Seminis	42,00 b
AF 1641	Sakata	44,33 b
Verão HT	Hortec	44,33 b
Brazlândia	Embrapa	44,66 b
Alvorada	Embrapa	45,33 b
Carandaí	Embrapa	46,00 b
AF-750	Sakata	52,66 c
Bangor F₁	Carota Bejo	60,00 d
Forto Nantes	Seminis	63,00 d

* Delineamento em blocos casualizados com três repetições. A AACPD foi calculada a partir da escala de notas de cada leitura realizada semanalmente.

** Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de agrupamento Scott Knott ao nível de significância de 5%.

As cultivares Forto Nantes e Bangor F₁ foram altamente suscetíveis enquanto Brasília (Embrapa), Karine F₁, Londrina e Esplanada foram resistentes. A cultivar AF-

750 apresentou-se como de baixa resistência. As demais cultivares, entre elas o híbrido Juliana F₁, foram classificadas como de resistência intermediária (Tabela 1.2). As cultivares Brasília e Juliana F₁ são consideradas pela literatura como resistentes ou tolerantes à queima das folhas, no entanto, o estudo de prevalência da localidade do experimento, indicou alta incidência de *C. carotae* (Tabela 1.4), o que pode ter influenciado o grau de resistência dessa cultivar, além de outros fatores de manejo e ambientais.

Segundo Lopes *et al* (2000), a cultivar Brasília da Embrapa Hortaliças foi obtida em ambiente que propiciou seleções tanto para *A. dauci* como para os outros agentes causais da doença, *C. carotae* e *X. campestris* pv. *carotae*, permitindo que independente do patógeno associado esta seja classificada como cultivar resistente, o mesmo ocorrendo com as seleções a partir desta cultivar, entre elas a Esplanada. No entanto, a cultivar Alvorada, que também é derivada de Brasília, foi classificada como intermediária. Este tipo de comportamento, onde diversos níveis de resistência são observados indicam que, presumivelmente, a queima das folhas da cenoura é condicionada por vários genes, caracterizando-o como de resistência quantitativa, resultados este que corroboram com Vieira *et al* (1979).

As cultivares Forto Nantes e Bangor F₁ são cultivares de inverno, portanto foram selecionadas na ausência da doença. Como esperado, foram classificadas como suscetíveis à doença neste trabalho (Tabela 1.2). Diversos trabalhos citam que cultivares de inverno são caracteristicamente suscetíveis à queima das folhas (Sonnenberg, *et al*, 1979; Aguilar *et al*, 1986; Muniz *et al*, 1988; Brito *et al*, 1997).

A análise do teste de agrupamento para o experimento realizado em casa de vegetação classificou as cultivares Brasília importada, Karine F₁, Bangor F₁ e Juliana F₁ como as resistentes, com menor AACPD e as demais cultivares como suscetíveis, com maior AACPD (Tabela 1.3).

A cultivar de inverno Bangor F₁, descrita como altamente suscetível, foi classificada como resistente, e Alvorada, Esplanada, Carandaí e Brasília que são descritas como resistentes, classificaram-se como suscetíveis (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 Área abaixo da curva de progresso da queima das folhas em cultivares de cenoura em casa de vegetação, em parcelas inoculadas com *Alternaria dauci*, Brasília, 2008.

Variedade	Empresa	Média AACPD*
Brasília importada	Agristar	65,00 a**
Karine F₁	Agristar	77,25 a
Juliana F₁	Seminis	80,75 a
Bangor F₁	Carota Bejo	80,75 a
Brazlândia	Embrapa	87,75 b
Londrina	Landrace	89,00 b
Brasília	Embrapa	90,50 b
Carandaí	Embrapa	91,00 b
Forto Nantes	Seminis	92,50 b
AF 1641	Sakata	96,50 b
Esplanada	Embrapa	97,25 b
Alvorada	Embrapa	102,00 b
Verão HT	Hortec	104,00 b
AF-750	Sakata	108,00 b

* Delineamento em parcelas inteiramente casualizadas com quatro repetições. A AACPD foi calculada a partir da escala de notas de cada leitura realizada semanalmente.

** Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de significância de 5%.

Resultados estes que diferem completamente dos obtidos nos experimentos de campo. Entre as possíveis causas da divergência de resultados podemos citar as seguintes diferenças nas avaliações com outros ensaios citados na literatura: a) a concentração do inóculo inicial; b) o tempo de câmara úmida para que a infecção pudesse ocorrer e o tempo de molhamento foliar, podem ter sido insuficientes para que a infecção secundária ocorresse efetivamente, apesar de a literatura indicar um período de incubação de cinco a sete horas de molhamento foliar em temperatura entre 20 a 28°C, inferiores aos aplicados no experimento (Gillespie & Sutton, 1979 citados por Souza *et al*, 2001); c) as diferentes condições climáticas; d) as diferenças de manejo do ambiente e da água entre outros.

Estudo anterior em casa de vegetação já relatava a dificuldade de realização de seleção de genótipos de cenoura quanto à queima das folhas em telado (Reis, 2006). No entanto, Pawelec *et al.* (2006) avaliaram métodos rápidos de seleção de genótipos de

cenoura quanto à resistência à queima de alternária sob condição controlada e verificaram que é possível fazer a avaliação para resistência à doença em casa de vegetação. Portanto estudos mais detalhados e adaptações no protocolo devem ser realizados com o intuito de obter resultados para classificação de cultivares resistentes de cenoura sob condições de casa de vegetação.

A obtenção de um protocolo que funcione para as nossas condições permitirá que um maior número de materiais sejam previamente selecionados de maneira rápida, fácil e em espaço reduzido e depois confirmados em campo. Além disso, os testes podem ser feitos em todas as estações do ano, principalmente quando se tem disponibilidade de uma casa de vegetação com temperatura e umidade controladas.

Prevalência de Patógenos

De acordo com a análise etiológica, verificou-se que *A. dauci* esteve presente em todas as lavouras avaliadas e em todos os períodos, em menor ou maior proporção, que variou de 35,87% a 100% de incidência. Resultados similares foram encontrados por Lopes *et al* (2000) e Souza *et al* (2001). *Cercospora carotae* foi observada, respectivamente, no ano de 2006 em 44,4%; 72,7% e 66,7% nas lavouras de São Gotardo, Irecê e Distrito Federal. Em 2007 o fungo foi encontrado em 11,11% das lavouras de Irecê e 75% no Distrito Federal. Em 2007, não foi observada a presença deste fungo em São Gotardo.

A bactéria *X. hortorum* pv. *carotae* foi encontrada em todas as lavouras de São Gotardo, 81,81% em Irecê e 83,33% das lavouras do Distrito Federal no ano de 2006 e não foram verificadas nas amostras do ano de 2007 (Tabela 1.4). A baixa precipitação até o período de coleta do material em 2007 pode ter influenciado na infecção ou disseminação deste patógeno no campo.

Quanto à incidência dos fungos nas lavouras, verificou-se elevado índice de *A. dauci*, variando de 49% em São Gotardo à 97,5% no Distrito Federal no ano de 2006 e 69,47% no Distrito Federal à 100% em São Gotardo no ano de 2007 (Figuras 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4). Estes dados confirmam trabalhos realizados por Carvalho, *et al* (2005), Lopes *et al*. (2000) e Souza *et al* (2001), que verificaram maiores incidências de *A. dauci* associadas à queima das folhas da cenoura. Nas amostras da primeira avaliação provenientes de São Gotardo proporções similares de *A. dauci* e *X. hortorum* pv. *carotae* foram observadas (Figura 1.1). O plantio altamente adensado e maior tempo de irrigação provavelmente proporcionaram a formação de um clima que favoreceu o

aumento e disseminação da bactéria, que necessita de altas temperaturas e umidade para desenvolver, o mesmo não foi observado no verão de 2007, em que houve baixa precipitação até o período avaliado.

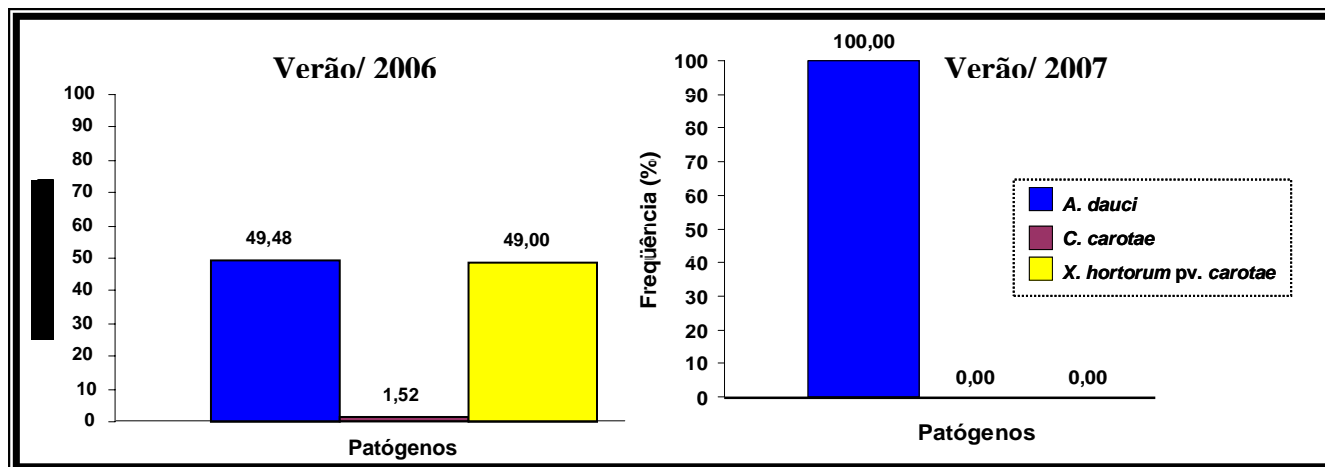


Figura 1.1 Incidência de *Alternaria dauci*, *Cercospora carotae* e *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* em São Gotardo, em dois anos.

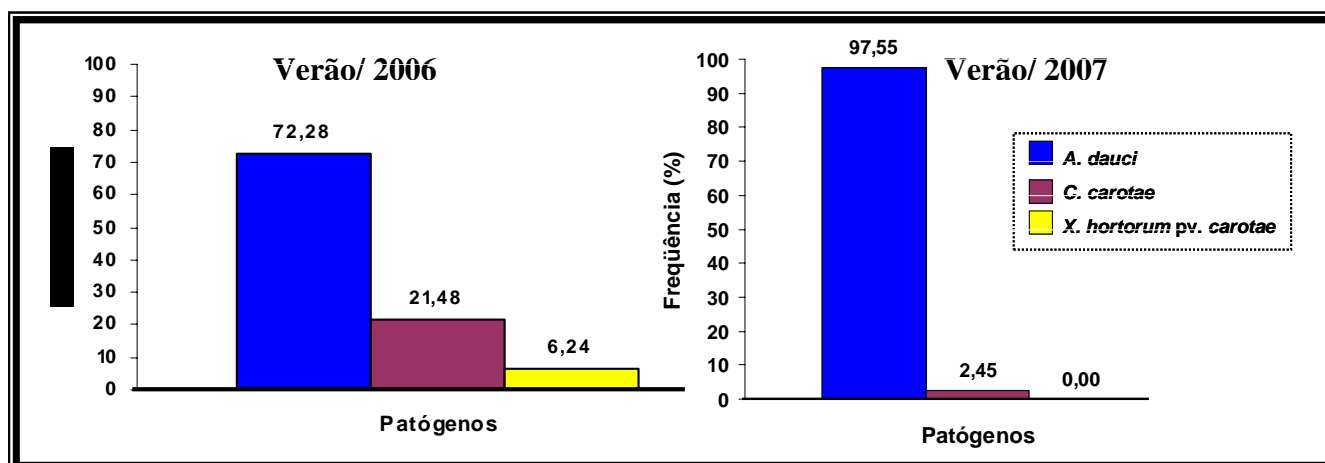


Figura 1.2 Incidência de *Alternaria dauci*, *Cercospora carotae* e *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* em Irecê em dois anos.

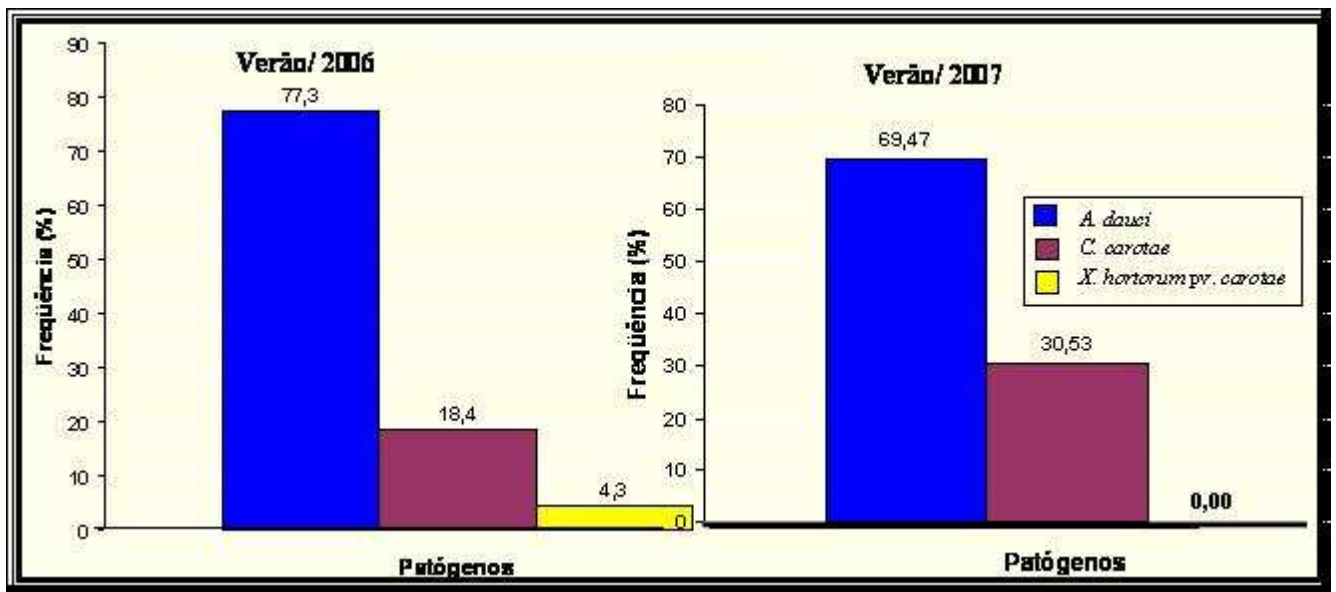


Figura 1.3 Incidência de *Alternaria dauci*, *Cercospora carotae* e *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* em lavouras convencionais do Distrito Federal e entorno do DF, em dois anos.

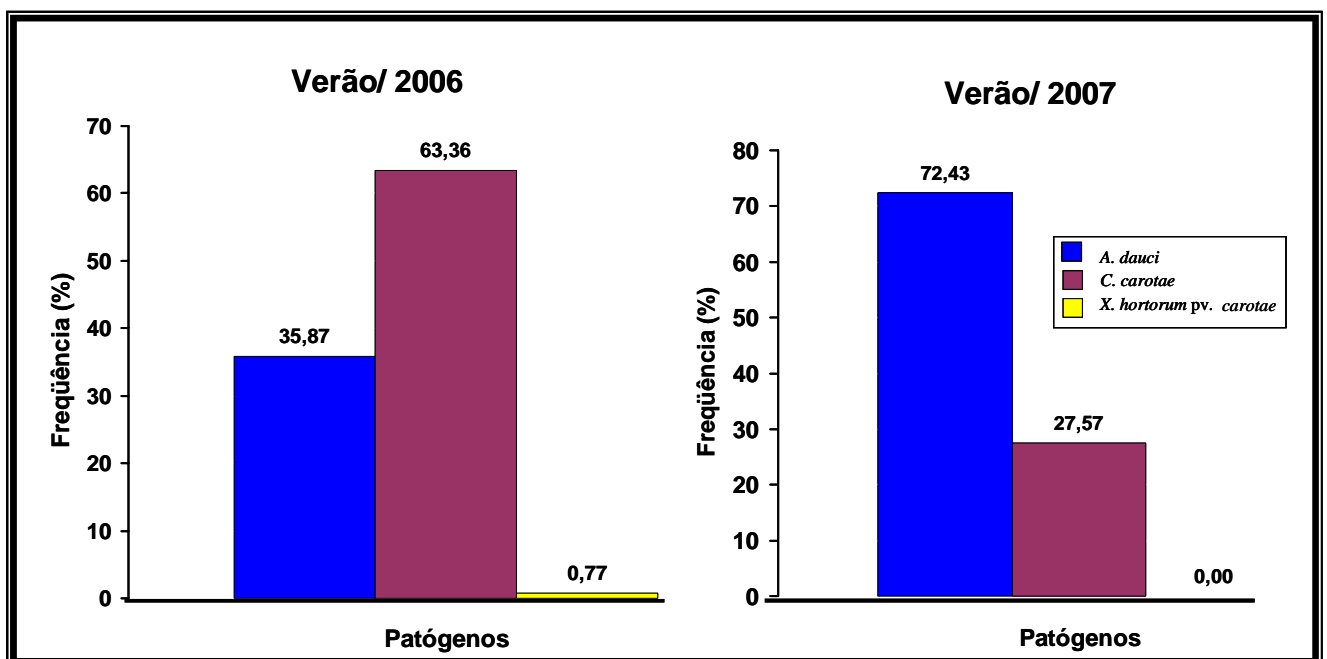


Figura 1.4 Incidência de *Alternaria dauci*, *Cercospora carotae* e *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* em lavouras orgânicas do Distrito Federal e entorno do DF, em dois anos.

No Distrito Federal de *C. carotae* foi observado em todas as lavouras convencionais e orgânicas nos dois anos avaliados (Figura 1.3 e 1.4). Nas lavouras orgânicas, níveis elevados deste fungo foram encontrados no ano de 2006, reflexo da presença do patógeno e das condições ideais para a doença neste ano. Nas amostras de campo do CNPH em 2007, houve prevalência de *C. carotae* sobre *A. dauci* com cerca

de 90% de incidência (dados não mostrados). Apesar de ser uma lavoura de plantio convencional, durante o período de cultivo, não houve qualquer tratamento químico no local. Este resultado está em concordância com Carvalho *et al* (2005) que observaram que em cultivos orgânicos da região de Brazlândia houve prevalência de *C. carotae* e baixa incidência no cultivo convencional, o que supõe que as constantes aplicações de fungicidas tenham sido eficientes contra o patógeno, mesmo não agindo eficientemente sobre *A. dauci*. A presença de *C. carotae* foi também observada em Irecê e São Gotardo, porém em menores proporções (Figuras 1.1 e 1.2). Em São Gotardo e lavouras convencionais do Distrito Federal a baixa incidência de *C. carotae* nos dois anos avaliados pode ser decorrente da aplicação contínua e freqüente de fungicidas, que indica que o fungo seja mais sensível ao fungicida do que *A. dauci*, uma vez que esteve presente em grandes proporções apenas em lavouras orgânicas ou nas que não foram tratadas quimicamente. Em Irecê, aplicações de fungicidas são raras, indicando que a proliferação de *C. carotae* pode estar relacionada tanto a fungicidas como ao clima. Segundo Souza *et al* (2001) *C. carotae* é um fungo muito mais exigente em requerimentos climáticos que *A. dauci*. As infecções por *A. dauci* requerem apenas cinco a sete horas de molhamento contínuo a 20-28°C e *C. carotae* necessita de mais de 24 horas nestas mesmas condições (Gillespie & Sutton, 1979 citados por Souza *et al*, 2001). Portanto, devido ao aspecto climático local, de baixa umidade e precipitação anual o fungo, possivelmente não encontrou condições ideais para infecção, visto que o molhamento foliar pode ser facilmente controlado através da irrigação.

Na análise de inverno, todas as amostras apresentavam poucas lesões características e foi detectada somente *A. dauci* como o agente causal da doença, independente da cultivar.

As regiões de cultivo mais intenso caracterizam-se por possuírem elevada pressão de inóculo dos patógenos e que em condições ideais infectam as plantas e causam as doenças. Na região de Irecê, informações fornecidas por produtores relatam a prática de remoção de restos culturais, importante aspecto na redução do inóculo inicial que aliada à baixa umidade local, propicia menores riscos a prejuízos ocasionados pela doença, o que implica em boa produtividade durante todo o ano, menores custos e conseqüentemente maior competitividade no mercado.

A identificação dos patógenos envolvidos com a queima das folhas em uma determinada região é necessária para definir a melhor estratégia de controle da doença.

Além disso, permite aos melhoristas selecionar novas cultivares, indicando o nível de resistência à doença e a cada patógeno envolvido.

A detecção de alta frequência de bactérias em uma lavoura, como observado em São Gotardo no ano de 2006, indica que o controle deve ser feito utilizando-se produtos à base de cobre preventivamente, e os antibióticos curativamente, com efeito satisfatório e menores custos quando comparados aos utilizado para fungos, além disso, outros fungicidas não têm efeito sobre a bactéria.

Tabela 1.4 Prevalência de patógenos causadores da queima das folhas em São Gotardo, Irecê e Distrito Federal e entorno do DF durante duas estações chuvosas, Brasília, 2008.

Local	Patógeno	Verão/ 2006 (%)	Verão/ 2007 (%)
São Gotardo	<i>Alternaria dauci</i>	100	100
	<i>Cercospora carotae</i>	44,44	0
	<i>X. hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	100	0
Irecê	<i>Alternaria dauci</i>	100	100
	<i>Cercospora carotae</i>	72,72	11,11
	<i>X. hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	81,81	0
Distrito Federal e entorno do DF	<i>Alternaria dauci</i>	100	100
	<i>Cercospora carotae</i>	66,66	75
	<i>X. hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	83,33	0

CONCLUSÕES

- Sob condições de campo, as cultivares Brasília, Karine F₁, Londrina e Esplanada apresentaram elevada resistência a queima das folhas; Juliana F₁, AF 1641, Verão HT, Brazlândia, Alvorada e Carandaí mostraram resistência intermediária; a AF 750 baixa resistência e Forto Nantes e Bangor F₁ foram suscetíveis;

- Sob condições de casa de vegetação, as cultivares Brasília importada, Karine F₁, Bangor F₁ e Juliana F₁ apresentaram-se resistentes e Brazlândia, Londrina, Brasília, Carandaí, Forto Nantes, AF-1641, Esplanada, Alvorada, Verão HT e AF-750 como suscetíveis, porém, o protocolo utilizado não permitiu avaliar cultivares de cenoura, quanto a queima das folhas em condições de casa de vegetação, com precisão.

- *Alternaria dauci* foi o patógeno que ocorreu com maior frequência nas lavouras avaliadas de São Gotardo, Irecê e Distrito Federal e entorno, sendo o agente causal da doença mais comum no campo durante todo o ano;

- *Cercospora carotae* ocorreu com grande frequência em lavouras orgânicas do Distrito Federal nos períodos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, J.A.E.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; ROSSI, P.F.E.; DELLA VECCHIA, P.T. Nível de resistência de cenoura a *Alternaria dauci* e interação com tratamento químico. Horticultura Brasileira, 4:19-22. 1986.

BRITO, C.H.; POZZA, E.A.; JULIATTI, F.C.; LUZ, J.M.Q.; PAES, J.M.V. Resistência de cultivares de cenoura (*Daucus carota* L.) à queima das folhas durante o verão. Revista Ceres, 44: 371-379. 1997.

CAMPBELL C.L.; MADDEN L.V. Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York: John Wiley, p. 532. 1990.

CARDOSO, A.I.I.; VECCHIA, P. T. D. . Considerações sobre o florescimento prematuro e suas implicações para o melhoramento de cenoura para primavera. Horticultura Brasileira, 13: 146-149. 1995.

CARVALHO, A.M.; JUNQUEIRA, A.M.R.; VIEIRA, J.V.; REIS, A.; SILVA, J.B.C. Produtividade, florescimento prematuro e queima-das-folhas em cenoura cultivada em sistema orgânico e convencional. Horticultura Brasileira, 23: 250-254. 2005.

FERREIRA, D.F. Sisvar versão 4.2. DEX/UFLA. 2003.

