

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

Sara Padilha de Farias

Avaliação da sensibilidade de isolados de *Cercospora lactucae-sativae* Sawada a estrobilurinas e avaliação de componentes epidemiológicos entre isolados sensíveis e resistentes.

Rio Largo, AL
2015

Sara Padilha de Farias

Avaliação da sensibilidade de isolados de *Cercospora lactucae-sativae* Sawada a estrobilurinas e avaliação de componentes epidemiológicos entre isolados sensíveis e resistentes.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof.Dr. Ricardo Brainer Martins

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Edna Peixoto da Rocha Amorim

Rio Largo, AL
2015

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

F224a Farias, Sara Padilha de.

Avaliação da sensibilidade de isolados de *Cercospora lactucae-sativae* Sawada a estrobilurinas e avaliação de componentes epidemiológicos entre isolados sensíveis e resistentes. / Sara Padilha de Farias. – Maceió, 2015.

54f. : il. tabs., graf.

Orientador: Ricardo Brainer Martins.

Dissertação (mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2015.

Bibliografia: f. 46-54.

1. Fungicidas Qol. 2. *Lactuca sativa* L. 3. Azoxistrobina. 4. Mecanismos de resistência. I. Título.

SARA PADILHA DE FARIAS

Avaliação da sensibilidade de isolados de *Cercospora lactucae-sativae* Sawada a estrobilurinas e avaliação de componentes epidemiológicos entre isolados sensíveis e resistentes.

Dissertação submetida à banca avaliadora como requisito para conclusão do curso de Mestrado em Proteção de Plantas.

Prof. Dr. Ricardo Brainer Martins, Universidade Federal de Alagoas
Orientador

Banca examinadora:

Profa. Dra. Iraildes Pereira Assunção – Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. André Luiz Bezerra Galvão – Universidade Federal de Alagoas

Dedico aos meus queridos pais,
irmãos e sobrinhos, pois eles são
minhas jóias raras, presentes de
Deus em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que é minha luz, meu abrigo e minha força para seguir na caminhada.

À minha família, por todo apoio e carinho, em especial a minha mãe Elineuza Padilha de Farias e em memória de meu pai José João de Farias, aos meus queridos irmãos, José Karlisson Padilha de Farias, Reginaldo Padilha de Farias, José Marcelo Padilha de Farias, Samuel Padilha de Farias, André Padilha de Farias, Simone Padilha de Farias e Raquel Padilha de Farias. A vocês todo o meu carinho e eterno agradecimento.

A meu namorado Emerson Ferreira dos Santos, por todo apoio, contribuição no trabalho, atenção comigo em todos os momentos, enfim, por todo o amor.

A meu orientador Prof. Dr. Ricardo Brainer Martins, pela disponibilidade em orientar, apoio e contribuição no trabalho.

A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Edna Peixoto da Rocha Amorim pela disponibilidade em orientar, apoio e atenção.

Aos produtores rurais do agreste alagoano pelo fornecimento de amostras.

Ao técnico Sivaldo Souares Paulino pela contribuição em vários momentos durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos alunos bolsistas de iniciação científica Júlia Gabriela Rocha, Taciana Ferreira e Kledson Mendes pela grande contribuição no trabalho.

A todos do laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Alagoas - *Campus Arapiraca*.

Ao Centro de Ciências e aos professores do Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

Aos membros da banca.