JULIATTI, F.C.; REGHIN, M.Y.; BUENO, J.T.; CANDIOTO, W. Comportamento de cultivares de cenoura e resistência à queima das folhas na semeadura de outubro em Bandeirantes, PR. Fitopatologia Brasileira, 12: 133. 1987.

KING, J.E. Cereal survey methodology in England and Wales. In: TENG, P.S.; KRUPA, S.V. (eds). Crop loss assessment which constrain production and crop improvement in agriculture and forestry. Minnesota: University of Minnesota, p. 124-133.1980.

LOPES, C.A.; RITSCHER, P.S.; VIEIRA, J.V.; LIMA, D.B. Comportamento de genótipos de cenoura para verão em localidades com diferentes etiologias da queima-das-folhas. Horticultura Brasileira, 18: 119-122. 2000.

MUNIZ, J.O.L.; MAGALHÃES, C.A. Resistência de cultivares de cenoura (*Daucus carota* L.) à queima das folhas em Guaramiranga – Ceará. Fortaleza: EPACE, 12p.1984.

MUNIZ, J.O.L.; PONTE, J.J. Resistência de cultivares de cenoura à queima das folhas na Serra de Baturité, Estado do Ceará (Brasil). Fitopatologia Brasileira, 13: 48-51. 1988.

OLIVEIRA FILHO, G.M.; JULIATTI, F.C.; KERR, W.E. Uberlândia: nova cultivar de cenoura resistente à *Alternaria dauci*. Fitopatologia Brasileira, 15: 150. 1990.

PAWELEC, A.; DUBOURG, C.; BRIARD, M. Evaluation of carrot resistance to alternaria leaf blight in controlled environments. Plant Pathology, 55: 68-72. 2006.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; TAKATSU, A. LOPES, C.A. Crestamento bacteriano da cenoura causada por *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* no Distrito Federal. Fitopatologia Brasileira, 9: 189-192. 1984.

REIS, A; VIEIRA, J. V. Reação de cultivares comerciais de cenoura quanto à resistência à queima-das-folhas. In: 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, Goiânia. Horticultura Brasileira, 24: 1568. 2006. Suplemento 2. CD-ROM.

RODRIGUES, T. T. M. S. Esporulação *in vitro* de *Alternaria solani*. Tese Mestrado. Viçosa - MG, p. 16. 2005.

SONNENBERG, P.E.; MONTEIRO, M.S.R; MARTINS, J.C. Comportamento dos cultivares de cenoura (*Daucus carota* L.) ‘Tropical’, ‘Nantes’ e ‘Kuroda’, em diferentes épocas do ano. Revista de Olericultura, 17: 178-185. 1979.

SOUZA, R.T.; FORCELINI, C.A.; REIS, E.M. & CALVETE, E.O. Frequência de *Alternaria dauci* e *Cercospora carotae* como agentes da queima das folhas da cenoura em Passo Fundo, RS. *Fitopatologia Brasileira*, 26: 614-618. 2001.

VIEIRA, J. V.; BUSO, J A; VECCHIA, P. T. D. Resistência a *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko em população de cenoura cultivar Kuroda. In: XIX Congresso Brasileiro de Olericultura, Florianópolis/SC, Resumos. 1: 51-54. 1979.

VIEIRA, J.V.; CASALI, V.W.D. Melhoramento de cenoura para verão. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 10: 17-18. 1984.

CAPÍTULO 2

Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial de *Alternaria dauci in vitro*

RESUMO

Efeito de fungicidas sobre o crescimento micelial de *Alternaria dauci* *in vitro*.

Testes *in vitro* foram realizados com o intuito de avaliar a sensibilidade de 32 isolados de *Alternaria dauci*, através do crescimento micelial, aos fungicidas azoxistrobin, iprodione e mancozeb. Foram testadas concentrações de zero; 0,1; 1; 10 e 100 ppm diluídas em BDA e vertidas em placas de Petri. Cada parcela foi constituída de uma placa contendo o meio de cultura com o fungicida e um disco de 10 mm de micélio do respectivo isolado e então mantidas por cinco dias em câmara de crescimento. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial com 3 fungicidas, 5 concentrações, 32 isolados e três repetições por concentração. As análises de regressão indicaram que com o incremento das doses de fungicidas houve redução de crescimento micelial do fungo e que com a dose de 100 ppm obteve-se maior percentual inibição. A esta concentração, o fungicida azoxistrobin não foi capaz de inibir totalmente o crescimento micelial dos isolados avaliados, com redução de 20 até 61,24%. Para o iprodione todos os isolados indicaram sensibilidade na concentração de 100 ppm do fungicida, com exceção do EH 590, EH 592, EH 1544 que apresentaram menor sensibilidade. Para o mancozeb a dose de 100 ppm reduziu o crescimento micelial de todos os isolados, entretanto alguns deles foram menos inibidos nesta concentração, mostrando que há diferença de sensibilidade entre os mesmos a este fungicida. Não houve influência na sensibilidade dos isolados, coletados nas diferentes regiões, para nenhum dos três fungicidas utilizados.

Palavras chave: Fungicida, queima das folhas da cenoura, *Alternaria dauci*.

ABSTRACT

Effect of fungicides through mycelial growth of *Alternaria dauci* in vitro.

In vitro tests were conducted with objectives to evaluate the sensibility of 32 isolates of *Alternaria dauci*, through mycelial growth, for the fungicides azoxystrobin, iprodione and mancozeb. Concentrations of zero, 0.1, 1, 10 and 100 ppm diluted in BDA were tested and included in Petri dishes. The tests design was entirely randomized in a factorial scheme with 3 fungicides, 5 concentrations, 32 individual and three repetitions for concentration. The 100 ppm, the fungicide azoxystrobin was unable to completely inhibit the growth of mycelial isolates, with a reduction from 20 to 61.24%. For iprodione all isolates showed sensibility to the concentration of 100 ppm of fungicide, with the exception of EH 590, EH 592, EH 1544 which had lower sensibility. For mancozeb, the dose of 100 ppm reduced the mycelial growth of all isolated, though some of them were less inhibited by this dose, indicating that there is a difference of sensibility between them in this fungicide.

Key words: Fungicides, carrot leaf blight, *Alternaria dauci*.

INTRODUÇÃO

Apesar das pesquisas e desenvolvimento de cultivares de cenoura adaptadas às condições edafoclimáticas brasileiras e com considerável tolerância à queima das folhas, o uso de fungicidas, a incidência e severidade de doenças aumentam todos os anos. O principal fator responsável pelas epidemias é decorrente da formação de regiões produtoras quase exclusivamente de cenoura, tornando-se um monocultivo, sem rotação com outras culturas ou com rotações de curto período, sendo insuficiente para a redução do inóculo (Alves, 1990; Fancelli *et al.*, 1991).

Segundo Dekker e Georgopoulos (1982), após a Segunda Grande Guerra, iniciou-se o desenvolvimento de fungicidas que penetrassem na planta, erradicando o fitopatógeno após a infecção. A partir deste período foram surgindo novos fungicidas sistêmicos de ação específica.

Entretanto, Georgopoulos (1969) alertou que problemas com resistência de fungos a fungicidas deveriam tornar-se mais frequentes e mais sérios com a utilização dos novos produtos seletivos do que com os convencionais. Diversas ocorrências de linhagens resistentes a fungicidas têm sido registradas tanto no campo quanto em laboratório, entre eles o iprodione. O desenvolvimento de resistência a fungicida no campo resulta normalmente do uso exclusivo e intensivo de um princípio ativo (Beever & Byrde, 1982, citado por Alves, 1990; Fancelli & Kimati, 1988a; Fancelli & Kimati, 1988b; Fancelli & Kimati, 1988c).

Devido ao aumento da severidade da doença nas principais regiões produtoras de cenoura, em destaque São Gotardo – MG tem-se realizado constantes aplicações de fungicidas registrados para cenoura, com intuito de controlar a queima das folhas. Para o controle desta doença existem 54 produtos registrados (AGROFIT, 2008).

Apesar da numerosa quantidade de produtos registrados, apenas alguns têm sido mais utilizados, dentre eles os de princípio ativo azoxystrobin, iprodione e mancozeb.

As seleções *in vitro* de fungicidas têm sido utilizadas e têm se mostrado úteis por se constituir de um método prático e rápido, permitindo estabelecer diferenças significativas entre diversos produtos que poderão vir a ser utilizados no campo. Muitos estudos têm sido feitos objetivando avaliar a sensibilidade de fungos patogênicos a fungicidas, através da inibição do crescimento micelial (Pereira *et al.*, 2002; Töfoli *et al.*, 2003; Gugino & Abawi, 2005; Mondal *et al.*, 2005; Lélis *et al.*, 2007).

Töfoli *et al.* (2003) estudaram a ação “*in vitro*” de diversos fungicidas em *Alternaria solani*. O fungo mostrou-se altamente sensível ao iprodione que apresentou elevada inibição do crescimento micelial (a partir de 1 ppm), moderada com azoxystrobin e resistente a mancozeb, porém sempre com comportamento superior à testemunha. Em outro estudo Pereira e colaboradores (2002) avaliaram a fungitoxidade “*in vitro*” de iprodione sobre o crescimento micelial de fungos que se associam às sementes de arroz. Verificaram alta sensibilidade de *Alternaria alternata* ao fungicida, onde 7,3 ppm do princípio ativo foi capaz de inibir 50% do crescimento fúngico. Segundo Machado (2000), iprodione é um produto que apresenta um razoável espectro de ação fúngica, atuando sobre esporos, impedindo sua germinação e sobre o micélio, bloqueando o seu desenvolvimento. Alves (1990) em seu estudo identificou linhagens de *Alternaria porri* resistentes à iprodione, verificando o crescimento destes isolados em meio contendo até 5000 ppm do princípio ativo.

Apesar de, em testes laboratoriais, isolados de *Alternaria dauci* terem apresentado sensibilidade ao iprodione no crescimento micelial e inibição da germinação conidial, estudos realizados por Gugino & Abawi (2005), mostraram baixa eficácia do produto em campo para o controle de *A. dauci* e *C. carotae*. Neste mesmo trabalho, o azoxystrobin foi classificado como um dos mais eficientes para estes fungos, diferentemente dos resultados “*in vitro*” obtidos por Töfoli *et al.* (2003). O azoxystrobin é um fungicida do grupo das estrobirulinas que atuam por meio da inibição da respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c₁ (complexo III) impedindo a formação de ATP e conseqüentemente a formação de energia (Ypema & Gold, 1999). A germinação de esporos demanda alta energia, que é obtida pelas vias respiratórias convencionais, inibidas por estes fungicidas. O micélio, por sua vez, além das vias respiratórias convencionais pode gerar energias por vias alternativas e por glicólise. Apesar da energia gerada pelas vias alternativas ser limitada, esta pode ser suficiente para que o micélio cresça por algum espaço de tempo, mesmo após o contato com o fungicida (Töfoli *et al.*, 2003). Este fato pode explicar, em parte, a ação intermediária de controle deste fungicida em testes laboratoriais de crescimento micelial.

Mondal *et al.* (2005) avaliaram a sensibilidade *Alternaria alternata*, isolados de frutos e folhas de citros, a diversos fungicidas e verificou que o fungo apresentou resistência à ação de azoxistrobin, onde a dose máxima utilizada no experimento, de 100 ppm, inibiu cerca de 30% do crescimento micelial.

Lélis *et al.* (2007) estudaram a sensibilidade de *A. solani* a fungicidas. Verificaram que 40,9% dos isolados avaliados tiveram resistência intermediária para mancozeb, com ED₅₀ entre 26 e 50mg/L. Para o fungicida azoxystrobin a ED₅₀ variou de 0,005 a 0,129 mg/L. Em geral o valor de ED₅₀ foi baixo e sugeriu sensibilidade do fungo ao produto.

Trabalhos realizados por Rodrigues *et al* (2000) em campo com cebola verificaram que a aplicação de mancozeb (Manzate 800®) na dose 3,0 kg/ha de produto comercial a intervalos de 4 a 8 dias entre as aplicações foi eficiente no controle de *Alternaria porri*. Alves (1990) verificou *in vitro* sensibilidade de linhagens de *A. porri* a mancozeb, em meio contendo 100 ppm do fungicida, com inibição de até 80% no crescimento micelial.

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a sensibilidade de isolados de *A. dauci*, através do crescimento micelial, a fungicidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a sensibilidade de *A. dauci* a fungicidas, foram realizados três ensaios *in vitro*, conduzidos no laboratório de Embrapa Hortaliças, Brasília, Distrito Federal. Foram avaliados 32 isolados representativos das regiões Centro-Oeste e Sudeste (Minas Gerais), a partir de culturas monospóricas obtidos de folhas de cenoura contendo o patógeno (Tabela 2.1). Foram realizados três testes com os fungicidas Mancozeb (Manzate 800®), Azoxistrobin (Amistar®) e Iprodione (Rovral®).

O teste foi realizado com todos os isolados, um fungicida por vez, transferindo-se um disco de micélio de 10 mm de diâmetro, obtidos das margens de colônias cultivadas por 05 dias, para placas de Petri contendo cerca de 15mL de meio BDA (Batata dextrose e ágar), sem antibiótico e suplementado com doses crescentes (0,1; 1; 10; 100 ppm de ingrediente ativo) e uma testemunha sem fungicida.

Para cada fungicida, foi inicialmente preparada uma solução estoque de 100 ppm, diluindo-se a quantidade adequada do produto, em água destilada e esterilizada, até o volume de 50mL. A partir desta, realizaram-se diluições em série para obtenção de suspensões nas concentrações desejadas. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 5 x 32, sendo 3 fungicidas, 5 concentrações, 32 isolados e três repetições por concentração. A unidade experimental foi constituída de uma placa de cada isolado com a respectiva concentração de fungicida. As placas foram incubadas em BOD à 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 12h.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada com o auxílio de uma régua graduada, após cinco dias de incubação (dai), registrando-se o diâmetro da colônia em dois sentidos (menor diâmetro e maior diâmetro). O diâmetro médio das colônias, em cada placa, com os produtos e respectivas doses, foi comparado com o crescimento diametral médio das testemunhas, determinando-se desta forma a porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) (Edgington, 1971), expressa pela fórmula:

$$PIC = \frac{(\text{média da testemunha} - \text{média do tratamento})}{\text{média da testemunha}} \times 100$$

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos fungicidas comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. Foram feitas análises de regressão polinomial para cada isolado, utilizando-se para

o teste de F, o nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com o auxílio do software SANEST (Zonta & Machado, 1995).

Tabela 2.1 Relação de isolados de *A. dauci* isoladas a partir de lesões de folhas da cenoura e respectivo local de coleta. * EH = Embrapa Hortaliças.

Isolado *EH	Local de coleta	Isolado EH	Local de coleta
590	Carandaí - MG	408	Brazlândia -DF
592	Carandaí - MG	409	Brazlândia -DF
1110	Carandaí - MG	441	Gama - DF
1111	Carandaí - MG	488	Brazlândia -DF
1112	Carandaí - MG	494	Brazlândia -DF
1115	Carandaí - MG	509	Brazlândia -DF
1394	Carandaí - MG	669	Brazlândia -DF
1407	Carandaí - MG	713	Ceilândia - DF
1431	Carandaí - MG	718	Taquara - DF
1432	Carandaí - MG	719	Taquara - DF
1544	Carandaí - MG	738	Orizona - GO
1577	Carandaí - MG	1692	Pe Bernardo - GO
1678	São Gotardo - MG	1693	Pe Bernardo - GO
1679	São Gotardo - MG	1694	Brazlândia -DF
1681	São Gotardo - MG	1695	PAD - DF
1683	São Gotardo - MG	ALT 96	Gama - DF

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística mostrou que todos os tratamentos foram significativos ao nível de 1% de probabilidade, nos parâmetros analisados (média de crescimento e percentual de inibição de crescimento) (Tabelas A3 e A4 - Anexo).

O azoxistrobin não inibiu totalmente o crescimento micelial dos isolados, no entanto, pode-se observar através da análise de regressão que houve efeito significativo do incremento de fungicidas ao meio de cultura no crescimento micelial, e que a 100 ppm obteve-se o maior controle (Gráficos A1 – Anexo).

A concentração de 100 ppm de azoxistrobin (Tabela 2.2) inibiu em 61,24% o isolado EH 408, que apresentou a maior sensibilidade ao fungicida. Este diferiu estatisticamente dos isolados EH 1112, EH 1407, EH 1432, EH 409, EH 441, EH 669, EH 713, EH 738 e EH 1695. Os isolados EH 1112, EH1407, EH 1432, 1544, EH 1678, EH 409, EH 441, EH 494, EH 509, EH 669, EH 713, EH 738 e EH 1695 foram estatisticamente os menos sensíveis com percentual de inibição do crescimento micelial de até 41,03%. Experimentos realizados por Mondal *et al* (2005) e Töfoli *et al* (2003) trabalhando com isolados de *Alternaria alternata* pv. *citri* também verificaram que a dose de 100 ppm de azoxistrobin inibiu cerca de 55 a 75% do crescimento micelial. Os isolados EH 1407 e EH 713 tiveram, em valores absolutos, as menores taxas de inibição de crescimento, com redução de apenas 20% no crescimento micelial que poderia indicar menor sensibilidade destes isolados ao fungicida. Resultados diferentes foram obtidos em outros trabalhos, onde fungos do gênero *Alternaria* foram totalmente sensíveis ao fungicida. Colturato (2006) verificou que o crescimento de *A. alternata* pv. *citri* foi inibido completamente com dose de 10 ppm de azoxistrobin e Lélis *et al* (2007) observaram uma alta sensibilidade de *Alternaria solani* ao produto.

Tabela 2.2 Percentual de inibição de crescimento micelial de 32 isolados de *A. dauci* nas concentrações 0; 0,1; 1; 10 e 100 ppm do fungicida azoxistrobin.

Isolado	Concentração de fungicida			
	0,1	1	10	100
EH 590	*38,47 abcdefg	36,44 abcd	52,00 a	51,31 abcde
EH 592	**36,13 abcdefg	42,36 abc	35,41 abcdefg	50,00 abcde
EH 1110	46,04 bcd	29,50 bcde	27,76 cdefg	43,43 abcdefg
EH 1111	25,78 defg	34,40 abcde	37,05 abcdefg	47,64 abcdef
EH 1112	46,44 abcd	40,10 abc	39,40 abcdefg	33,05 cdefgh
EH 1115	42,74 abcdef	52,42 a	34,68 abcdefg	48,38 abcdef
EH 1394	44,83 abcde	37,06 abcd	46,55 abcde	56,03 ab
EH 1407	56,24 a	41,07 abc	18,75 g	22,32 gh
EH 1431	45,00 abc	44,08 abc	49,34 abc	55,92 ab
EH 1432	29,77 cdefg	32,82 abcde	26,72 defg	35,12 bcdefgh
EH 1544	42,04 abcdefg	37,57 abcd	33,75 abcdefg	40,76 abcdefgh
EH 1577	36,81 abcdefg	36,81 abcd	43,56 abcdef	50,31 abcde
EH 1678	36,43 abcdefg	34,88 abcd	32,56 abcdefg	40,31 abcdefgh
EH 1679	51,66 ab	45,03 abc	37,75 abcdefg	45,03 abcdef
EH 1681	34,32 bcdefg	35,07 abcd	33,58 abcdefg	50,00 abcde
EH 1683	40,28 abcdefg	32,37 abcde	35,25 abcdefg	53,93 abc
EH 408	43,41 abcde	49,61 ab	47,29 abcd	61,24 a
EH 409	42,31 abcdef	25,38 cde	23,07 fg	39,23 bcdefgh
EH 441	38,41 abcdefg	28,47 bcde	29,78 bcdefg	29,80 efgh
EH 488	56,43 a	43,57 abc	50,71 ab	56,43 ab
EH 494	31,20 bcdefg	28,80 bcde	36,80 abcdefg	40,00 abcdefgh
EH 509	40,17 abcdefg	27,35 cde	28,21 cdefg	41,03 abcdefgh
EH 669	20,34 g	35,60 abcd	25,42 efg	30,50 defgh
EH 713	24,00 efg	16,00 de	24,00 fg	20,00 h
EH 718	40,35 abcdefg	28,07 bcde	35,97 abcdefg	52,63 abc
EH 719	40,71 abcdefg	39,28 abc	47,86 abcd	55,00 ab
EH 738	21,30 fg	12,96 e	23,14 fg	26,85 fgh
EH 1692	25,90 defg	28,92 bcde	30,12 bcdefg	42,77 abcdefg
EH 1693	30,71 bcdefg	40,38 abc	37,50 abcdefg	45,19 abcdef
EH 1694	36,11 abcdefg	38,89 abc	50,69 ab	47,91 abcdef
EH 1695	30,16 bcdefg	30,15 bcde	32,54 abcdefg	38,89 bcdefgh
ALT 96	36,80 abcdefg	28,80 bcde	39,20 abcdefg	52,00 abcd

*Média de três repetições, cada uma representada por uma placa de Petri.

**Médias seguidas de letras minúsculas distintas, em colunas, diferem entre si (para cada dose separadamente) pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Os valores acima indicam percentual de inibição, onde 0 indica que não houve inibição do crescimento e 100 que houve inibição total. Dados estatísticos não transformados.

O fungicida azoxistrobin atua, no campo, preventivamente inibindo a germinação de esporos, apresentando alguma ação curativa e erradicante inibindo o desenvolvimento dos fungos nos estádios iniciais de pós-germinação, com atividade antiesporulante. O fato de o azoxistrobin apenas reduzir o crescimento micelial *in vitro*

pode estar relacionada, à rota metabólica alternativa do fungo, que permite que continue crescendo por um determinado período de tempo após o contato com o fungicida. Apesar deste crescimento talvez não apresentar grande importância no campo, pode ser suficiente para induzir resultados divergentes quanto à eficiência do fungicida, classificando-o como de menor eficiência (Venâncio *et al*, 1999).

As equações de regressão foram significativas e o melhor ajuste para as concentrações de azoxistrobin da maioria dos isolados foi linear, indicando redução no crescimento micelial com aumento da concentração do fungicida. Os isolados EH 1112, EH 1115, EH 1432, EH 1678, EH 1679 e EH 669 apresentaram equações de regressão significativas apenas com ajuste cúbico (Tabela 2.3).

Para o iprodione, a partir da regressão, foi possível observar que com a adição do fungicida ao meio de cultura propiciou redução significativa no crescimento micelial e que a dose de 100 ppm apresentou maior controle para a maioria dos isolados (Gráficos A2 – Anexo). O modelo matemático obtido por este ensaio foi o quadrático com alto coeficiente de determinação.

Na concentração de 100 ppm de iprodione os isolados, em geral, mostraram elevada sensibilidade ao fungicida. Os isolados EH 1678, EH 1681, EH 409 e EH 719 tiveram 100% de inibição do crescimento micelial, no entanto não diferiram dos outros isolados, com exceção do EH 590, EH 592, EH 1431, EH 1432, EH 1544, EH 408 e EH 1694 (Tabela 2.2). Os isolados EH 590, EH 592 e EH 1544 apresentaram menor sensibilidade ao fungicida, com redução no crescimento de 19,7%, 39,15% e 20%, respectivamente. Todos os outros isolados indicaram alta sensibilidade ao iprodione com inibição a partir 67,89%.

Tabela 2.3 Percentual de inibição de crescimento micelial de 32 isolados de *A. dauci* nas concentrações 0; 0,1; 1; 10 e 100 ppm do fungicida iprodione.