RESUMO

A mancha de cercospora causada por *Cercospora lactucae-sativae* Sawada é uma doença comum em campos de produção de alface. A doença ocorre nas folhas, principalmente nas mais velhas, e o principal sintoma são manchas necróticas podendo gerar grandes prejuízos para o produtor. O controle da doença na região agreste de Alagoas é feito principalmente pelo uso de um fungicida do grupo químico das estrobilurinas, o qual é empregado mesmo sem ser registrado para o controle da doença na cultura. Estudos foram conduzidos para avaliar os efeitos desse fungicida sobre as populações do patógeno através de testes de sensibilidade e avaliação de componentes epidemiológicos. Foram selecionados 20 isolados e a variável testada foi o crescimento micelial em placas. Os testes de sensibilidade foram conduzidos com e sem a presença de ácido salicílico-hidroxâmico (SHAM). O fator de resistência (FR) foi determinado para averiguar o nível de resistência entre isolados menos sensíveis em relação aos mais sensíveis. Adicionalmente, quatro isolados (2 mais sensíveis e 2 menos sensíveis) foram utilizados para a avaliação dos seguintes componentes epidemiológicos: período de incubação (PI); período latente (PL); severidade da doença; e percentagem de germinação de esporos produzidos *in vivo* e *in vitro* (durante a patogênese). Para os isolados cuja concentração efetiva de i.a. capaz de inibir em 50% o crescimento micelial (CE_{50}) pôde ser estimada com e sem SHAM, os valores de CE_{50} foram de 0,07 a 1,98 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 0,007 a 0,339 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ausência e presença de SHAM, respectivamente. Para os demais isolados, com menor sensibilidade, denominados então como resistentes, ocorreram duas situações: i) a CE_{50} só foi estimada na presença de SHAM para dois isolados, 77D e 76C, cujos valores foram de, respectivamente, 11,32 e 13,52 $\mu\text{g ml}^{-1}$; e ii) a CE_{50} não pôde ser estimada com ou sem a presença de SHAM para quatro isolados (77B, 77C, 77E, e 76E). O FR variou de 1 a 26 para os isolados considerados sensíveis e de 147 a 175 para os isolados considerados insensíveis. Devido ao elevado FR encontrado, sugere-se que a mutação G143A pode estar ocorrendo nos isolados insensíveis. Com relação aos componentes epidemiológicos, os valores de PL e Severidade foram significativamente ($P=0,05$) menores e maiores, respectivamente, para os isolados resistentes. Para as demais variáveis, não houve diferença entre isolados sensíveis e resistentes.

Palavras-chave: *Lactuca sativa* L., azoxistrobina, fungicidas Qol, mecanismos de resistência.

ABSTRACT

The spot cercospora caused by *Cercospora lactucae-sativae* Sawada is a common disease in lettuce production fields. The disease occurs in the leaves, especially the older ones, and the main symptom is necrotic spots may generate large losses for the producer. Control of the disease in the wild region of Alagoas is mostly done by the use of a fungicide of the strobilurin chemical group, which is even used without being registered for the control of disease in the crop. Studies were conducted to evaluate the effects of the fungicide on the populations of the pathogen by susceptibility testing and evaluation of epidemiological components. We selected 20 isolates and the variable tested was the mycelial growth plates. The sensitivity tests were conducted with and without the presence of salicylhydroxamic acid (SHAM). The resistance factor (RF) was determined to ascertain the level of resistance among isolates less sensitive compared to the most sensitive. Additionally, four strains (two most sensitive and least sensitive 2) were used for epidemiological review of the following components: incubation period (IP); latent period (LP); severity of the disease; and percentage of germination of spores produced in vivo and in vitro (in the pathogenesis). To effectively isolates whose concentration was able to inhibit 50% of the mycelium growth (EC50) can be estimated with and without SHAM, EC50 values were 0.07 to 1.98 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and from 0.007 to 0.339 $\mu\text{g ml}^{-1}$ SHAM absence and presence, respectively. For the remaining isolated, with lower sensitivity, so called as resistant, there were two situations: i) the EC50 was estimated only in the presence of SHAM to two isolated, 77D and 76C, whose values were, respectively, 11.32 and 13, 52 $\mu\text{g ml}^{-1}$; and ii) the EC50 could not be estimated with or without the presence of SHAM for four isolates (77B, 77C, 77E, and 76E). FR ranged from 1 to 26 for the isolated considered sensitive and 147-175 for the isolated considered insensitive. Due to the high RF found, it is suggested that the G143A mutation may be isolated occurring insensitive. With regard to the epidemiological components, PL and severity values were significantly ($P = 0.05$) lower and higher, respectively, for the resistant isolates. For the other variables, there was no difference between sensitive and resistant isolates.

Keywords: *Lactuca sativa* L., azoxystrobin, Qol fungicides, resistance mechanisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Áreas de produção comercial de alface em que isolados de *Cercospora lactucae-sativae* foram obtidos. Cada área recebeu um número único (a numeração de áreas de produção orgânicas são precedidas pela letra O) e as que estão envoltas por um círculo pontilhado, indicam as áreas de origem dos isolados utilizados nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.....28
- Figura 2. Etapas realizadas para obtenção de isolados monospóricos de *Cercospora lactucae-sativae*. folhas com sintomas de cercospora em câmara úmida (A); esporos produzidos sobre as lesões (B); esporos espalhados sobre a placa de petri (C) e colônias desenvolvidas em BDA (D).....29
- Figura 3. Preparo de suspensão de conídios de *Cercospora lactucae-sativae* para ser utilizada na inoculação (A); inoculação (B e C); câmara úmida (D e E); e observação dos primeiros sintomas (F).....32

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1. Período de incubação (PI) de isolados de *C. lactucae-sativae* inoculados em mudas de alface em casa de vegetação, sendo dois isolados sensíveis (5H e 90E) e dois isolados insensíveis (76E e 77C) a azoxistrobina. para comparação das médias foi aplicado o teste Tukey (P=0,01).....41
- Gráfico 2. Período latente (PL) de isolados de *C. lactucae-sativae* inoculados em mudas de alface em casa de vegetação, sendo dois isolados sensíveis (5H e 90E) e dois isolados insensíveis (76E e 77C) a azoxistrobina. para comparação das médias foi aplicado o teste Tukey (P=0,01).....41
- Gráfico 3. Severidade da cercosporiose em mudas de alface inoculadas com isolados de *C. lactucae-sativae*, sendo dois isolados sensíveis (5H e 90E) e dois isolados insensíveis (76E e 77C) a azoxistrobina. para comparação das médias foi aplicado o teste Tukey (P=0,01).....42
- Gráfico 4. Percentagem de germinação de esporos *in vivo* de isolados de *C. lactucae-sativae* inoculados em mudas de alface em casa de vegetação e *in vitro* de isolados de *C. lactucae-sativae* cultivados em laboratório, sendo dois isolados sensíveis (5H e 90E) e dois isolados insensíveis (76E e 77C) a azoxistrobina.....44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Sensibilidade de populações de *Cercospora lactucae-sativae* a azoxistrobina testados *in vitro* com e sem a adição de SHAM.....36
- Tabela 2. Sensibilidade de isolados de *C. lactucae-sativae* a azoxistrobina e cálculo do fator de resistência (FR) para comparação da sensibilidade dos isolados insensíveis em relação ao isolado mais sensível.....39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Aspectos inerentes a cultura da alface.....	17
2.2 Mancha de cercospora em alface.....	19
2.3 Aspectos relacionados aos fungicidas	21
2.4 Resistência a fungicidas e adaptabilidade	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Origem dos isolados e obtenção de isolados monospóricos	27
3.2 Testes de sensibilidade e efeito da respiração alternativa na sensibilidade	29
3.3 Componentes epidemiológicos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Origem dos isolados e obtenção de isolados monospóricos	34
4.2 Testes de sensibilidade e efeito da respiração alternativa na sensibilidade	34
4.3 Componentes epidemiológicos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	40
5 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O estado de Alagoas é autossuficiente na produção de hortaliças folhosas, como alface, couve, coentro e cebolinha, sendo a região Agreste do estado, mais especificamente o município de Arapiraca, responsável por 98% do volume destas olerícolas comercializadas na Ceasa, em Maceió (MONTEIRO, 2008a, 2008b; AGENCIA ALAGOAS, 2010). A elevada demanda por esses produtos, ciclo de cultivo curto e a possibilidade de produção durante o ano inteiro em função das condições edafoclimáticas, garante aos agricultores, pequenos produtores em sua maioria, trabalho permanente e retorno financeiro rápido e regular. Apesar da importância sócio-econômica da cultura para região Agreste, os produtores carecem de assistência técnica para manejar problemas fitossanitários que interferem negativamente na qualidade e quantidade do que é produzido (MONTEIRO, 2008a, 2008b). Nas áreas de cultivo de alface (*Lactuca sativa* L.), a mancha de cercospora constitui um dos principais problemas fitossanitários da cultura (SANTOS et al., 2014). A doença é causada pelo fungo *Cercospora lactucae-sativae* Sawada (sin. *Cercospora longissima* (Cugini) Saccardo) (GROENEWALD et al, 2013), e o seu principal sintoma ocorre nas folhas, correspondendo a manchas circulares pequenas, de coloração bronzeada a parda, tendo a região central uma coloração mais clara, acinzentada. Sob condições favoráveis as manchas aumentam de tamanho e podem coalescer, comprometendo, assim, grande parte do tecido foliar. Normalmente os sintomas iniciam nas folhas mais velhas e progredem para as mais novas. Por causar danos diretamente sobre as folhas, que constitui o produto comercializável da cultura, reduz a qualidade e volume da produção, resultando, assim, em perdas para o produtor (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 1998). As colônias do fungo apresentam coloração variando de verde-escuro a marrom-escuro. Os conídios são formados sobre conidióforos anfígenos ou fasciculados, marrom-oliváceos, não ramificados e multiseptados (PAVAN; KUROZAWA, 1997; TONIN et al., 2011). Os conídios são hialinos, multiseptados, com 11-170 µm de comprimento e 3,8-7,5 µm de diâmetro, afinando-se para extremidade distal (HSIEH; GOH, 1990; RAID, 1997).