Isolado	Concentração de fungicida (ppm)			
	0,1	1	10	100
EH 590	*4,92 bcde	22,73 ef	12,87 jkl	19,70 e
EH 592	**1,72 de	24,41 ef	15,50 jkl	39,15 e
EH 1110	17,71 abcde	62,79 abc	74,84 a	87,42 abcd
EH 1111	11,35 abcde	54,58 abc	51,28 cdefgh	87,91 abcd
EH 1112	15,25 abcde	53,19 bcd	70,94 abcd	79,42 abcd
EH 1115	13,14 abcde	61,97 abc	70,88 abcd	88,73 abcd
EH 1394	9,27 abcde	61,34 abc	25,60 ijk	95,36 ab
EH 1407	29,88 a	54,40 abc	77,78 a	95,40 ab
EH 1431	7,86 bcde	16,48 f	32,21 hij	70,41 cd
EH 1432	11,79 abcde	55,46 abc	45,71 fghi	75,11 bcd
EH 1544	0,00 e	31,72 def	10,46 jkl	20,00 e
EH 1577	0,00 e	54,72 abc	75,98 a	83,07 abcd
EH 1678	15,96 abcde	63,38 abc	48,83 efgh	100,00 a
EH 1679	16,80 abcde	60,94 abc	24,61 ijk	94,14 ab
EH 1681	4,00 cde	73,20 a	0,00 l	100,00 a
EH 1683	18,97 abcde	49,23 bcd	67,18 abcdef	97,43 a
EH 408	11,48 abcde	53,61 abcd	64,68 abcdefg	75,31 bcd
EH 409	18,52 abcde	64,82 abc	75,00 a	100,00 a
EH 441	22,74 abcd	66,52 ab	72,10 abc	88,41 abcd
EH 488	21,57 abcde	43,63 cde	61,27 abcdefg	84,31 abcd
EH 494	19,81 abcde	50,23 bcd	45,00 ghi	83,87 abcd
EH 509	22,13 abcd	61,88 abc	4,51 kl	85,24 abcd
EH 669	9,86 abcde	62,00 abc	74,40 ab	90,00 abc
EH 713	25,48 abc	57,69 abc	49,52 defgh	94,23 ab
EH 718	21,32 abcde	59,90 abc	70,05 abcde	82,23 abcd
EH 719	19,59 abcde	67,52 ab	82,29 a	100,00 a
EH 738	23,14 abcd	50,93 bcd	66,21 abcdefg	93,05 ab
EH 1692	8,48 abcde	47,27 bcd	65,91 abcdefg	82,73 abcd
EH 1693	0,14 e	56,89 abc	24,86 ijk	84,48 abcd
EH 1694	5,09 bcde	46,32 bcd	68,42 abcde	67,89 d
EH 1695	18,57 abcde	58,30 abc	74,92 a	88,92 abcd
ALT 96	26,40 ab	67,07 ab	52,68 bcdefgh	86,42 abcd

*Média de três repetições, cada uma representada por uma placa de Petri.

**Médias seguidas de letras minúsculas distintas, em colunas, diferem entre si (para cada dose separadamente) pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Os valores acima indicam percentual de inibição, onde 0 indica que não houve inibição do crescimento e 100 que houve inibição total. Dados estatísticos não transformados.

O fungicida iprodione age com baixa intensidade sobre a germinação de conídios. Caso haja a germinação, os tubos germinativos ficam pequenos e entumecidos, podendo se romper. Nas hifas os compostos são rapidamente ligados à parede celular, bem como alteram a fração de triglicéridos. Provocam extravasamento

do citoplasma interrompendo o crescimento micelial. Nas hifas já desenvolvidas a membrana só é alterada no ápice, onde ainda há crescimento. (Ehr & Kemmitt, 2002).

Dados obtidos neste ensaio, com o iprodione, estão de acordo com diversos autores. Boveda (1986) e Fancelli (1991) verificaram elevado nível de inibição do crescimento micelial de *Alternaria solani*. Töfoli *et al* (2003) observaram que a adição de 100 ppm ao meio de cultura inibiu em até 100% o crescimento dos isolados de *A. solani* e Pereira *et al* (2002) verificaram que 7,3 ppm do fungicida foi suficiente para inibir em 50% o crescimento deste fungo, indicando que os isolados foram sensíveis ao produto.

A resistência ao iprodione foi citada por Fancelli *et al.* (1988a, 1988b e 1988c) apenas em um caso isolado de *Alternaria dauci*, em culturas de cenoura de Piracicaba, Piedade e Mogi das Cruzes. Nestes estudos verificaram *in vitro* o surgimento de linhagens resistentes de *Alternaria dauci*, que continuaram crescendo em até 4000 ppm do princípio ativo.

O mancozeb não inibiu totalmente o crescimento micelial dos isolados. As equações de regressão foram significativas e o melhor ajuste para as concentrações de mancozeb de todos os isolados foi linear com alto coeficiente de determinação. A análise de regressão mostrou que houve efeito significativo da dose do fungicida sobre o crescimento micelial e indicou que a dose de 100 ppm proporcionou o maior controle (Gráficos A3 – Anexo).

Nesta concentração o isolado EH 1431 apresentou 81% de redução no percentual de crescimento micelial, diferindo estatisticamente apenas dos isolados EH 1110, EH 1111, EH 1394, EH 1544, EH 409, EH, 441, EH 488, EH 738, EH 1692, EH 1695 e ALT 96. Os isolados EH 1110, EH 1394, EH 1544, EH 409, EH, 441, EH 488, EH 738, EH 1692, EH 1695 e ALT 96 indicaram menor sensibilidade ao fungicida. Os demais apresentaram percentual de inibição de crescimento micelial a partir de 60%. Dados semelhantes foram observados por Töfoli *et al* (2003) com *A. solani*, onde o fungicida apresentou efeito inibitório, cerca de 50%, a 100 ppm.

O mancozeb é um composto que age interferindo na produção de energia considerados inibidores não específicos de ação múltipla (Azevedo, 2003). Convertem os polissacarídeos em glicose e as proteínas em aminoácidos. Interrompem o ciclo de Krebs através da inativação da enzima dehidrogenase impedindo a formação de ATP caracterizando, desta forma, a interferência na produção de energia. (Tomlin, 2002; Azevedo, 2003).

Tabela 2.4 Percentual de inibição de crescimento micelial de 32 isolados de *A. dauci* nas concentrações 0; 0,1; 1; 10 e 100 ppm do fungicida mancozeb.

Isolado	Concentração de fungicida			
	0,1	1	10	100
EH 590	*11,03 b	13,16 bcd	11,63 cdef	65,57 abcdefg
EH 592	**8,90 b	10,42 bcd	10,42 cdef	60,08 abcdefghi
EH 1110	49,66 a	35,42 a	36,28 ab	36,63 j
EH 1111	5,06 b	6,25 bcd	12,91 cdef	59,70 bcdefghi
EH 1112	1,98 b	3,45 cd	22,92 abcdef	70,62 abcdef
EH 1115	8,88 b	6,94 bcd	29,69 abc	72,35 abcde
EH 1394	0,00 b	1,70 cd	11,22 cdef	55,78 cdefghij
EH 1407	15,65 b	22,30 abc	38,85 a	78,38 ab
EH 1431	5,30 b	9,53 bcd	24,30 abcdef	81,62 a
EH 1432	8,07 b	9,83 bcd	24,91 abcde	67,36 abcdefg
EH 1544	6,04 b	8,76 bcd	22,36 abcdef	57,70 bcdefghij
EH 1577	0,00 b	1,22 cd	14,22 cdef	76,83 abc
EH 1678	4,26 b	6,03 bcd	6,38 ef	64,18 abcdefgh
EH 1679	1,18 b	2,94 cd	14,13 cdef	65,73 abcdefg
EH 1681	4,38 b	2,69 cd	7,74 def	76,43 abc
EH 1683	8,74 b	9,06 bcd	13,59 cdef	63,43 abcdefgh
EH 408	7,93 b	13,59 bcd	6,95 ef	65,05 abcdefgh
EH 409	0,00 b	0,00 d	2,49 f	53,00 efghij
EH 441	6,25 b	16,54 abcd	21,33 abcdef	58,08 bcdefghij
EH 488	7,29 b	10,12 bcd	23,08 abcdef	49,80 fghij
EH 494	11,08 b	9,14 bcd	22,93 abcdef	62,21 abcdefgh
EH 509	6,89 b	16,30 abcd	27,89 abcde	79,34 ab
EH 669	12,90 b	10,65 bcd	16,77 bcdef	63,55 abcdefgh
EH 713	2,05 b	8,08 bcd	25,00 abcde	70,00 abcdefg
EH 718	8,94 b	22,13 abc	19,15 abcdef	69,78 abcdefg
EH 719	2,66 b	1,11 cd	6,87 ef	75,41 abcd
EH 738	14,96 b	15,75 abcd	22,84 abcdef	43,70 hij
EH 1692	7,13 b	26,85 ab	29,18 abcd	48,25 ghij
EH 1693	8,33 b	10,33 bcd	38,00 ab	63,67 abcdefgh
EH 1694	12,45 b	2,25 cd	18,02 abcdef	66,22 abcdefg
EH 1695	1,55 b	9,40 bcd	11,34 cdef	53,78 defghij
ALT 96	3,21 b	0,00 d	7,63 def	39,76 ij

*Média de três repetições, cada uma representada por uma placa de Petri.

**Médias seguidas de letras minúsculas distintas, em colunas, diferem entre si (para cada dose separadamente) pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Os valores acima indicam percentual de inibição, onde 0 indica que não houve inibição do crescimento e 100 que houve inibição total. Dados estatísticos não transformados.

A equação de regressão para o mancozeb apresentou ajuste linear, com alto coeficiente de determinação, indicando que o incremento do fungicida resultou na redução do crescimento micelial (Gráficos A3 - Anexo).

Para os três fungicidas a concentração de 100 ppm foi a que mais inibiu o crescimento micelial (Gráficos A1, A2 e A3 - Anexo). No entanto, esta concentração mostrou-se insuficiente para inibir totalmente o crescimento dos isolados nos fungicidas azoxistrobin e mancozeb, indicando que doses maiores podem ser testadas para uma melhor avaliação. Para o iprodione a dose de 100 ppm parece ter sido suficiente para inibir o crescimento micelial, uma vez que a esta dose alguns isolados foram totalmente inibidos e estes não diferiram estatisticamente da maioria dos isolados.

Não houve influência na sensibilidade dos isolados, coletados nas diferentes regiões, na inibição do crescimento micelial, para nenhum dos três fungicidas utilizados. Isto indica que o aparecimento de resistência independe da região ser ou não exclusivamente produtora de cenoura e da quantidade de defensivos aplicados.

Apesar de existir grande variedade de fungicidas registrados para cenoura, para o controle da queima das folhas, poucos são utilizados com alta frequência. É importante que o produtor realize aplicações alternadas entre fungicidas de diferentes modos de ação, de forma a evitar o surgimento de isolados resistentes. Atualmente, diversas empresas já produzem fungicidas formulados com mais de um ingrediente ativo.

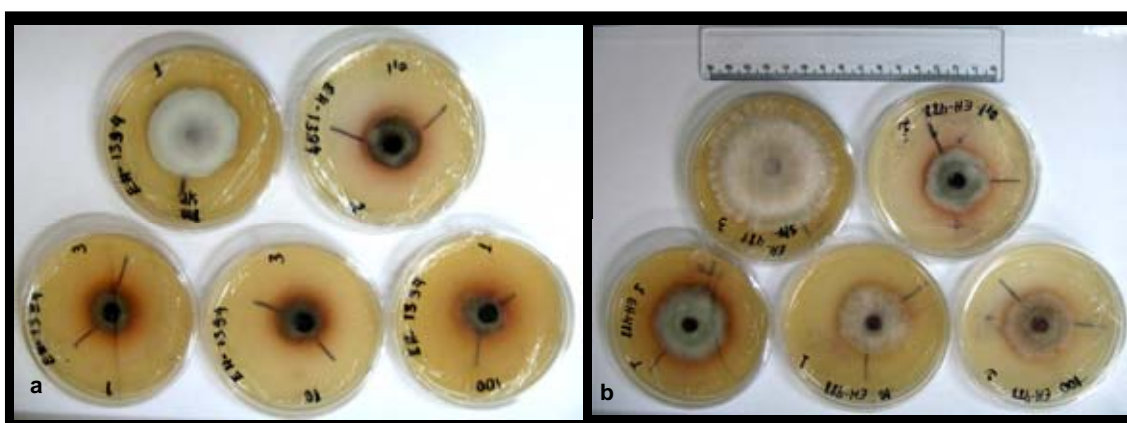


Figura 2.1 Padrão de crescimento micelial com diferentes doses do fungicida azoxistrobin d *A. dauci* após cinco dias de cultivo. Da esquerda para direita: placas acima doses de 0 e 0,1; abaixo 1; 10 e 100 ppm. a) EH 1394. b) EH 488.

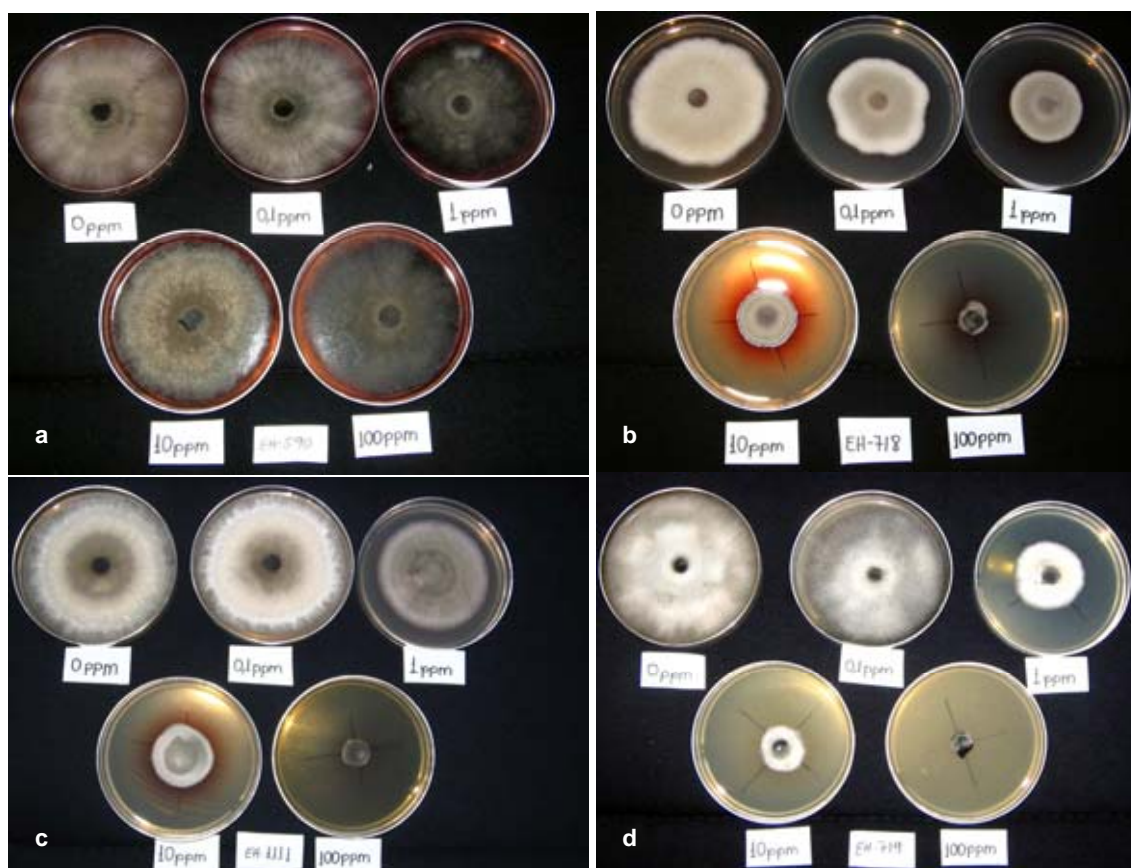


Figura 2.2 Padrão de crescimento micelial com diferentes doses do fungicida iprodione de *A. dauci* após cinco dias de cultivo. Da esquerda para direita: placas acima doses de 0; 0,1 e 1 ppm; abaixo 10 e 100 ppm. a) EH 590. b) EH 718. c) EH 1111. d) EH 719.

CONCLUSÓES

- A 100 ppm, o fungicida azoxistrobin não foi capaz de inibir totalmente o crescimento micelial dos isolados avaliados;

- Todos os isolados foram sensíveis ao iprodione, à 100 ppm, com exceção de EH 590, EH 592, EH 1544 que apresentaram menor sensibilidade;

- Todos os isolados avaliados tiveram seu crescimento micelial inibido na dose de 100 ppm de mancozeb, entretanto alguns deles foram menos inibidos por esta concentração, mostrando que há diferença de sensibilidade entre os mesmos a este fungicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.L.B. Adaptabilidade de linhagens de *Alternaria porri* (Ellis) Chif. Resistentes à iprodione obtidas *in vitro*. Tese de Doutorado. Piracicaba, 130p. 1990.

AZEVEDO, L.A.S. **Fungicidas protetores** – fundamentos para uso racional. Campinas: Emopi Edit. e Graf., 2003. 320 p.

BOVEDA, R.R.V. Morfologia, patogenicidade, esporulação e sensibilidade a fungicidas *in vitro* de *Alternaria solani* e *Alternaria alternata*. Dissertação de Mestrado. Piracicaba: 106p. 1986..

COLTURATO, R. R. V. Efeito do meio de cultura, temperatura, fotoperíodo e fungicidas no crescimento micelial e no controle de *Alternaria alternata* f. sp. *Citri*, causador da mancha marrom do tangor murcote. Dissertação de Mestrado. Botucatu: 53p. 2006.

DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, S. G. Fungicide Resistance in Crop Protection. Wageningen, Centre Agricultural Publishing and Documentation, p. 265. 1982.

EHR, R. J.; KEMMITT, G. Periodic table of the fungicides. Indianapolis: Dow Agrosciences. 2002.

FANCELLI, M. & KIMATI, H. Características dos isolados de *Alternaria dauci* resistentes ao fungicida iprodione. Summa Phytopathologica, 14: 52. 1988c.

FANCELLI, M. & KIMATI, H. Ocorrência de linhagens de *Alternaria dauci* resistentes ao fungicida iprodione no Estado de São Paulo. Summa Phytopathologica, 14: 51. 1988a.

FANCELLI, M.I.; KIMATI, H. Comparação patogênica de isolados de *Alternaria dauci* sensíveis e resistentes ao fungicida iprodione, através de inoculação de sementes, em cultivares de cenoura. Summa Phytopathologica, 17: 232-237. 1991.

FANCELLI, M. & KIMATI, H. Patogenicidade de linhagens resistente e sensível ao iprodione de *Alternaria dauci* em diferentes cultivares de cenoura. Summa Phytopathologica, 14: 52. 1988b.

GEORGOPOULOS, S. G. The Problem of Fungicide Resistance. BioScience, 19: 971-973. 1969.

GUGINO, B. & ABAWI, G. Carrot leaf blight: current management options and fungicide update. Department of Plant Pathology, NYSAES, Cornell University, 2005. Disponível em: <www.nysipm.cornell.edu/factsheets/vegetables/misc/clb.pdf>

LELIS, M. M. ; LOURENCO JR, V. ; AQUINO, L. A. ; MAFFIA, L. A. ; MIZUBUTI, E. S. G. Sensibilidade de isolados brasileiros de *Alternaria solani* aos fungicidas clorotalonil, mancozeb e azoxystrobin. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 2006, Goiânia. Anais do 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, v. 24. 2007 - CD ROM.

MACHADO, J.C. Tratamento de sementes no controle de doenças. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 138p. 2000.

MONDAL, S. N., BHATIA, A., SHILTS, T., AND TIMMER, L. W. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. Plant Disease, 89: 1186-1194. 2005.

PEREIRA, L. A. A., COUTINHO, W. M.; MACHADO, J. C.; MAGALHÃES, F.H.L; PENA, R.C.M. Fungitoxicidade *in vitro* de iprodione sobre o crescimento micelial de fungos que se associam a sementes de arroz. Revista Brasileira de Sementes, 24: 67-70. 2002.

RODRIGUES, M. A. T.; SANTOS, A. J. T.; GOTO, R. Efeito de fungicidas no controle da queima de alternária na cultura da cebola. Departamento de Produção Vegetal/Horticultura, UNESP-FCA, Botucatu-SP, 2000. Disponível em: <<http://200.210.234.180/HORTA/Download/Biblioteca/olfs4083c.pdf>>

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; KUROZAWA, C. Ação “*in vitro*” de fungicidas no crescimento micelial e germinação de conídios de *Alternaria solani*, agente causal da pinta preta do tomateiro. Arq. Inst. Biol., 70: 337-345. 2003.

TOMLIN, C.D.S. **The pesticide manual**: a world compendium. Surrey, Uk: British Crop Protection Council, 12 ed., 2002.1 - CD-ROM.

VENANCIO, W.S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E.L.; SOUZA, N.L. Novos fungicidas. I – produtos naturais e derivados sintéticos: estrobilurinas e fenilpirroles. **In**: Luz, W.C.; Fernandes, J.M.; Prestes, A.M.; Picinini, E.C. **Revisão anual de patologia de plantas**. 7:103-55. 1999.

YPEMA, H.L., GOLD, R.E. Kresoxim methyl: modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Phytopatology*, 83: 4-19. 1999.

ZONTA, E.P. & MACHADO, A.A. SANEST – Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores, 48p. 1995.

CAPÍTULO 3

Diversidade genética de *Alternaria dauci* de cenoura, coentro e salsa.

RESUMO

Diversidade genética de *Alternaria dauci* de cenoura, coentro e salsa.

O fungo *Alternaria dauci* é o principal agente causal da queima das folhas da cenoura, sendo encontrado em todos os campos de produção da cultura no Brasil. Objetivou-se com este trabalho estudar a diversidade genética de isolados de *A. dauci* coletados em folhas de cenoura, coentro e salsa das diferentes regiões do Brasil. Foram realizadas análises com três “primers” decâmeros, via técnica de RAPD que revelaram um elevado nível de diversidade genética entre os 69 isolados testados. O dendrograma construído, pelo método UPGMA, usando o coeficiente de Dice foi eficiente na separação de espécies de *Alternaria*. Verificou-se também uma alta diversidade genética entre os isolados de *A. dauci*. Apenas o primer P203 resultou um padrão capaz de separar os isolados de diferentes hospedeiras dentro da espécie *A. dauci*.

Palavras chaves: *Alternaria dauci*, RAPD, diversidade genética.

ABSTRAC

Genetic diversity of *Alternaria dauci* of carrot, cilantro and parsley.

The fungus *Alternaria dauci* is the main causal agent of the carrot leaf blight and is found in all production fields of the culture in Brazil. The objective of this work is to study the genetic diversity of isolates of *A. dauci* collected in fields of carrot, cilantro and parsley in different regions of Brazil. Analyses were conducted with three RAPD primers that showed a high level of genetic diversity among all 69 isolates tested. The dendrogram built by UPGMA method, using the coefficient of Dice was effective in separating species of *Alternaria*. There was also a high genetic diversity among isolated from *A. dauci*. Only the primer P203 resulted in a model capable of separating the isolates from different host within species *A. dauci*.

Key words: *Alternaria dauci*, RAPD, genetic diversity.

INTRODUÇÃO

A queima das folhas é a mais destrutiva doença da cenoura (*Daucus carotae*) em todo o mundo (Farrar *et al.*, 2004; Prior *et al.*, 2002). O fungo *Alternaria dauci* é relatado como o principal agente etiológico desta doença, sendo encontrado freqüentemente em todos os campos de produção do Brasil (Reifschneider, 1983; Souza *et al.*, 2001).

A taxonomia de *Alternaria* é baseada primariamente na morfologia e desenvolvimento do conídio e conidióforos e também pela hospedeira e morfologia de colônia (Elliot, 1917; Simmons, 1967). O desenvolvimento de técnicas moleculares tem estimulado o uso de diversos tipos de marcadores na tentativa de encontrar um consenso para a distinção de espécies que tem sua morfologia e círculo de hospedeiras distintas. A técnica de amplificação de regiões do DNA que codifica o rRNA através da reação de cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction-PCR) tem sido utilizada para a detecção de *Alternaria* spp., existindo “primers” específicos para distinguir as espécies *A. radicina*, *A. dauci* e *A. alternata*. (Konstantinova *et al.*, 2002). Análise das regiões 18S e ITS ribossomal permitiram separar 18 espécies de *Alternaria* de gêneros próximos *Ulocladium* e *Stemphylium* (Pryor & Gilbertson, 2000; Chou & Wu, 2002). A separação de espécies de *Alternaria* utilizando este tipo de marcador foi similar à obtida por dados morfológicos. O uso de marcadores neutros do tipo RAPD tem sido utilizada com sucesso na distinção de espécies de *Alternaria* infectando *Citrus* (Peever *et al.*, 1999) e batata (Scheuermann *et al.*, 2004). No entanto, existem discrepâncias entre agrupamentos obtidos via RAPD e dados morfológicos. A separação de grupos de isolados dentro das espécies *alternata* e *tenuissima* foi realizada com sucesso utilizando RAPD (Roberts, 2000). Estudos posteriores também utilizando RAPD combinaram isolados destas duas espécies em um único grupo (Pryor & Michailides, 2002).