O controle químico é amplamente utilizado pelos olericultores de Arapiraca, sendo o emprego de fungicidas dos grupos químicos dos triazóis (ingrediente ativo: difenoconazol), e, principalmente, das estrobilurinas (azoxistrobina) os mais

comercializados/empregados para cultura da alface na região (comunicação pessoal). Posto isto, convém tecer duas considerações importantes: i) os fungicidas destes grupos não são registrados no Brasil para uso no manejo da mancha de cercospora em alface, mas sim para o controle de outra mancha foliar, causada pelo fungo *Septoria lactucae* (AGROFIT, 2015); e ii) a mancha foliar de maior prevalência, presente em 83% das áreas de produção (constatado em trabalho de levantamento fitopatológico realizado durante os anos de 2013/2014 na região), é a mancha de cercospora (SANTOS et al., 2014). Assim, é possível deduzir duas situações para que os produtores estejam baseando o controle da doença no uso desses fungicidas. A primeira é a diagnose errada, confundindo a mancha de septoria com a mancha de cercospora, e a segunda, e possivelmente a mais correta, é a aplicação deliberada. Mas, independente da situação, o fato é que as populações de *C.lactucae-sativae* associadas à cultura estão sendo expostas aos fungicidas supracitados, os quais, por não haver recomendação técnica, podem estar sendo empregados em concentração e frequência de aplicação inapropriadas.

Os fungicidas pertencentes ao grupo químico estrobilurina, também denominados como fungicidas QoI (sigla para o termo em inglês Quinone outside inhibitors), atuam por meio da inibição da respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo C₁, interferindo, assim, diretamente na formação de ATP e, conseqüente, no metabolismo energético do fungo alvo. São eficientemente empregados no controle de Ascomicetos, Basidiomicetos, fungos mitospóricos e Oomicetos (DELEN; TOSUN, 2004; SOUZA; DUTRA, 2003). Apesar da elevada eficiência, o surgimento de resistência na população dos patógenos alvos tem sido relatado com razoável frequência.

A resistência as estrobilurinas pode decorrer da ação de três mecanismos distintos: mutação pontual em diferentes posições do gene do citocromo b (*CYTB*), utilização de respiração alternativa e atuação de “bombas de efluxo”. As mutações pontuais no *CYTB* são as mais bem estudadas e, aparentemente, as de maior importância. Elas podem levar a substituição do aminoácido fenilalanina por leucina ou valina no códon 129 (F129L e F129V, respectivamente), glicina por arginina no códon (G137R), ou glicina por alanina ou por serina no códon 143 (G143A e G143S, respectivamente) (MA E MICHAILIDES, 2005; MALANDRAKIS et al., 2006 (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). A utilização de respiração alternativa envolve o

uso de uma oxidase alternativa que possibilita o desvio do complexo III no ciclo de respiração e, conseqüentemente, evita a ação das estrobilurinas (ZIOGAS; BALDWIN; YOUNG, 1997). Por fim, a ação de proteínas ligadas à membrana celular, com a função de transportar compostos tóxicos para fora da célula, as bombas de efluxo, também já foram detectadas em associação com resistência. Para este último mecanismo, entretanto, a ação parece ser menor, uma vez que os microrganismos estudados também possuíam mutações no *CYTB* (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al. 2008).