Reis *et al.* (2003) classificaram a espécie de *Alternaria* infectando coentro e salsa como *Alternaria dauci*, baseados em caracteres morfológicos e fisiológicos e na re-inoculação entre as hospedeiras (Postulado de Koch).

Objetivou-se com o presente trabalho estudar a diversidade genética de isolados de *Alternaria dauci* coletados em folhas de cenoura (*Daucus carotae*), coentro (*Coriandrum sativum*) e salsa (*Petroselinum sativum*) das diferentes regiões do Brasil, a partir de dados de RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do micélio

Foram cultivados em meio BD (batata dextrose) 69 isolados de *A. dauci*, um de *A. solani*, um de *A. porri*, um de *A. alternata* e um de *Stemphylium* (Tabela 11), no escuro, sob agitação contínua, por um período de sete dias. Pequenos fragmentos de cada isolado foram colocados individualmente em Erlenmeyers contendo 100mL de meio BD (250g de batata descascada, 20g de dextrose, 1 L de água destilada) e incubados por sete dias sob agitação constante no escuro para o desenvolvimento do micélio. Após este período, o micélio foi extraído, em procedimento asséptico, colocado em pequenos frascos identificados e preservados à -20°C para posterior extração do DNA.

Extração de DNA

O DNA de cada isolado foi obtido segundo protocolo modificado CTAB (Boiteux *et al.*, 1999). Cerca de 10mg de micélio congelado foi macerado em nitrogênio líquido até formar um pó fino. O micélio macerado foi adicionado a microtubos contendo 600µl de CTAB aquecido (65°C), sendo feita em seguida uma agitação manual. Os tubos foram mantidos em banho-maria (65°C ± 2° C) por 10 minutos e depois resfriados por 3 minutos em água fria. Adicionou-se 600µl de Clorofil (clorofórmio + álcool isoamílico, na proporção 24:1), agitando-os vigorosamente. Em seguida, foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos, para a formação de duas fases (superior, contendo o DNA e inferior, contendo a fase orgânica do material). Retirou-se 550µl da fase superior, transferindo-os a outro microtubo, adicionando-se 300µl de isopropanol gelado, agitando-se lentamente. O material foi mantido por duas horas à 4°C para a precipitação de todo o DNA. Após este procedimento, os materiais foram centrifugados por 13 minutos à 12.000 rpm para a formação do “pellet” contendo DNA purificado. Eliminou-se o sobrenadante, lavou-se o pellet com álcool a 70% e após a secagem em estufa por 30 minutos, este foi ressuscitado em 50µl de TE + RNase e mantido em geladeira para preparação da suspensão de uso.

Amplificação do DNA

A amplificação do DNA de cada isolado foi feita pelo método Randon Amplified Polymorphic DNA (RAPD), realizada em termociclador 9700 GeneAmp PCR System Applied Biosystems. Foram utilizados os iniciadores de síntese (“primers”) descritos por Weir *et al.* (1998) e testados por Scheuermann *et al.* (2004) em isolados de *Alternaria solani*.

Os oligonucleotídeos utilizados foram: P203, P 284 e P285 (Weir *et al.*, 1998) de seqüências respectivas 5'CACGGCGAGT 3', 5'CAGGCGCACA 3', 5'GGGCGCCTAG 3', que apresentaram os melhores padrões de bandas (Scheuermann *et al.* (2004).

Cada reação de amplificação, com 12,55µl foi composta de 7,2µl água milli-Q, 1,25µl tampão 10X, 0,75µl MgCl₂ (50mM), 1µl primer (10µM), 1,25µl dNTP's (2,5mM), 0,1µl enzima *Taq* polimerase (5u/µl) (Invitrogen®) e 10ng de DNA. As condições de amplificação envolveram uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento do iniciador a 36°C por um minuto e extensão a 72°C por 1,5 minutos e uma etapa final de extensão (68° por 10 minutos).

Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 1,5%, tampão TBE 1X (Tris base 1 M, ácido bórico e EDTA 500 mM), contendo brometo de etídio. Os fragmentos de DNA separados foram visualizados e fotografados sob luz UV com o sistema Eagle eye II (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados, por comparação, com marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen®).

Análise de similaridade genética

Para determinar a similaridade genética entre isolados foi realizada uma análise cuidadosa das fotografias dos géis, em que todos os fragmentos de DNA reproduzíveis com tamanho de 5090 a 396 pb foram considerados. Os dados registrados geraram uma matriz de dados binários em que o 1 representa a presença de banda e 0 ausência. A partir da matriz foi estimada a similaridade genética e analisada no programa Ntsys-PC pelo método UPGMA, utilizando o coeficiente de Dice.

Tabela 3.1 Relação de isolados de *Alternaria solani*, *Alternaria porri*, *Alternaria alternata*, *Stemphylium* sp. e *Alternaria dauci* utilizados na análise molecular. *EH = Embrapa Hortaliças.

Seqüência	Nº Isolado *(EH)	Espécie	Hospedeira	Local de coleta
1	1231	<i>A. solani</i>	Batata	Major Vieira - SC
2	1270	<i>A. porri</i>	Cebolinha	Águas Claras - DF
3	635	<i>A. alternata</i>	Cenoura	Irecê - BA
4	1051	<i>Stemphylium</i> sp.	Tomate	Rio de Janeiro - RJ
5	438	<i>A. dauci</i>	Salsa	Taguatinga - DF
6	444	<i>A. dauci</i>	Salsa	Brasília - DF
7	670	<i>A. dauci</i>	Salsa	Taguatinga - DF
8	1337	<i>A. dauci</i>	Salsa	Guaraciaba do Norte - CE
9	1706	<i>A. dauci</i>	Salsa	Taquaruçu - TO
10	413	<i>A. dauci</i>	Coentro	Brazlândia - DF
11	452	<i>A. dauci</i>	Coentro	Brasília - DF
12	548	<i>A. dauci</i>	Coentro	Chá Grande - PE
13	550	<i>A. dauci</i>	Coentro	Chá Grande - PE
14	551	<i>A. dauci</i>	Coentro	Chá Grande - PE
15	563	<i>A. dauci</i>	Coentro	Semente
16	648	<i>A. dauci</i>	Coentro	Brasília - DF
17	726	<i>A. dauci</i>	Coentro	Cristalina - GO
18	758	<i>A. dauci</i>	Coentro	Cristópolis - BA
19	837	<i>A. dauci</i>	Coentro	Vargem Bonita - DF
20	846	<i>A. dauci</i>	Coentro	Semente
21	847	<i>A. dauci</i>	Coentro	Semente
22	896	<i>A. dauci</i>	Coentro	Cristalina - GO
23	1086	<i>A. dauci</i>	Coentro	Vargem Bonita - DF
24	1225	<i>A. dauci</i>	Coentro	Belém - PA
25	1367	<i>A. dauci</i>	Coentro	Guaraciaba do Norte - CE
26	1512	<i>A. dauci</i>	Coentro	Marechal Floriano - ES
27	1513	<i>A. dauci</i>	Coentro	Marechal Floriano - ES
28	1514	<i>A. dauci</i>	Coentro	Marechal Floriano - ES
29	1562	<i>A. dauci</i>	Coentro	Matinha - TO
30	1676	<i>A. dauci</i>	Coentro	Sto Antônio do Descoberto - GO
31	alt 96	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Ponte Alta - DF
32	alt 97	<i>A. dauci</i>	Cenoura	São Gotardo - MG
33	alt 98	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Vargem Bonita - DF
34	170	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Ponte Alta - DF
35	409	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Brazlândia - DF
36	441	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Ponte Alta - DF
37	494	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Brazlândia - DF
38	509	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Taquara - DF
39	517	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Irecê - BA

Seqüência	Nº Isolado * (EH)	Espécie	Hospedeira	Local de coleta
40	590	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
41	646	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Rio Grande do Sul – RS
42	669	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Taguatinga – DF
43	713	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Ceilândia – DF
44	715	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Semente ISLA
45	716	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Semente ISLA
46	718	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Taquara – DF
47	738	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Orizona – GO
48	932	<i>A. dauci</i>	Cenoura	João Dourado – BA
49	1057	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Itajaí – SC
50	1110	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
51	1111	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
52	1113	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
53	1115	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
54	1394	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
55	1407	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
56	1431	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
57	1432	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
58	1536	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Domingos Martins – ES
59	1537	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Domingos Martins – ES
60	1544	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
61	1577	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Carandaí – MG
62	1591	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Irecê – BA
63	1599	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Nova Friburgo – RJ
64	1625	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Nova Friburgo – RJ
65	1653	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Brazlândia – DF
66	1678	<i>A. dauci</i>	Cenoura	São Gotardo – MG
67	1679	<i>A. dauci</i>	Cenoura	São Gotardo – MG
68	1681	<i>A. dauci</i>	Cenoura	São Gotardo – MG
69	1683	<i>A. dauci</i>	Cenoura	São Gotardo – MG
70	1692	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Padre Bernardo – GO
71	1693	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Padre Bernardo – GO
72	1695	<i>A. dauci</i>	Cenoura	Brazlândia – DF
73	1714	<i>A. dauci</i>	Cenoura	PADEF – DF

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *A. dauci* (Tabela 3.1) obtidos das hospedeiras; salsa, coentro e cenoura foram utilizados nos estudos de variabilidade genética, por meio de marcadores moleculares RAPD. A análise de polimorfismos dos isolados foi realizada utilizando três “primers” decâmeros previamente selecionados devido a capacidade de revelar polimorfismos em *Alternaria solani* (Scheuermann *et al.*, 2004). Os “primers” utilizados geraram fragmentos que variaram de 5090 a 396 pb (Figuras 3.2, 3.3 e 3.4). A maioria dos padrões de bandas foram reproduzíveis nas três repetições realizadas para cada “primer” utilizado. Fragmentos não reproduzíveis foram desconsiderados nas análises. Cada “primer” analisado gerou um padrão de bandas distinto, proporcionando a observação total de 53 bandas.

Os resultados confirmam a utilidade de marcadores RAPD na identificação de espécies (Chou & Wu, 2002; Pryor & Michailides, 2002; Weir *et al.*, 1998) já que houve uma clara distinção entre os isolados de *A. solani* de batata (EH 1231), *A. porri* de cebolinha (EH 1270) e *A. alternata* de cenoura (EH 635) e os isolados de *A. dauci* de salsa, coentro e cenoura (demais isolados). Esta diferença é claramente observada tanto nos padrões de bandas de cada “primer” (Figuras 3.2, 3.3 e 3.4) quanto na análise combinada pelo método de agrupamento (UPGMA) dos três padrões (Figura 3.1).

Houve também, na maioria dos casos, uma clara distinção de isolados provenientes de cenoura dos demais isolados (coentro e salsa) com o “primer” P203. Os primers P284 e P285 resultaram em um padrão de bandas similar para todos os isolados das hospedeiras analisadas. A análise conjunta dos primers (Figura 3.1) resultou em uma porcentagem de similaridade de 75% entre os isolados de *A. dauci*, com exceção do isolado EH 1653 (58% de similaridade). Este mesmo resultado tem sido relatado para isolados de *A. solani* provenientes de batata e tomate (Weir *et al.*, 1998). No caso dos isolados de cenoura foi observado um padrão bastante uniforme entre isolados, com exceção do isolados EH 1653 e EH 1678 que apresentaram um padrão com um menor número de bandas com o *primer* P-203 (Figura 3.2). A possibilidade de falhas no PCR devido à qualidade de DNA foi descartada pelo fato da mesma amostra ter apresentado um padrão com muitas bandas utilizando os demais *primers*. Desta forma, há um indicativo de que ocorra diversidade dentro de isolados de cenoura. Um resultado similar ocorreu com os isolados de salsa e coentro com os primers P284 e P285 (Figuras

3.2, 3.3 e 3.4) que apresentaram um único padrão de bandas. A distinção de isolados de diferentes hospedeiras foi possível com a utilização do primer P203.

A análise combinada das bandas apresentadas nas figuras 3.2, 3.3 e 3.4 utilizando o método UPGMA resultou em um dendrograma (Figura 3.1) onde foram observados diferentes níveis de similaridade (44 a 100%).

A grande variabilidade genética observada entre e dentro dos isolados das diferentes hospedeiras pode ser explicada através da recombinação mitótica, sexual e presença de transposons (Roca, 1997). Visto que a fase sexual do fungo *A. dauci* não é conhecida, esta diversidade provavelmente ocorre através dos demais fatores. A recombinação mitótica ocorre através da fusão de hifas, formação de um heterocário e permuta mitótica que pode ocorrer durante a multiplicação do núcleo diplóide e haploidização (Roca, 1997). Este tipo de recombinação tem sido relatada na espécie *A. alternata*.

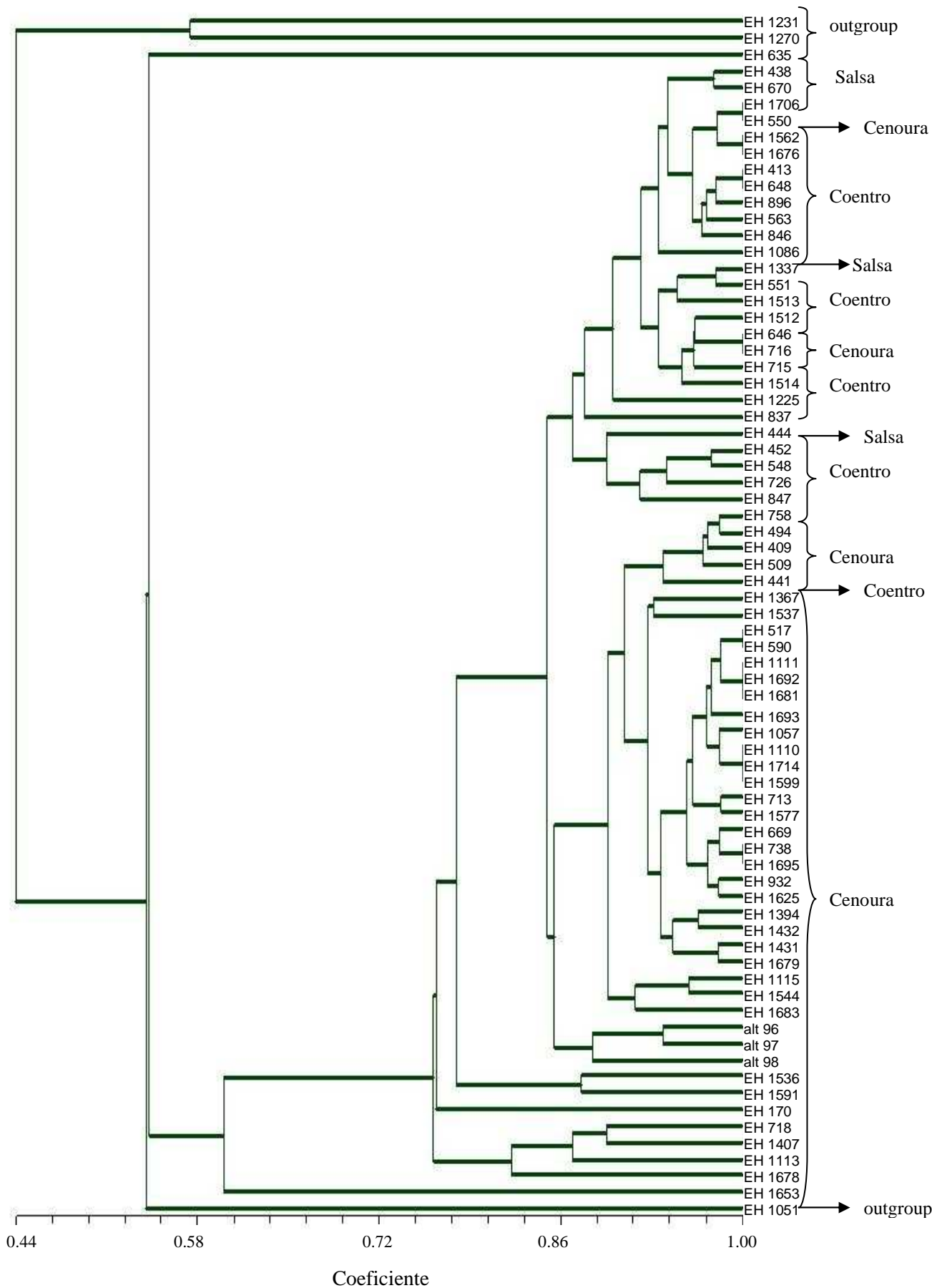


Figura 3.1 Análise de agrupamento de 69 isolados de *Alternaria dauci* construído pelo método agrupamento UPGMA, a partir do coeficiente de Dice.

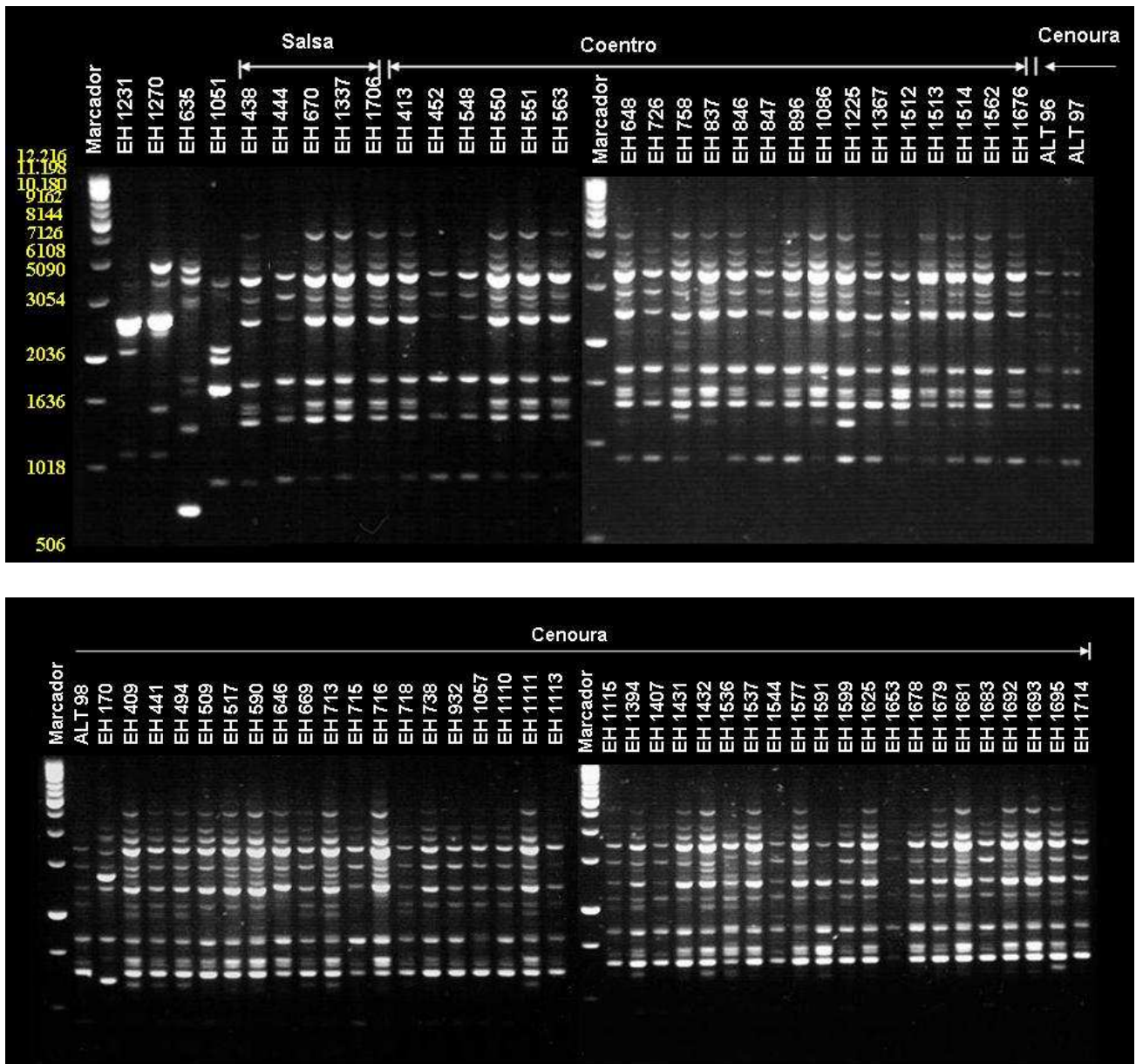


Figura 3.2 Produtos de amplificação de DNA genômico de *Alternaria solani* (EH 1231), *Alternaria porri* (EH 1270), *Alternaria alternata* (EH 635), *Stemphylium* sp. (EH 1051) e 69 isolados de *Alternaria dauci* obtidos a partir do primer P-203. Marcador = 1Kb.

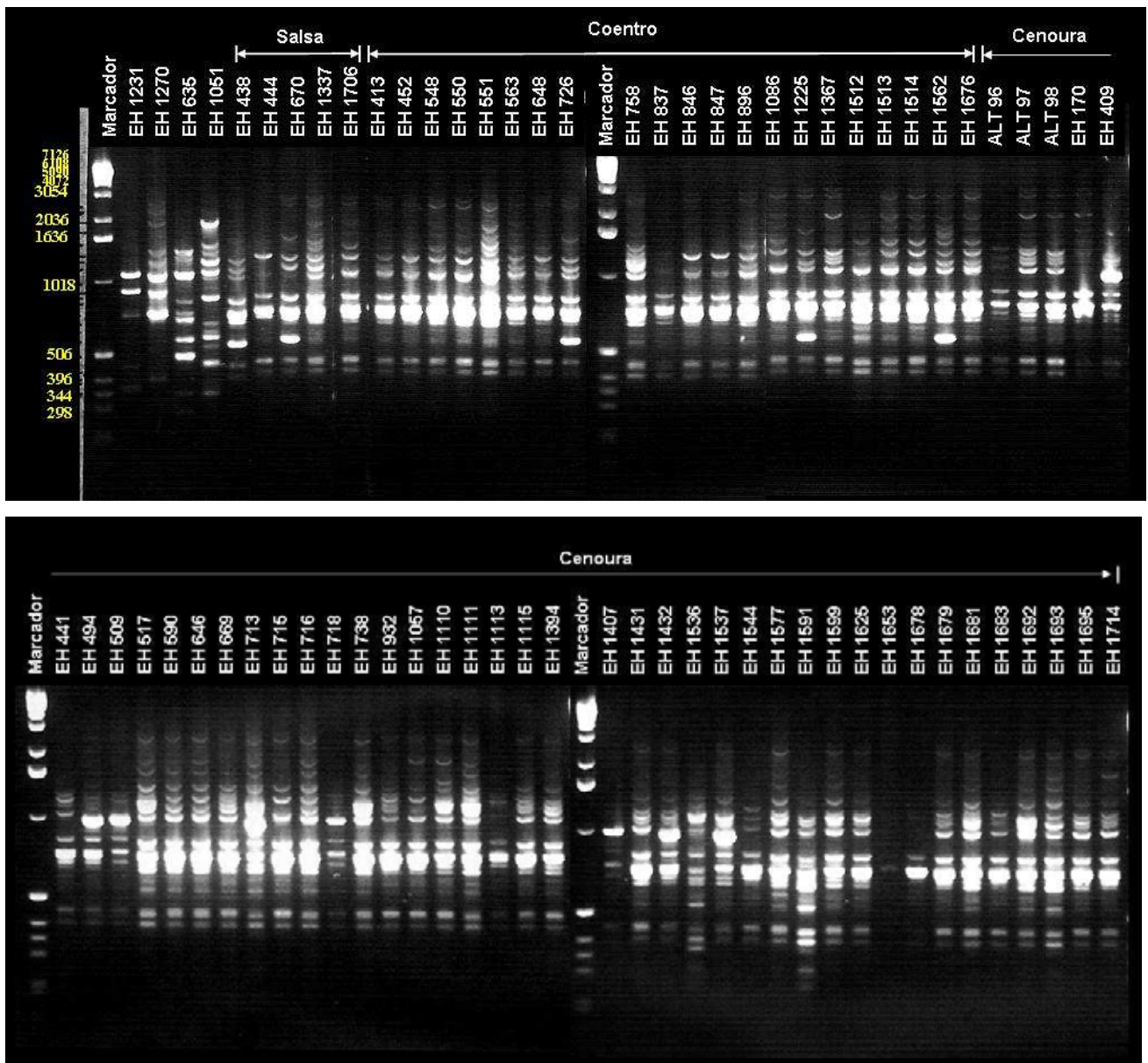


Figura 3.3 Produtos de amplificação de DNA genômico de *Alternaria solani* (EH 1231), *Alternaria porri* (EH 1270), *Alternaria alternata* (EH 635), *Stemphylium* sp. (EH 1051) e 69 isolados de *Alternaria dauci* obtidos a partir do primer P-284. Marcador = 1Kb.

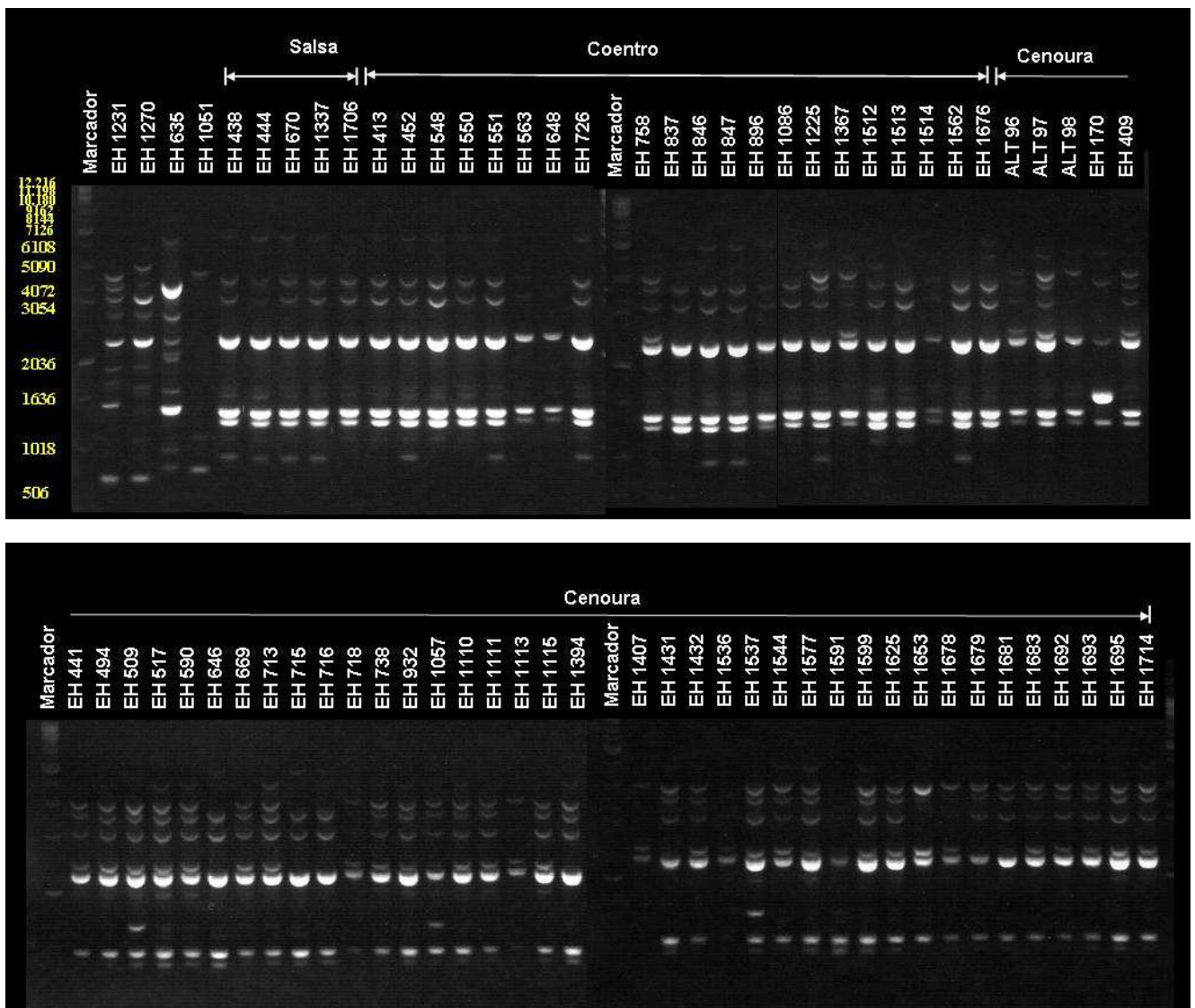


Figura 3.4 Produtos de amplificação de DNA genômico de *Alternaria solani* (EH 1231), *Alternaria porri* (EH 1270), *Alternaria alternata* (EH 635), *Stemphylium* sp. (EH 1051) e 69 isolados de *Alternaria dauci* obtidos a partir do *primer* P-285. Marcador = 1Kb.

CONCLUSÕES

- A análise via RAPD foi eficiente na separação de espécies de *Alternaria*.
- Verificou-se alta diversidade genética entre os isolados de *A. dauci*.
- Apenas o primer P203 resultou um padrão capaz de separar os isolados de diferentes hospedeiras dentro da espécie *A. dauci*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOITEUX, L.S, FONSECA, M.E.N. & SIMON, P.W. Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot . Journal Amer. Soc. Hort. Sci., 124: 32-38. 1999.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, v.2. 585p. 2003.

CHOU, H.H. & WU, W.S. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. Mycological Research, 106: 164-169. 2002.

FARRAR, J.J.; PRYOR, B.M. & DAVIS, R.M. *Alternaria* diseases of carrot . Plant Disease, 88: 776-784. 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3. ed. Brasília: EMBRAPA – CERNAGEN, 220p. 1998.

GHERBAWY, Y.A.M.H. Genetic variation among isolates of *Alternaria* spp from some Egyptian crops. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 38: 77-89. 2004.

HONG, S.G.; LIU, D. & PRYOR, B.M. Restriction mapping of the IGS region in *Alternaria* spp. reveals variable and conserved domains. Mycological Research, 109: 87-95. 2005.

KONSTANTINOVA, P., BONANTS, P. J. M., VAN GENT, PELZER, M. P. E., VAN DER ZOUWEN, P., AND VAN DEN BULK, R. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating methods. Mycological Research, 106: 23-33 2002.

LANZA, M.A.; GUIMARÃES, T.C. & SHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. Informe Agropecuário, Belo Horizonte 21: 97-108. 2000.

MARTINS, M.K. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. Tese Doutorado. ESALQ – Piracicaba, 110p. 2005.

PRYOR, B.M. & GILBERTSON, R.L. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*, 104: 1312-1321. 2000.

PRYOR, B.M. & MICHAELIDES, T.J. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92: 406-416. 2002.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. Levantamento e flutuação da ocorrência de *Alternaria dauci*, *Cercospora carotae* e *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, 8: 607. 1983.

REIS, A.; BOITEUX, L.S.; SILVA, P.P. & CÂMARA, M.P.S. *Alternaria dauci*, agente de manchas foliares em salsa e coentro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 28S: S203-S204. 2003.

ROBERTS, R. G., REYMOND, S. T., & ANDERSEN, B. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research*, 104:151-160, 2000.

ROCA, M. M. G. Aspectos citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.)Spauld & Schrenck f. sp. Phaseoli (*Coletotrichum lindemuthianum* (Sac & Man) Scriber). UFV – Lavras. Dissertação mestrado. 1997. 82p.

SCHEUERMANN, K. K. ; FALLEIRO, B. A. S. ; REIS, A.; BROMMONSCHENKEL, S. H. ; MIZUBUTI, E. S. G. . Seleção de marcadores RAPD para estudo de diversidade genética de *Alternaria solani*. In: XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2004, Gramado. *Fitopatologia Brasileira*, 29: S49-S50. 2004.

SOUZA, R.T.; FORCELINI, C.A.; REIS, E.M. & CALVETE, E.O. Frequência de *Alternaria dauci* e *Cercospora carotae* como agentes da queima das folhas da cenoura em Passo Fundo, RS. Fitopatologia Brasileira, 26: 614-618. 2001.

VAN DER WAALS, J. E., KORSTEN, L., & SLIPPERS, B. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. Plant Disease, 88: 959-964. 2004.

WEIR, T.L., HUFF, D.R., CHRIST, B.J. & ROMAINE, C.P. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. Mycologia, 90: 813-821. 1998.

ANEXO

CAPÍTULO 1

Tabela A1 Análise de variância resultante da avaliação de severidade da queima das folhas de cenoura em campo.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Genótipo	12	2303,7852	191,9821	13,9241	0,00001**
Blocos	2	1,8846	0,9423	0,0683	0,93375
Resíduo	24	330,9070	13,7877	-	-
Total	38	2636,5769			

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade. Dados não transformados.

Coefficiente de variação = 8,09%

Tabela A2 Análise de variância resultante da avaliação de severidade da queima das folhas de cenoura em casa de vegetação.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Genótipo	13	6574,1383	505,7029	4,7230	0,00014**
Resíduo	42	4497,0000	107,0714	-	-
Total	55	11071,1383			

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade. Dados não transformados.

Coefficiente de variação =11,46%

CAPÍTULO 2

Tabela A3 Análise de variância resultante da média de crescimento micelial de 32 isolados de *Alternaria dauci* em três fungicidas e cinco concentrações.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB>F
Isolados	31	272,74	8,79	52,30	0,00001**
Fungicida	2	413,92	206,96	644,71230	0,00001**
Concentração	4	1107,15	276,79	2039,0216	0,00001**
Isolados* Fungicida	62	202,72	3,26	12,8519	0,00001**
Isolados* Concentração	124	77,79	0,62	3,773	0,00001**
Fungicida* Concentração	8	287,75	35,97	271,1921	0,00001**
Isolados* Fungicida* Concentração	248	152,98	0,62	3,783	0,00001**
Resíduo	960	161,48	0,17	-	-
Total	1439	2676,57			

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade. Dados não transformados.

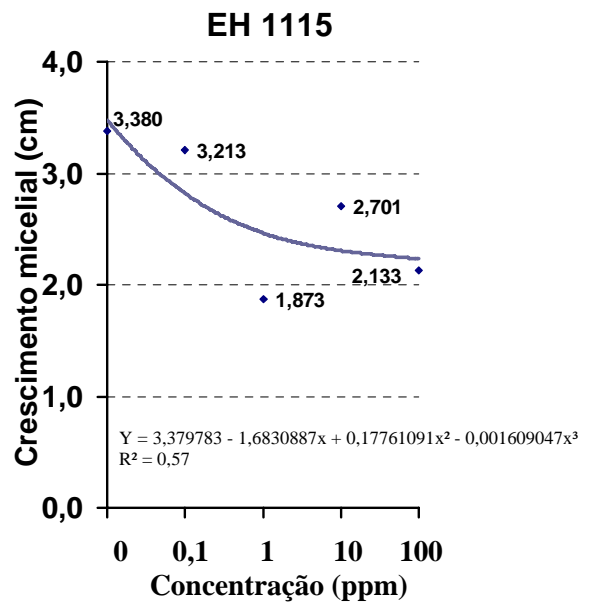
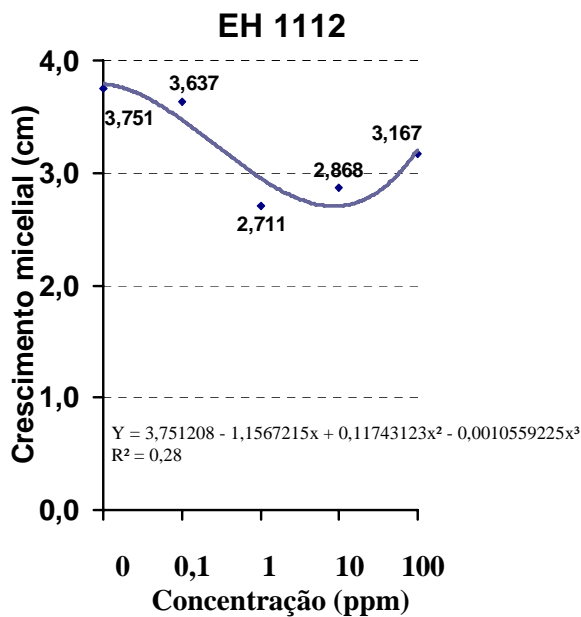
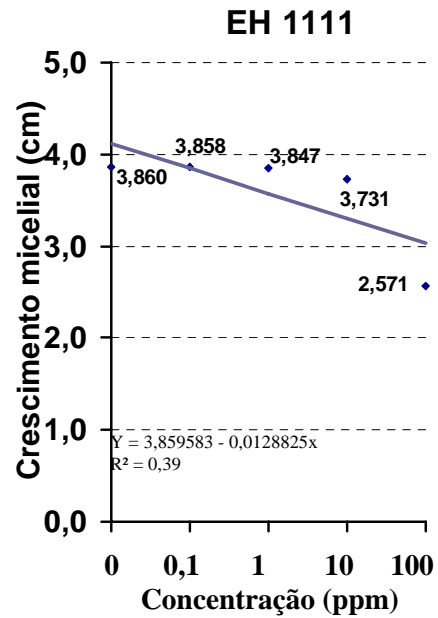
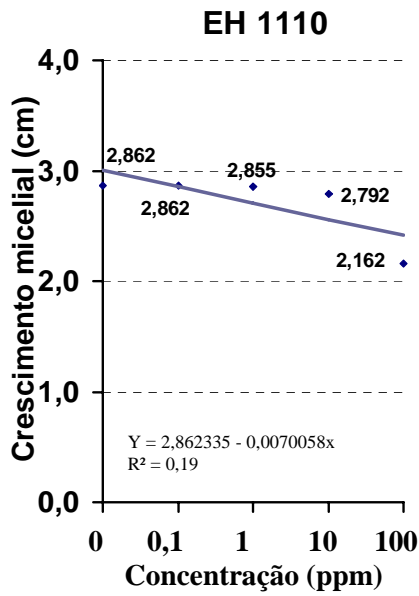
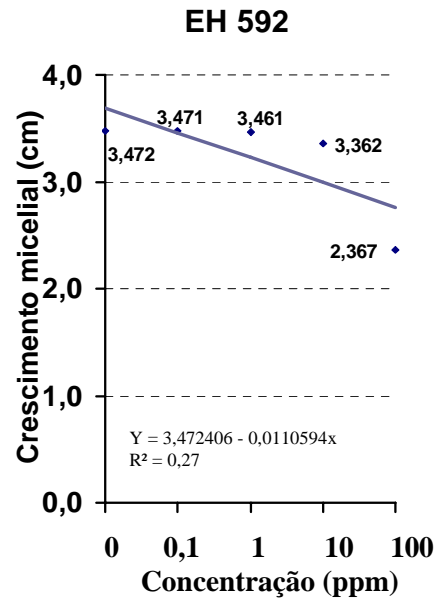
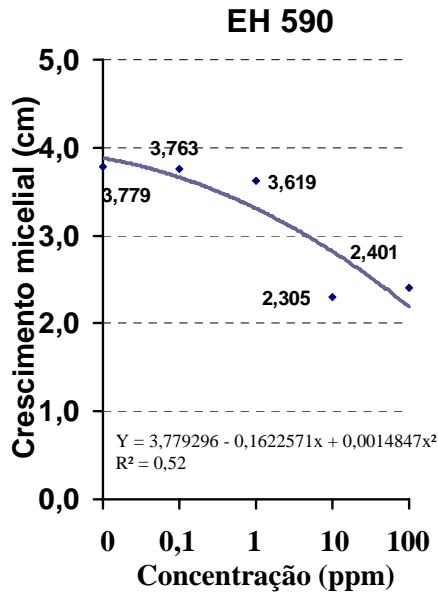
Coefficiente de variação = 13,491%

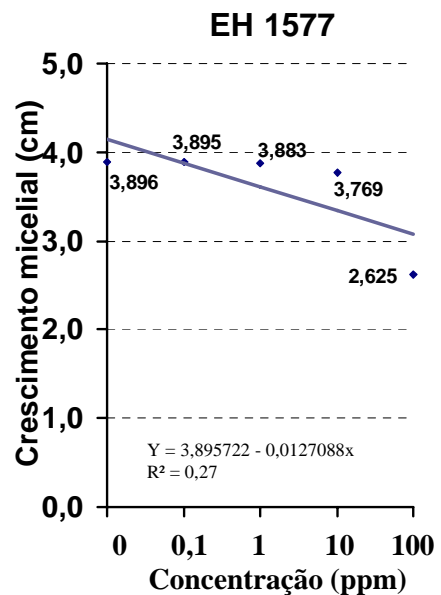
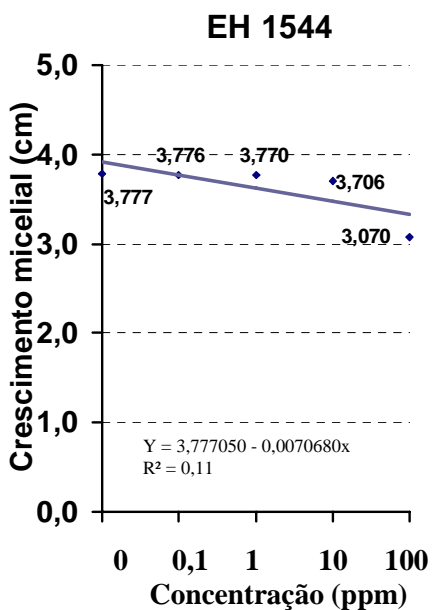
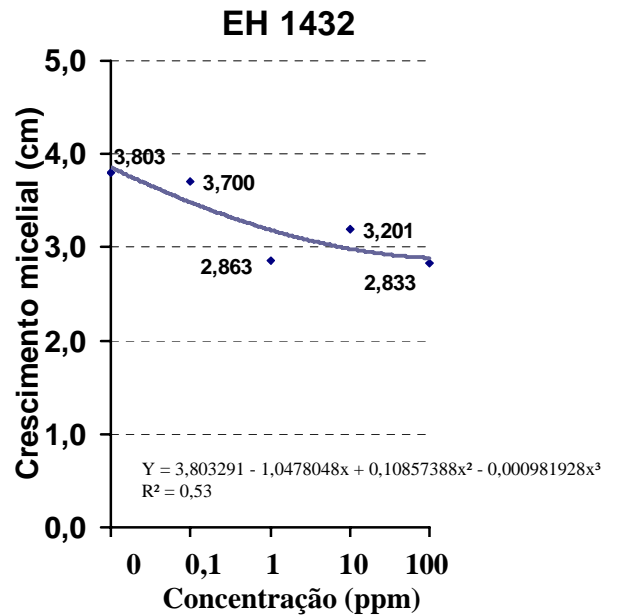
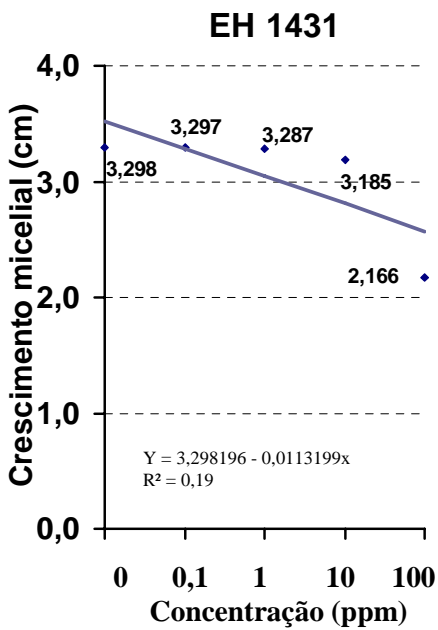
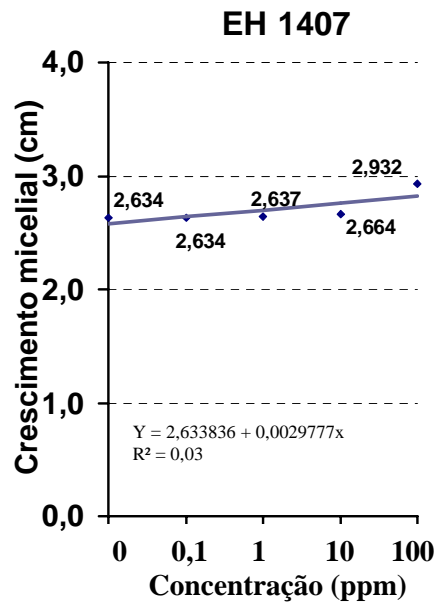
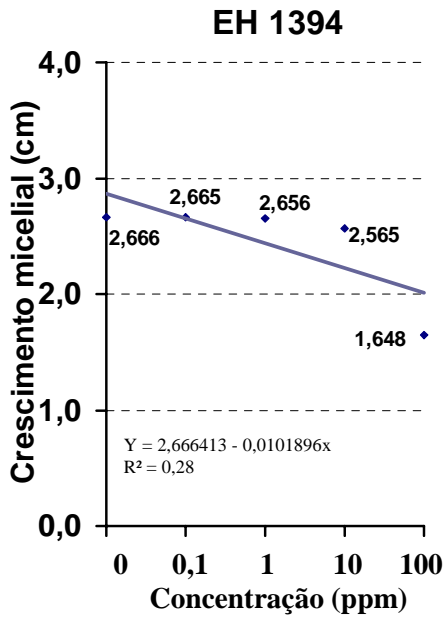
Tabela A4 Análise de variância resultante do percentual de inibição de crescimento micelial de 32 isolados de *Alternaria dauci* em três fungicidas e cinco concentrações.

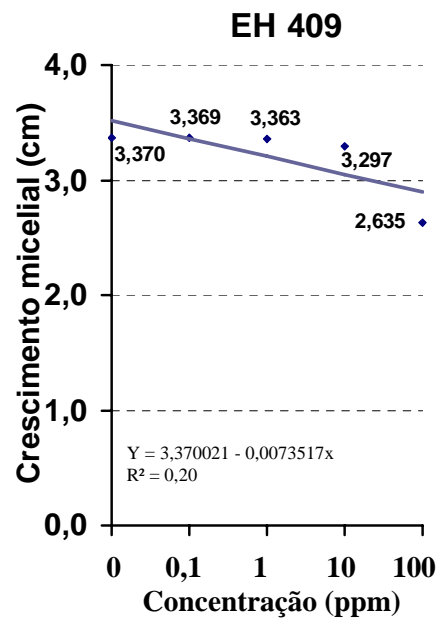
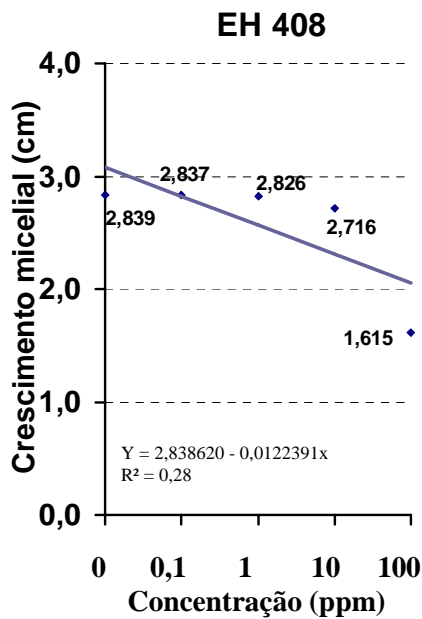
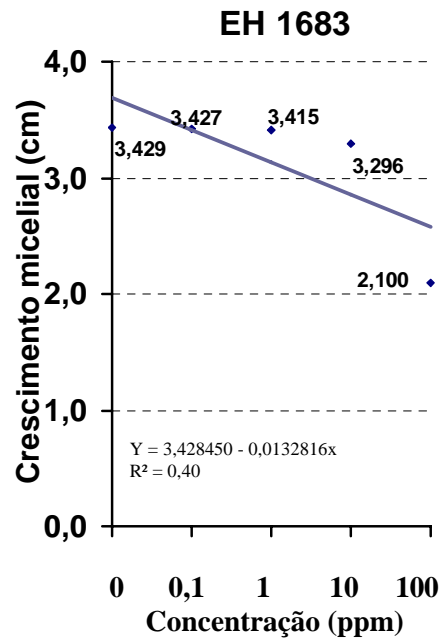
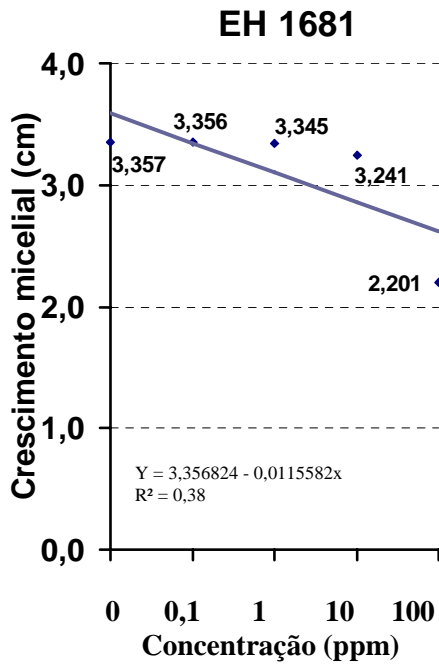
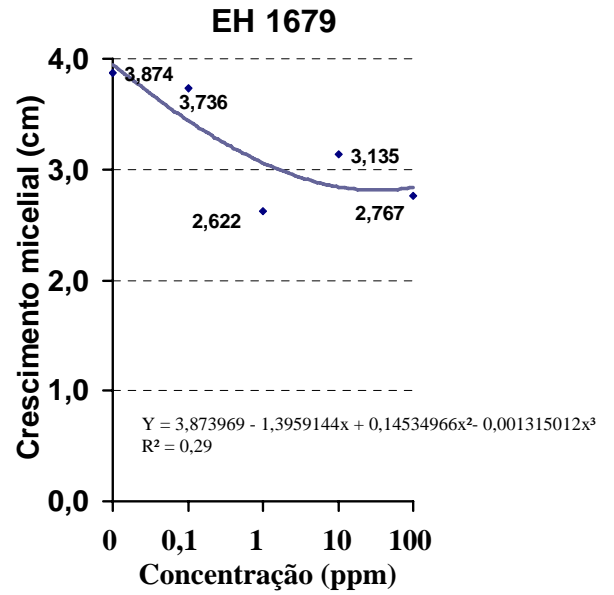
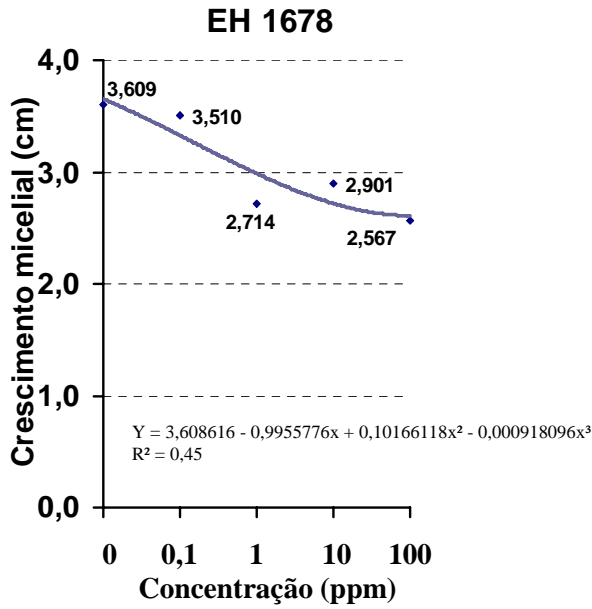
Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB>F
Isolados	31	19311,63	622,9560	8,33	0,00001**
Fungicida	2	99445,48	49722,74	644,76	0,00001**
Concentração	4	610055,50	152513,87	2039,02	0,00001**
Isolados* Fungicida	62	59615,59	961,54	12,85	0,00001**
Isolados* Concentração	124	35012,09	282,35	3,77	0,00001**
Fungicida* Concentração	8	16,2276,92	20284,61	271,19	0,00001**
Isolados* Fungicida* Concentração	248	70154,31	282,88	3,78	0,00001**
Resíduo	960	71805,66	74,80	-	-
Total	1439	1127677,22			

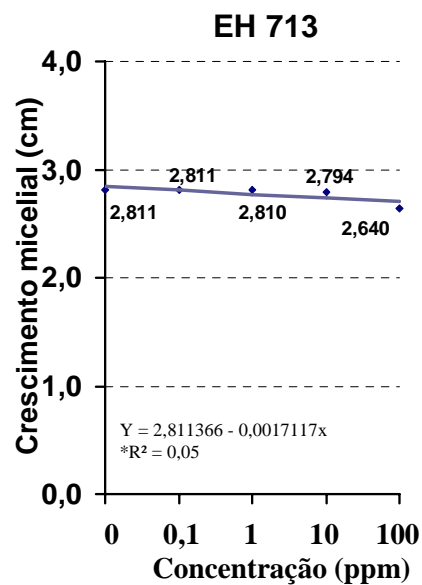
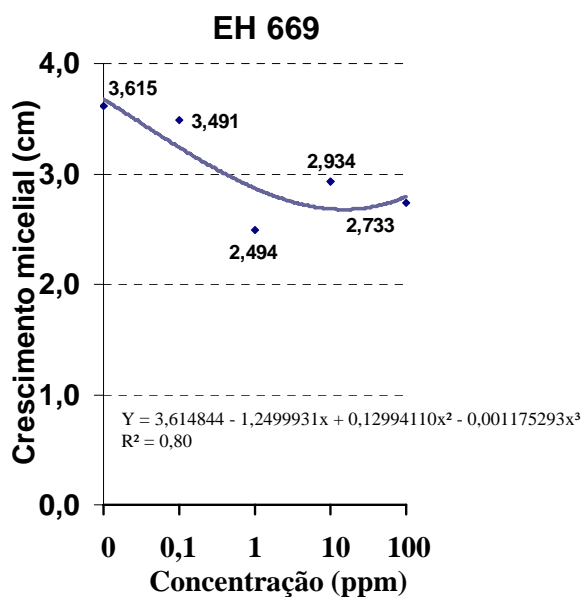
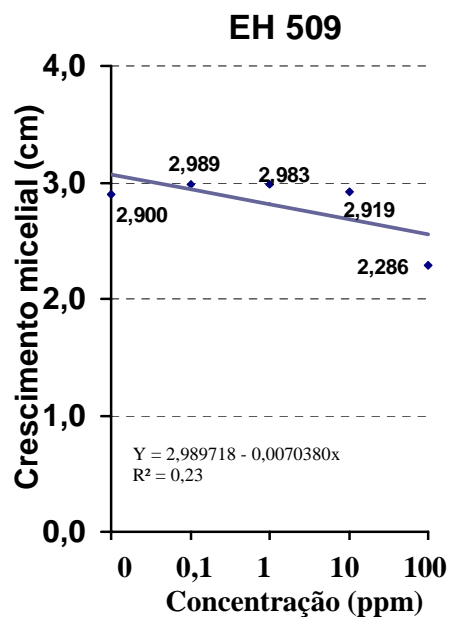
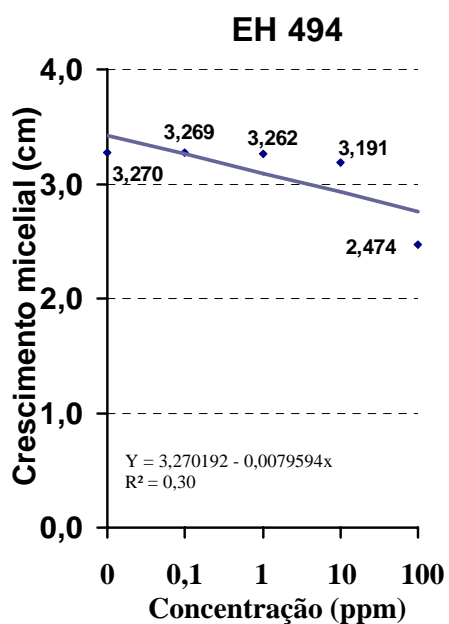
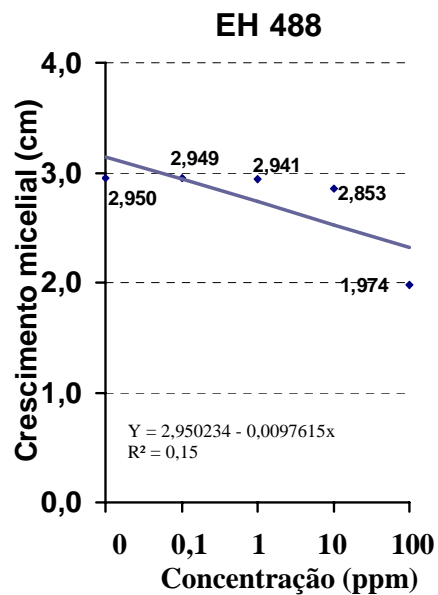
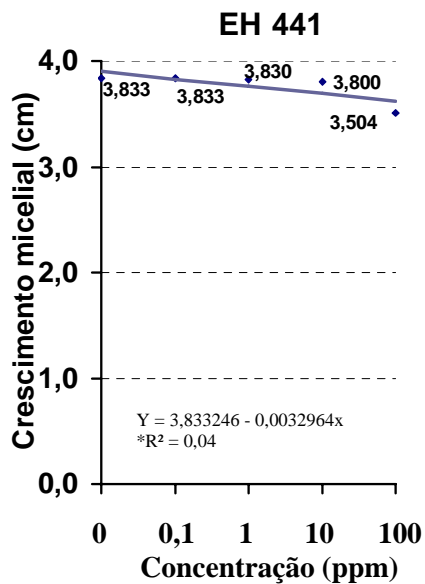
** Significativo ao nível de 1% de probabilidade. Dados não transformados.

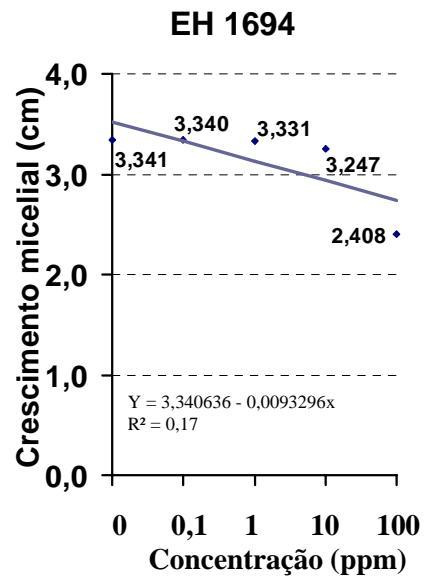
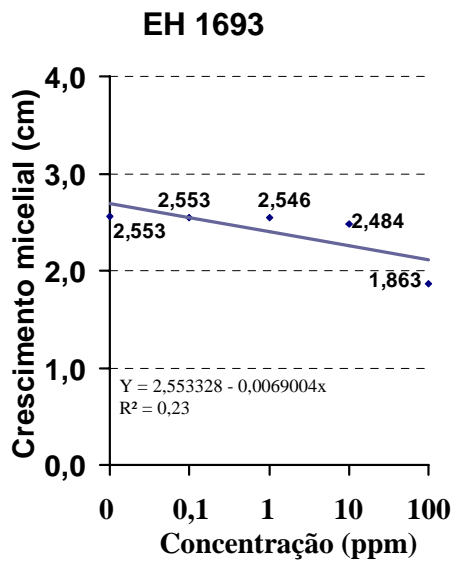
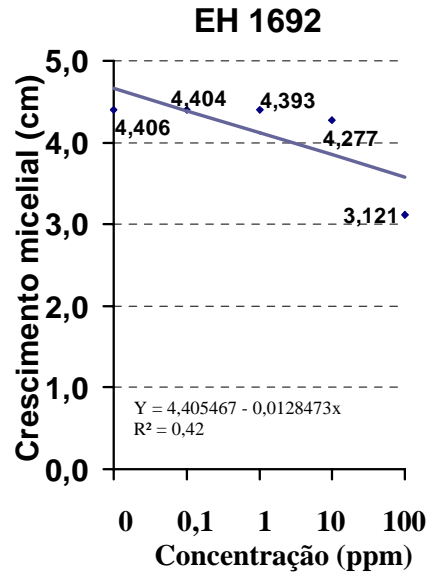
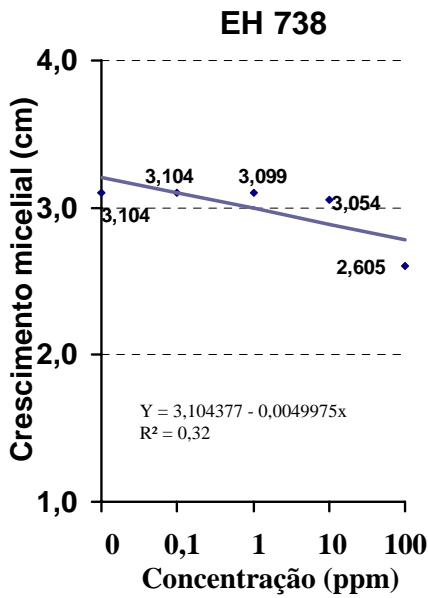
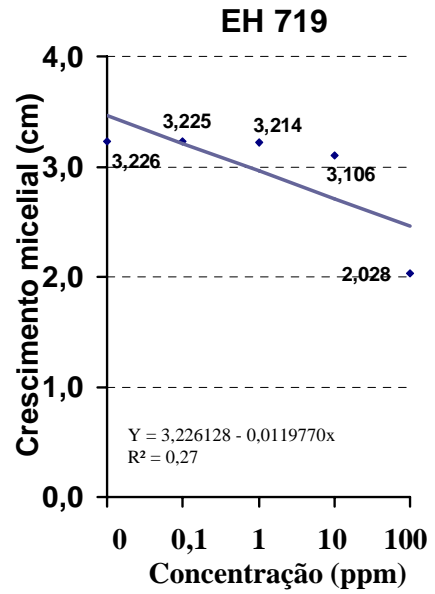
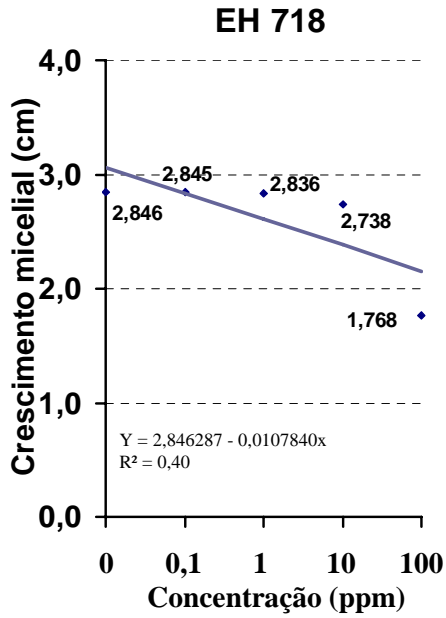
Coefficiente de variação = 28,59%

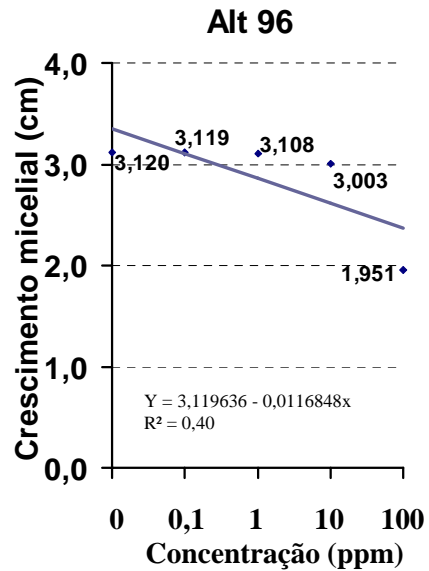
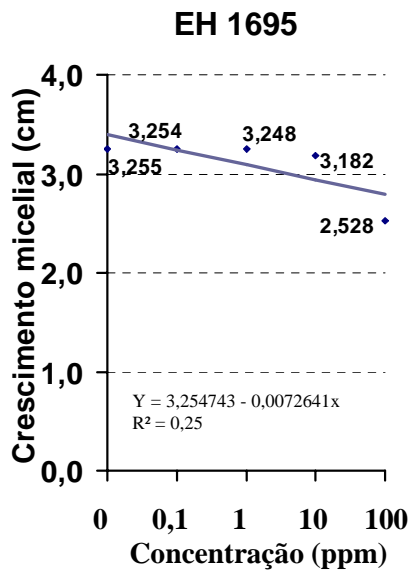




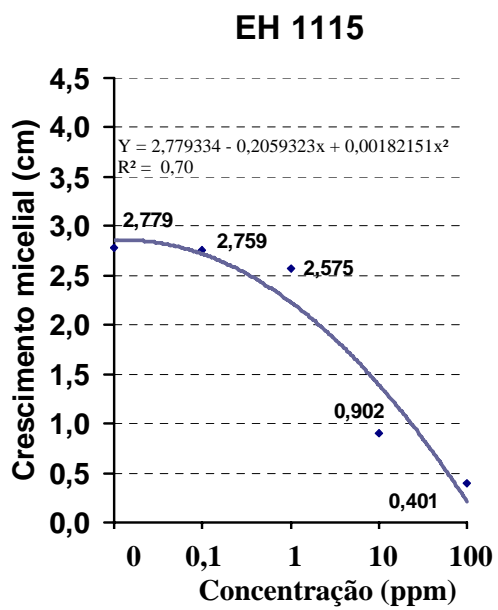
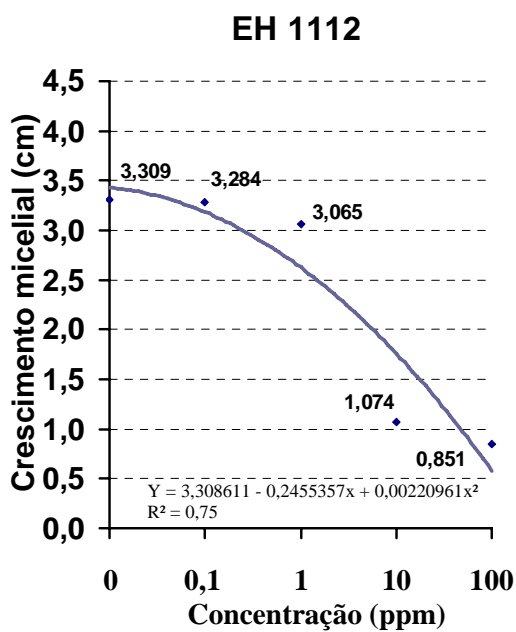
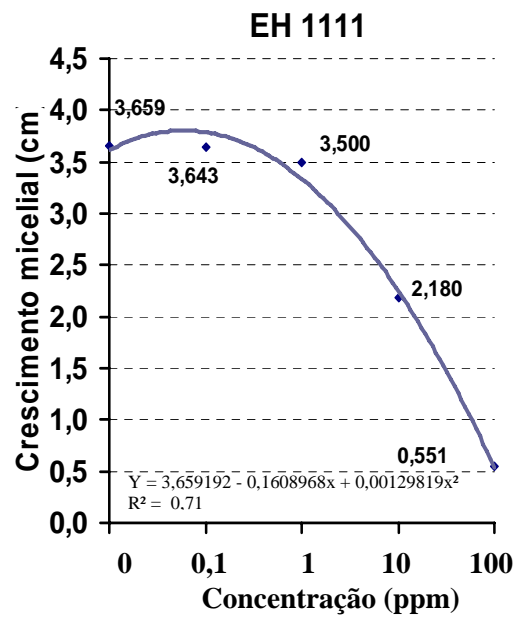
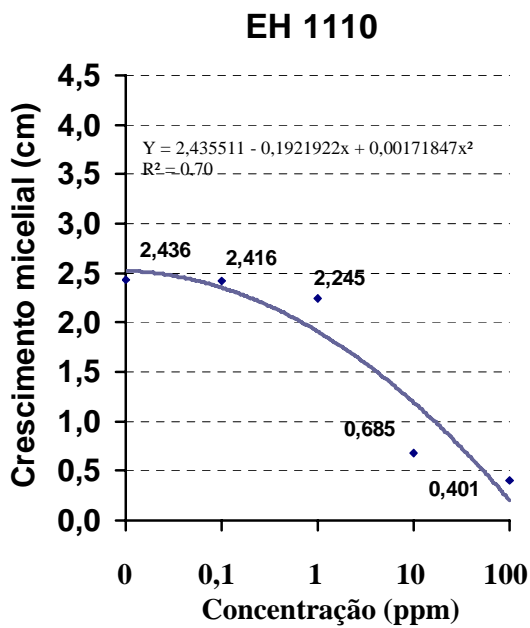
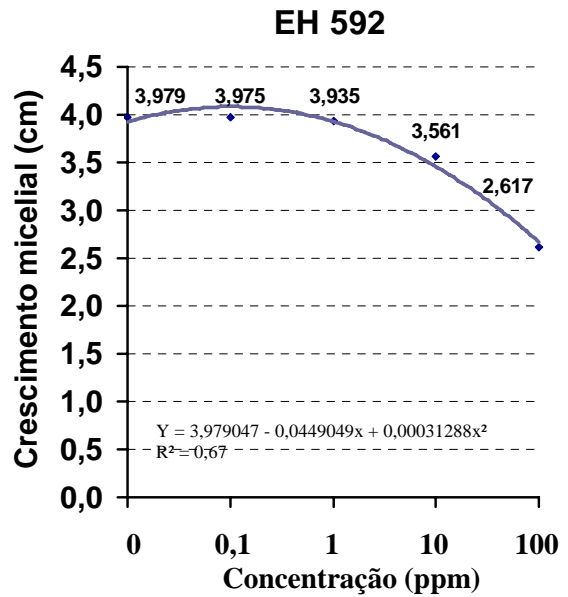
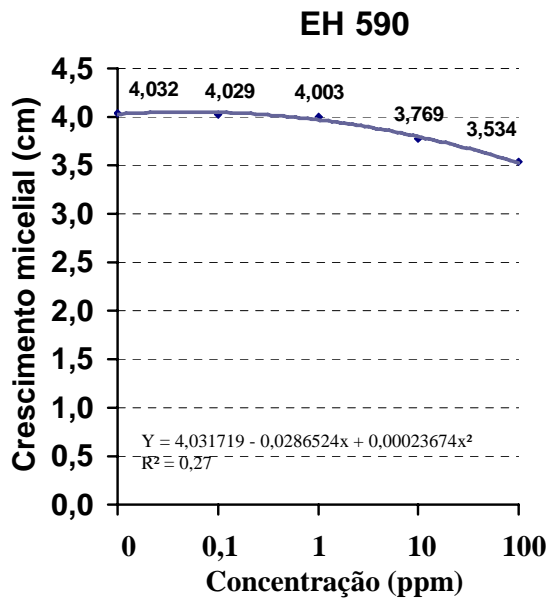




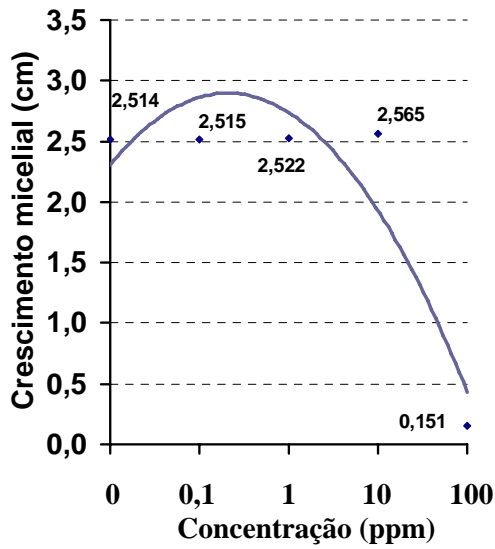




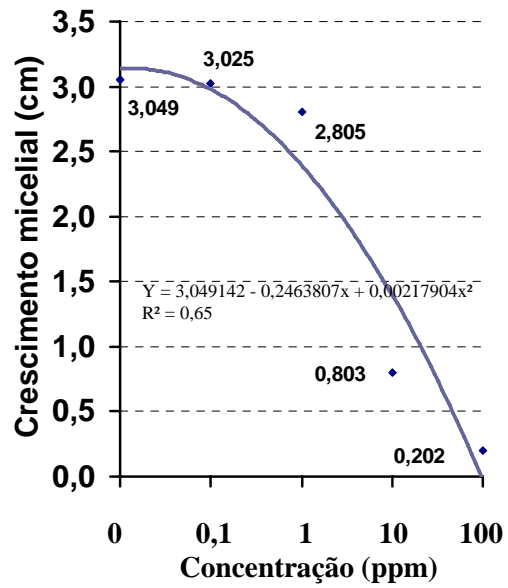
Gráficos A1. Curvas de crescimento de isolados de *Alternaria dauci* em função da concentração do fungicida azoxistrobin (Amistar®).



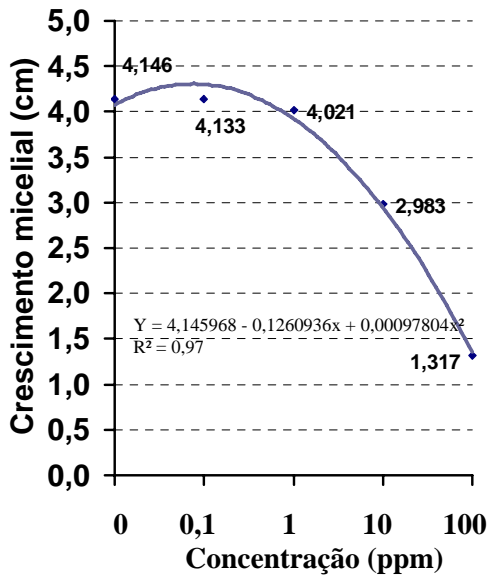
EH 1394



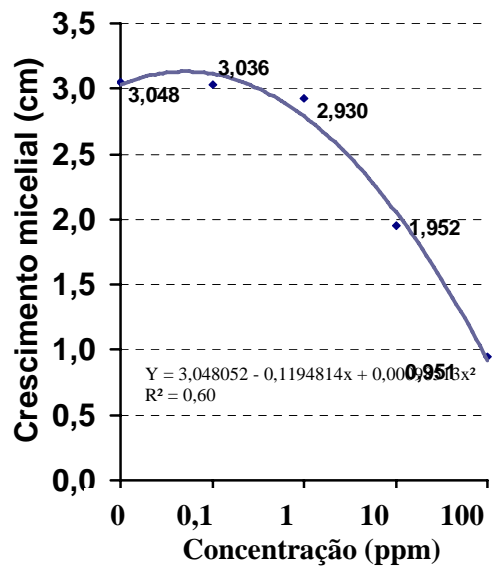
EH 1407



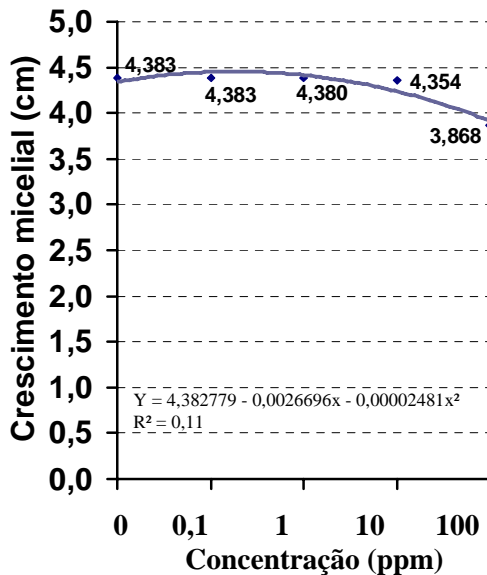
EH 1431



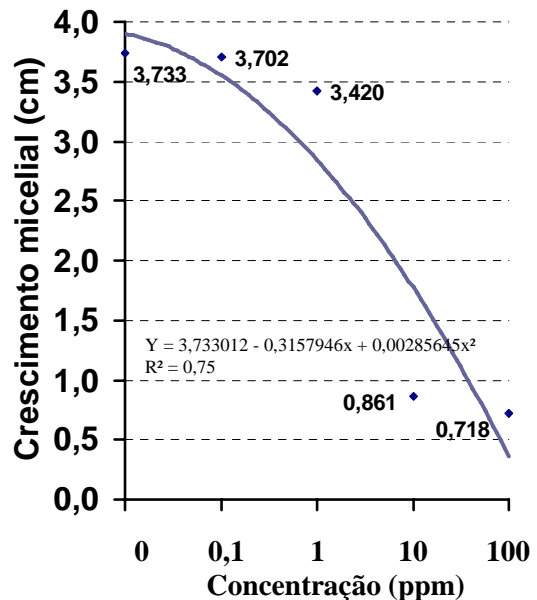
EH 1432

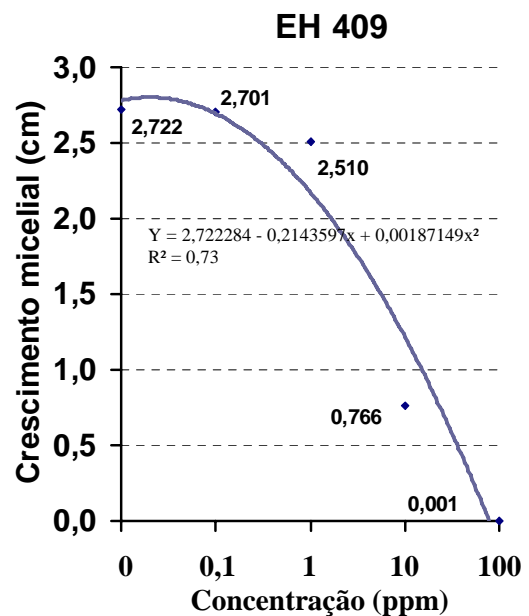
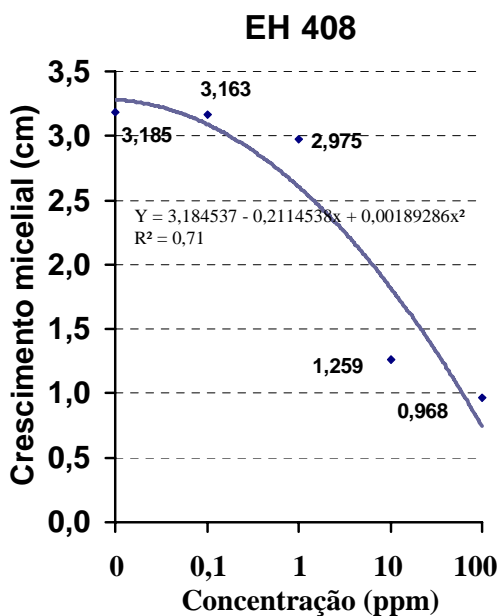
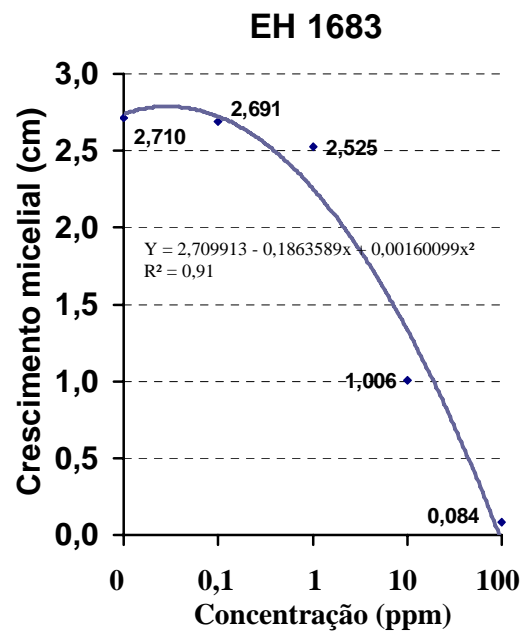
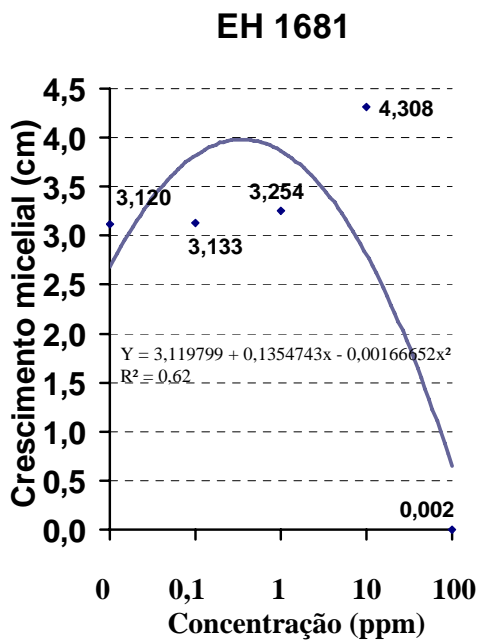
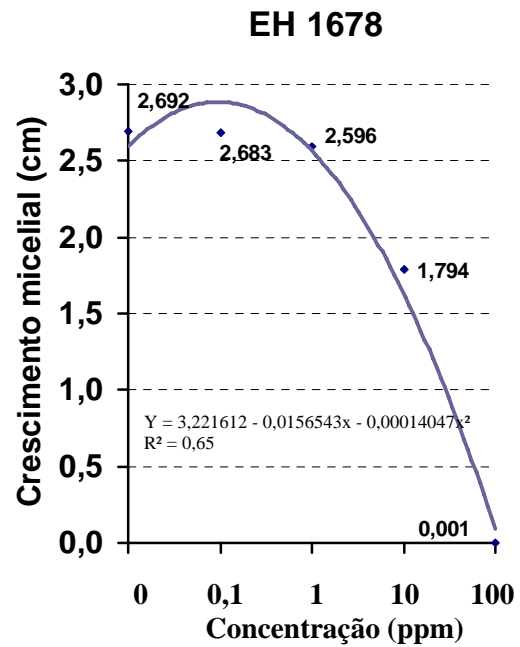
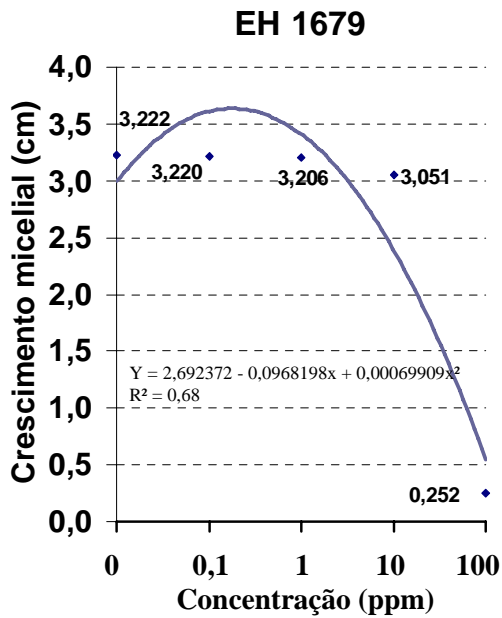


EH 1544

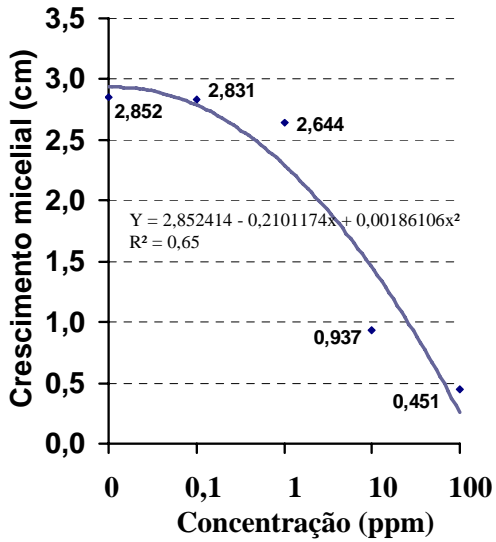


EH 1577

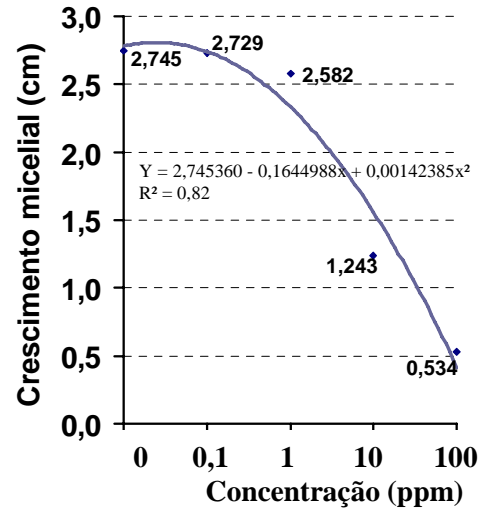




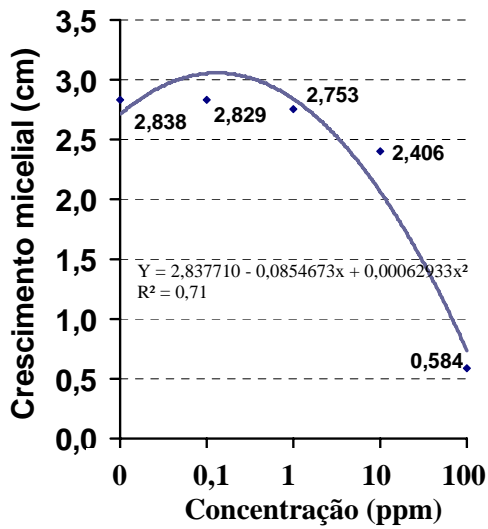
EH 441



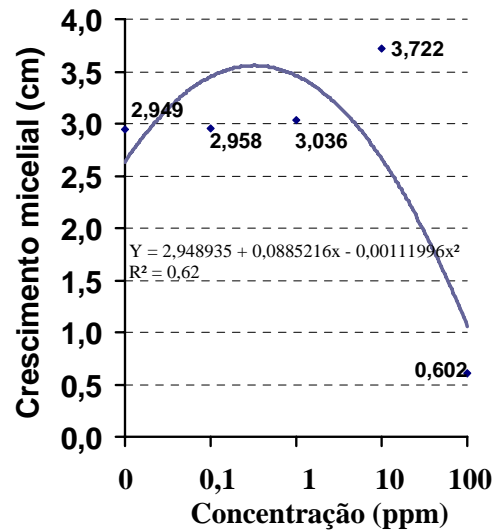
EH 488



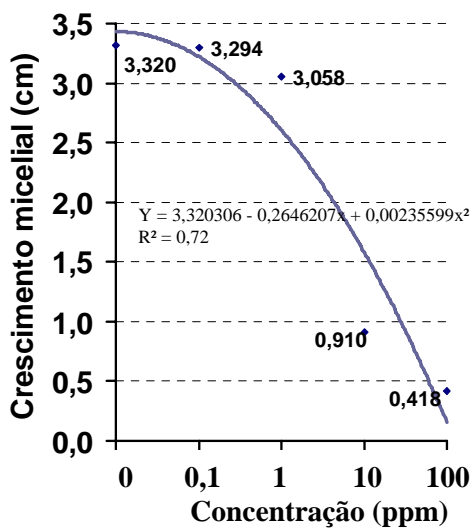
EH 494



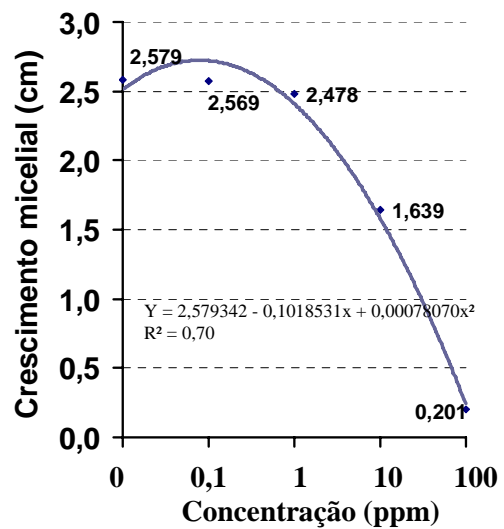
EH 509

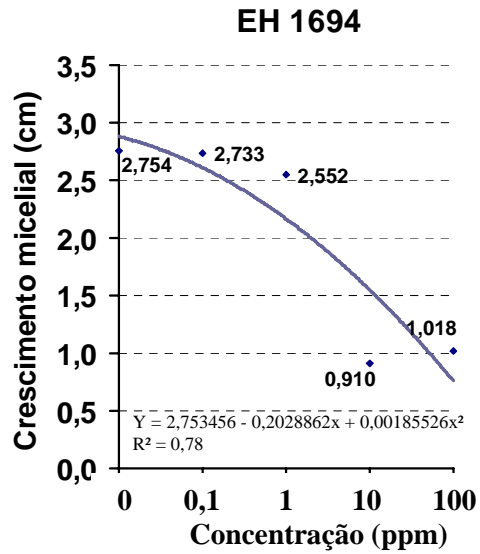
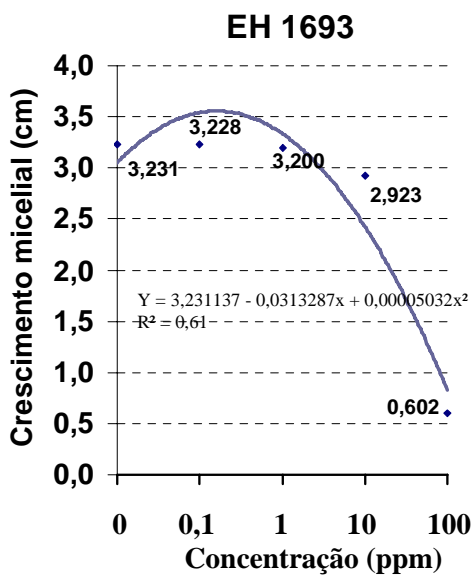
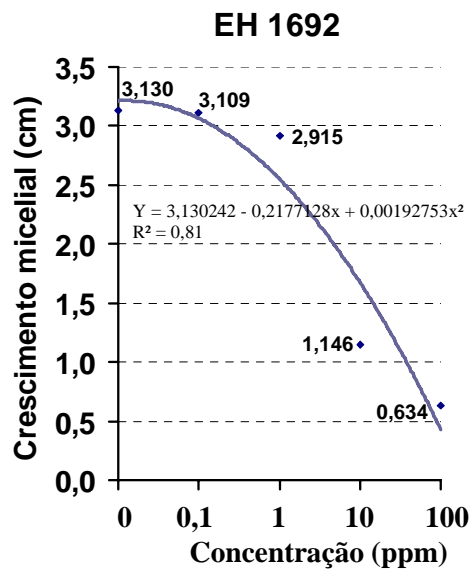
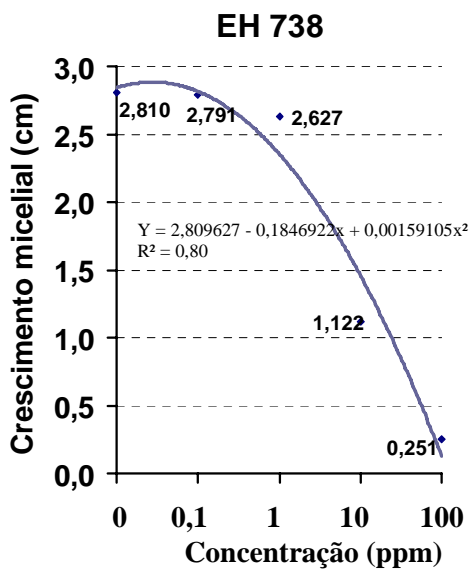
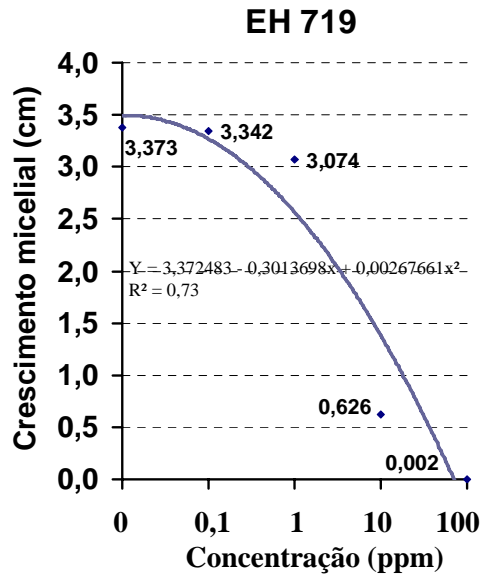
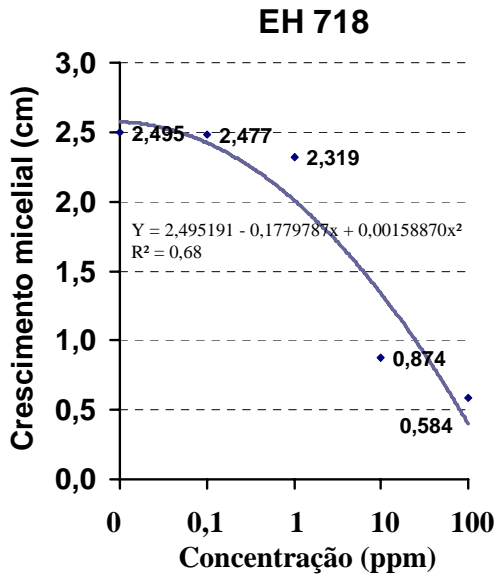


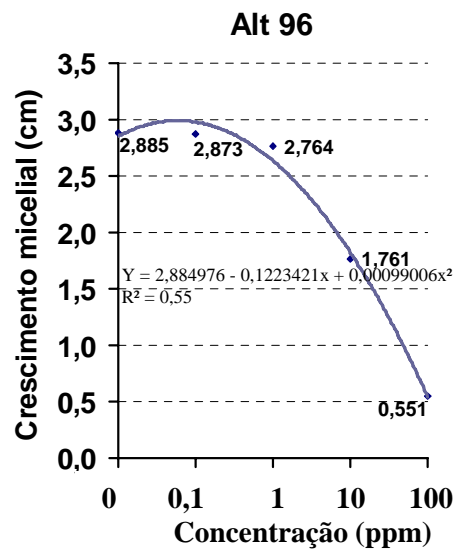
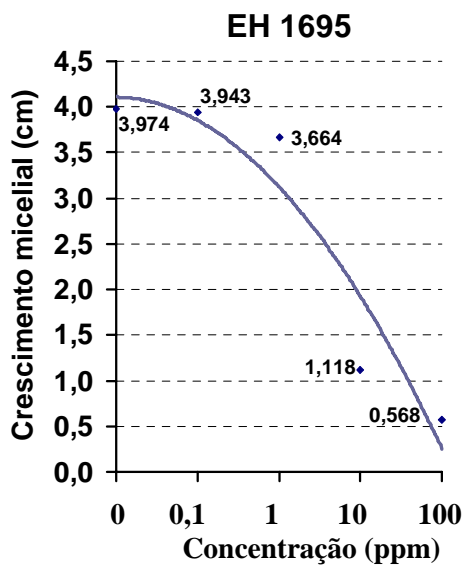
EH 669



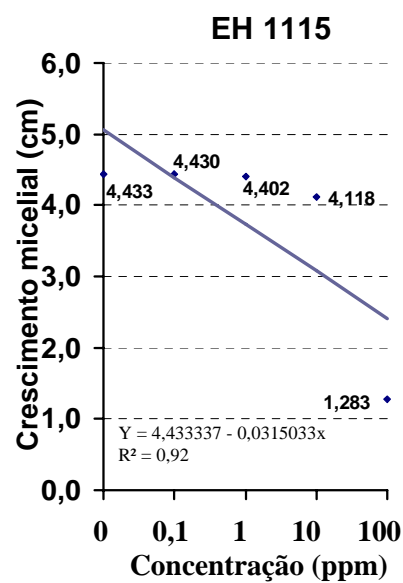
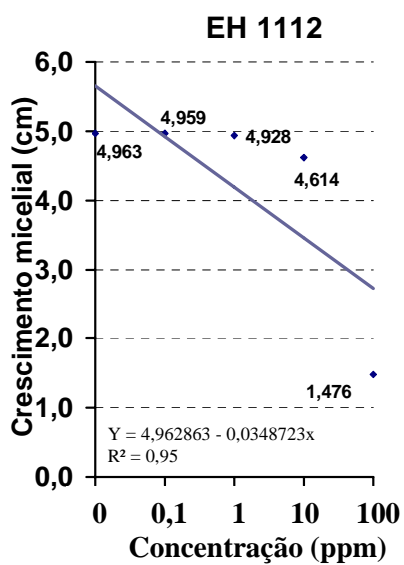
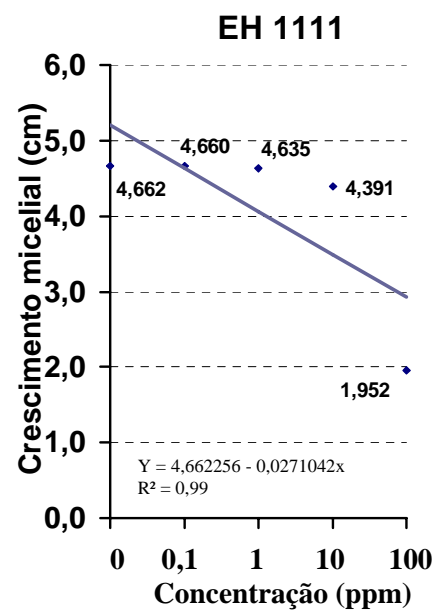
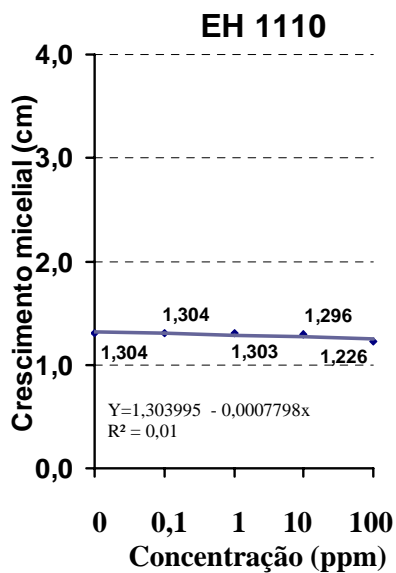
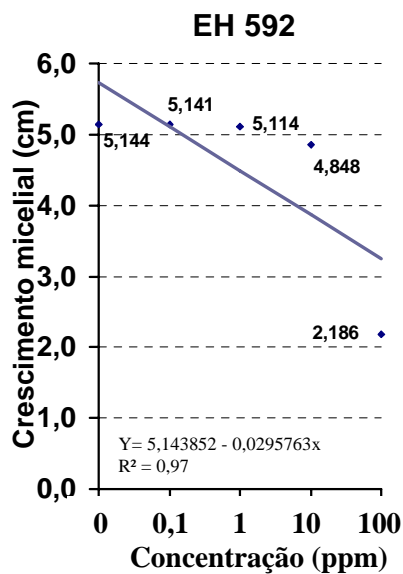
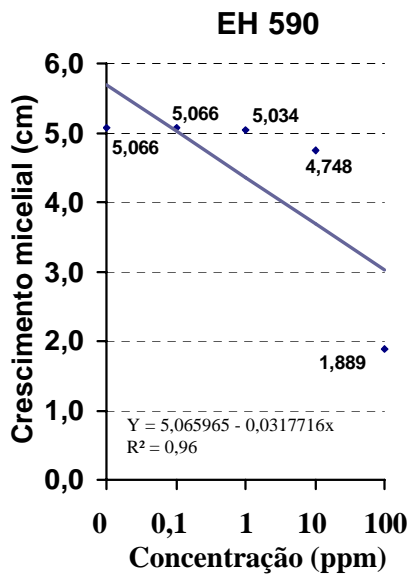
EH 713

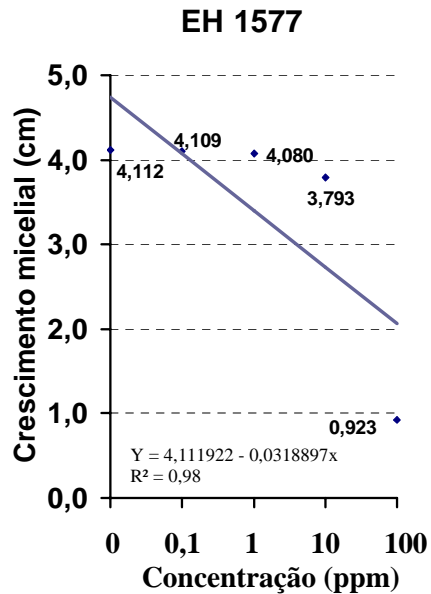
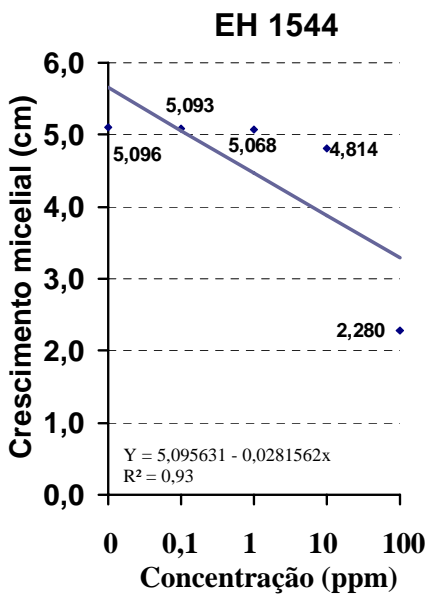
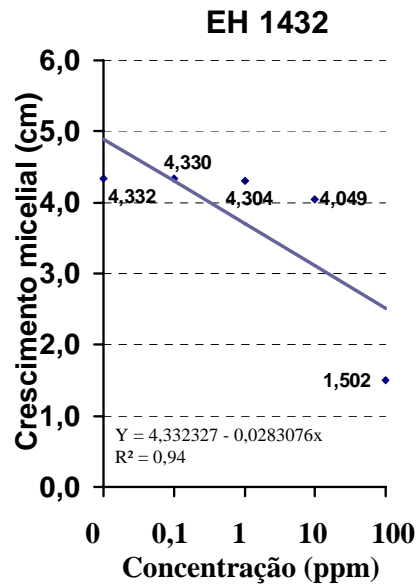
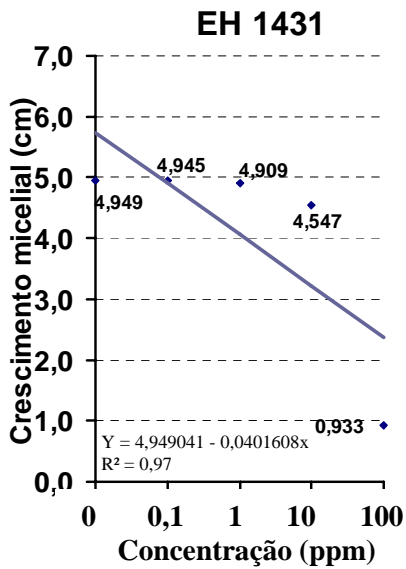
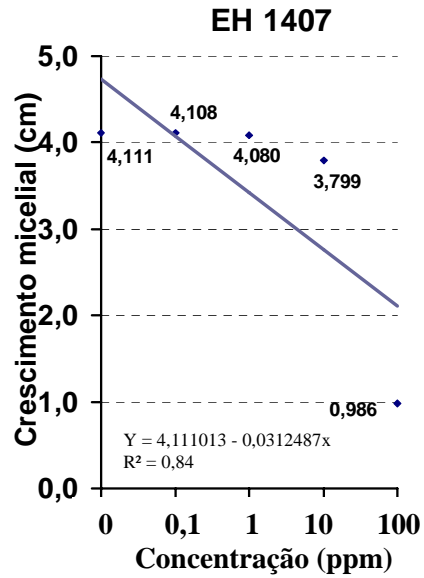
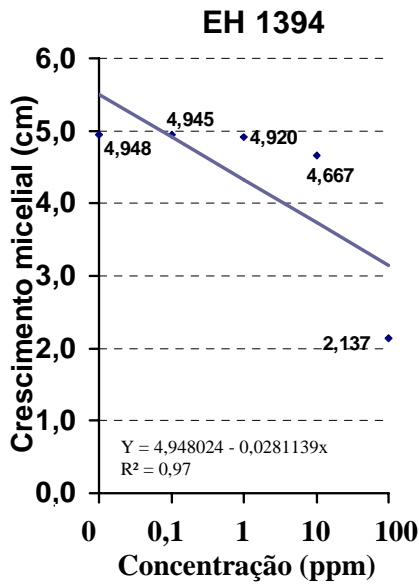


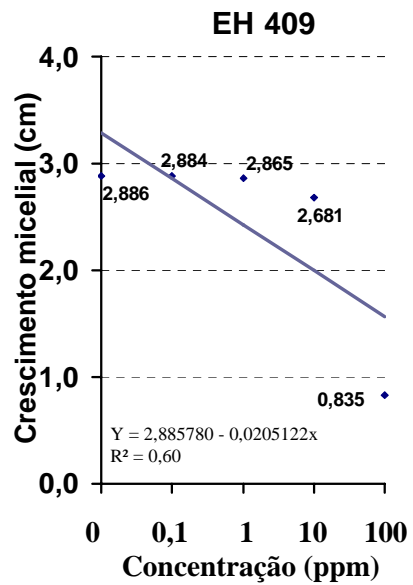
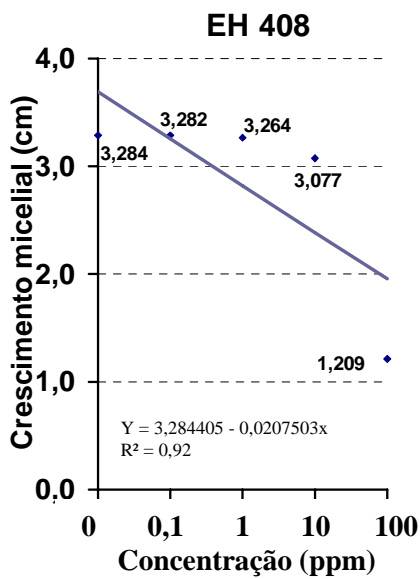
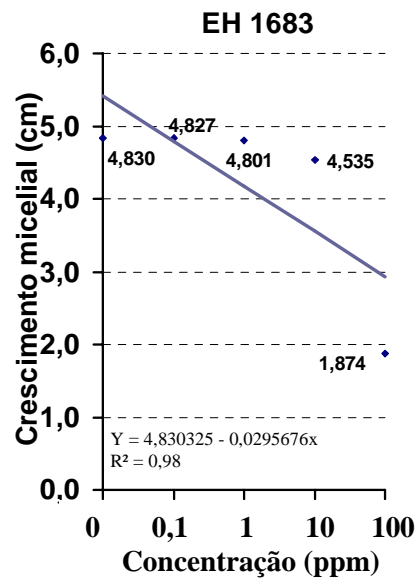
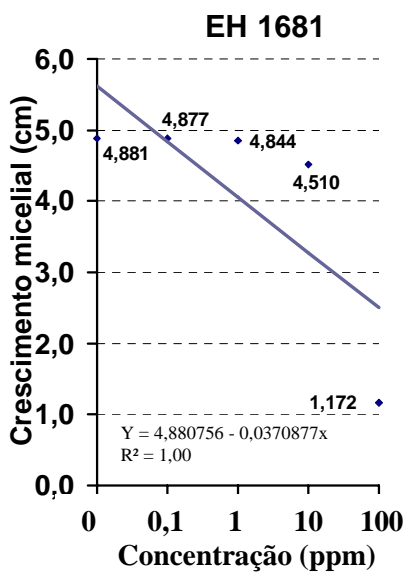
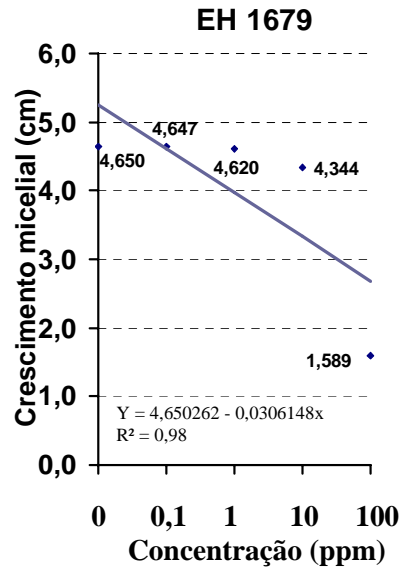
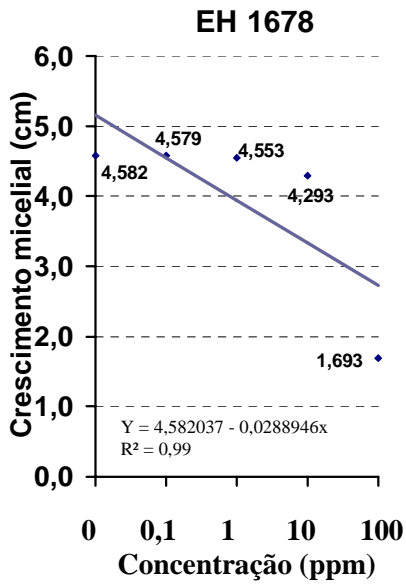


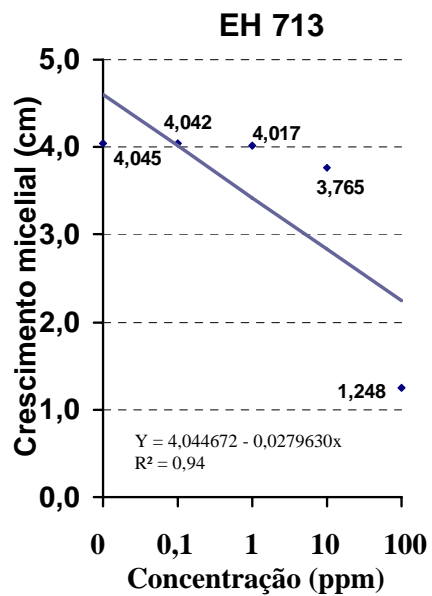
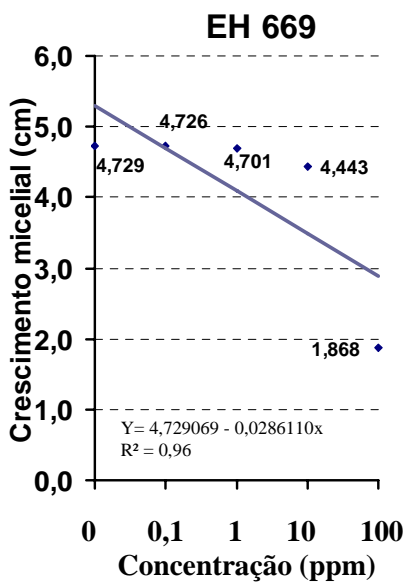
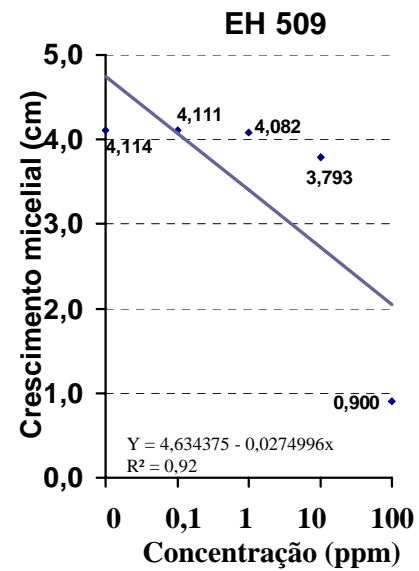
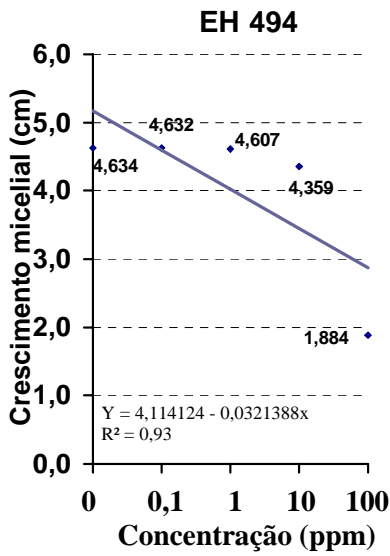
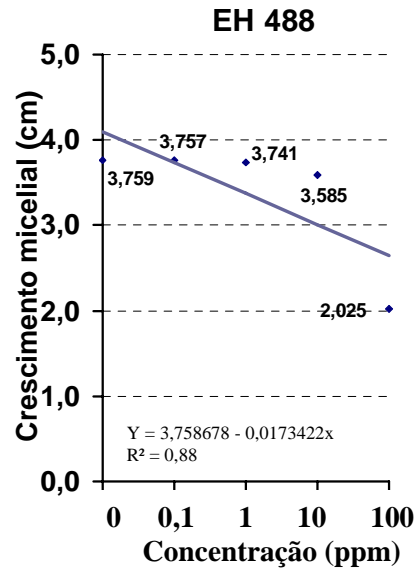
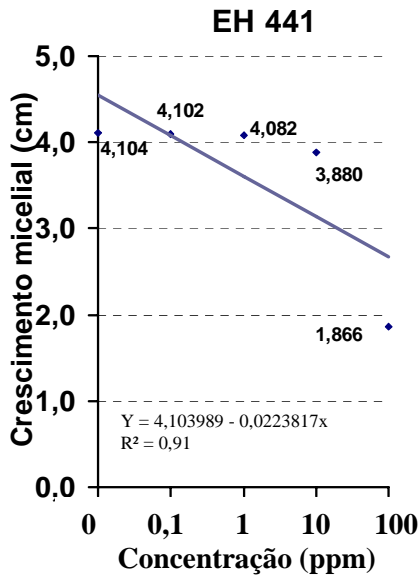


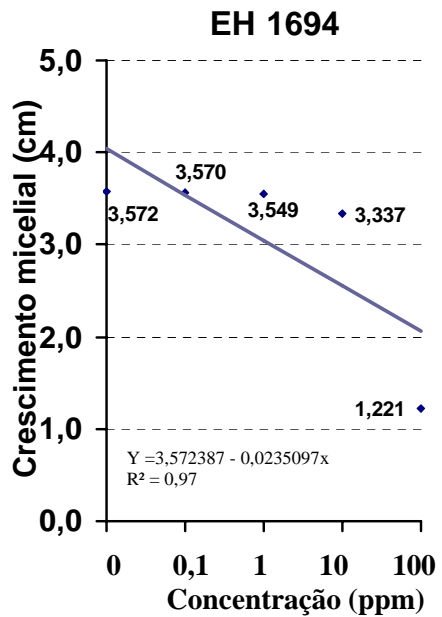
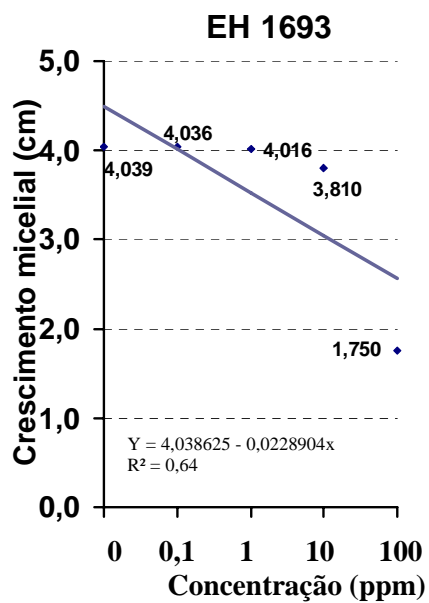
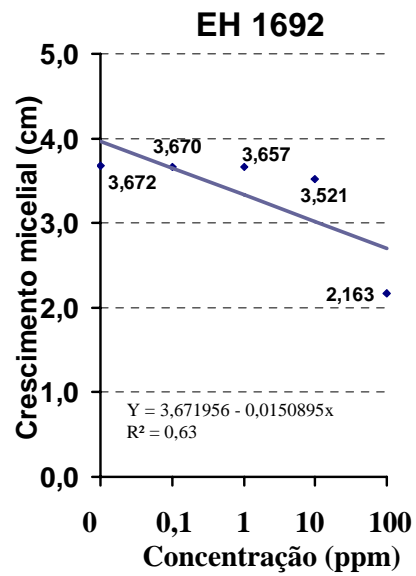
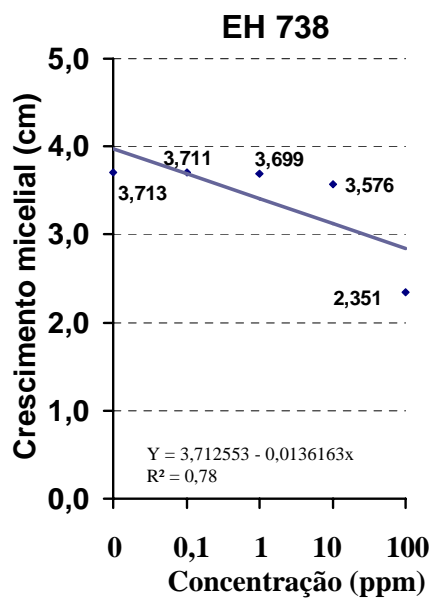
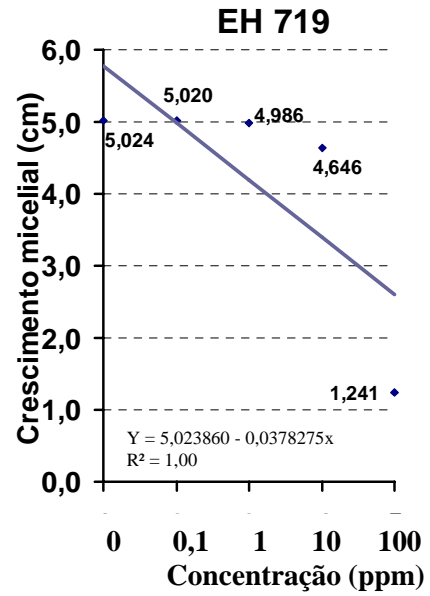
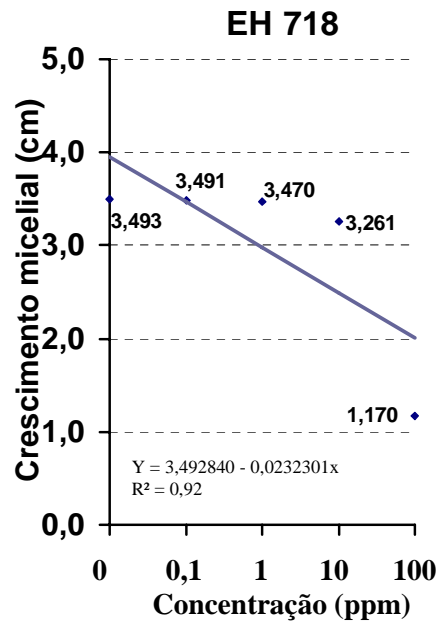
Gráficos A2. Curvas de crescimento de isolados de *Alternaria dauci* em função da concentração do fungicida iprodione (Rovral®).

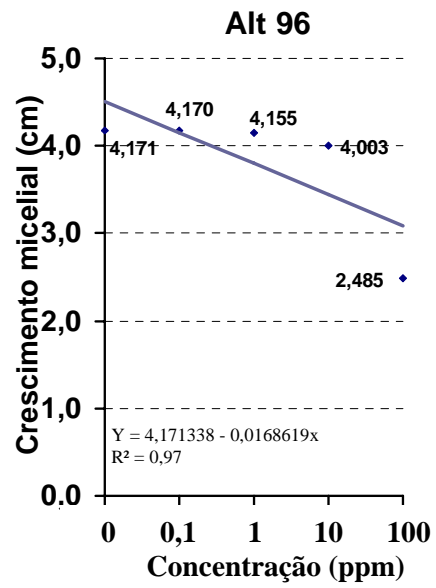
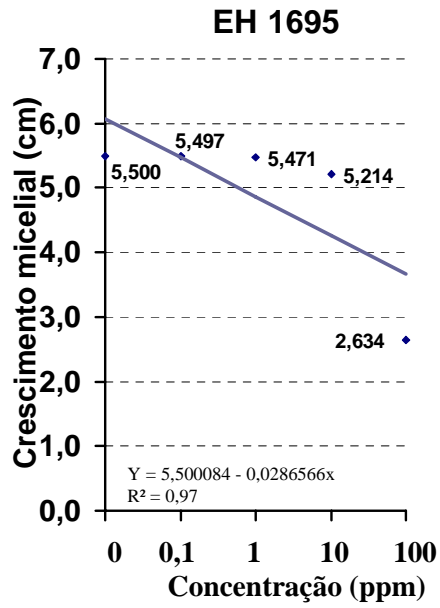












Gráficos A3. Curvas de crescimento de isolados de *Alternaria dauci* em função da concentração do fungicida mancozeb (Manzate 800®)