Devido o elevado número de relatos de resistência nas populações alvos das estrobilurinas, a qual pode ser detectada em áreas de cultivo em poucos ciclos da cultura hospedeira após o início do controle, o Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) atribuiu aos fungicidas deste grupo a maior classificação de risco associado a fungicidas. Por exemplo, dois anos após o início do uso das estrobilurinas, os primeiros isolados resistentes, de *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* foram detectados em plantios de cereais, na Alemanha (BERTLETT et al., 2002). Outros casos de resistência já foram relatados para outros patógenos, como *Mycosphaerella graminicola*, *Plasmopara viticola*, *Venturia inaequalis*, *Mycosphaerella fijiensis* var. *Difformis*, *Cercospora beticola*, *Cercospora graminicola*, *Cercospora sojina*, entre outros (BLIXT et al., 2009; FONTAINE et al., 2009; ISHII et al., 2009; WALKER et al., 2009; ZHANG et al., 2009; FURUYA et al., 2009; KILDEA et al., 2010; LESNIAK et al., 2011; VEGA et al., 2012; RALLOS et al., 2014; FREDERICK et al., 2014; ROSENZWEIG et al., 2014). Embora a resistência a fungicida seja em si um problema para o controle, estudos têm evidenciado que o seu impacto, a velocidade com que surge e predomina na população do patógeno, chegando a inviabilizar o emprego do fungicida em um curto período de tempo, varia para cada patossistema. Por exemplo, para *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Venturia inaequalis*, a resistência espalhou-se rapidamente. Já para *Alternaria solani*, *Cercospora beticola*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Micosphaerella musicola*, *Micosphaerella pinodes*, *Penicillium digitatum*, *Venturia cerasi*, o impacto estimado tem sido menor (FRAC, 2014).

Dentre os fatores que podem influenciar o impacto da resistência no controle, destaca-se o local em que ocorre a mutação e a adaptabilidade dos indivíduos resistentes (MALANDRAKIS et al., 2006; MALANDRAKIS et al., 2011). O local em que ocorre a mutação no *CYTB* tem relação com o nível de resistência, sendo a mutação G143A a mais frequente em diferentes espécies de fungos fitopatogênicos. Generalizando, os

indivíduos portadores desta mutação possuem fator de resistência (sensibilidade de indivíduos resistentes / sensibilidade de indivíduos sensíveis) maior do que 100 (MA; MICHAILIDES, 2005; ZHANG, 2012). Após surgimento desses mutantes, outros aspectos como a adaptabilidade, influenciarão no aumento/decrécimo da resistência na população do patógeno (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2001). A adaptabilidade, ou *fitness*, é uma variável que expressa a eficiência competitiva de indivíduos resistentes *versus* indivíduos sensíveis. Em outras palavras, é a capacidade de uma determinada linhagem em se desenvolver, reproduzir e sobreviver em relação à outra linhagem exposta a iguais condições (GHINI; KIMATI, 2002). Isto significa que é mais adaptado o indivíduo que deixar mais descendentes para geração seguinte da população a qual ele faz parte (LOPES; ROSSO, 2005). Assim, fatores potencialmente ligados à eficiência de fungos fitopatogênicos em causar doença, como patogenicidade, virulência, produção de esporos e a germinação destes, período de incubação, etc, têm sido mensurados como forma de estimar a adaptabilidade (KIM; XIAO, 2011; ZHANG, 2012; RALLOS et al., 2014). Os custos de aptidão em indivíduos resistentes as estrobilurinas variam entre diferentes espécies de fitopatógenos (ZHENG; OLAYA; KOLLER, 2000; CHIN et al., 2001; AVILA-ADAME; KÖLLER, 2003). Como exemplo desta variação, foi observada maior virulência para isolados resistentes de *Cercospora sojina* (ZHANG, 2012) e menor virulência para isolados resistentes de *Magnaporthe grisea* (AVILA-ADAME; KÖLLER, 2003). Em alguns casos, como em estudo realizado com *Botrytis cinerea*, não são observadas diferenças de adaptabilidade entre isolados resistentes e sensíveis (KIM; XIAO, 2011).

Além de características ligadas aos modos de ação do fungicida e aos mecanismos de resistência, aspectos inerentes à biologia do fitopatógeno alvo também podem influenciar no risco de surgimento de resistência. São considerados patógenos mais propensos ao surgimento de resistência os policíclicos, com dispersão por meio de esporos no espaço e no tempo, ocorrência de recombinação sexual e a adaptabilidade de indivíduos resistentes (já discutido acima) (FRAC, 2014). Excetuando-se a reprodução sexual, ainda não relatada para *C. lactucae-sativae*, e o mecanismo de resistência (ainda não estudado para espécie), *C. lactucae-sativae* se enquadra nas demais por possuir ciclo de doença curto (4 a 8 dias) e ser disseminada por esporos (conídios, os quais são produzidos abundantemente sobre as lesões da doença nas folhas) (SHERF; MACNAB, 1986).

Considerando a exposição das populações de *C. lactucae-sativae* associadas às lavouras de alface comercial em Arapiraca a fungicidas contendo a azoxistrobina na sua composição e a frequência com que casos de resistência são relatados para estes fungicidas, o presente trabalho objetivou avaliar a sensibilidade de isolados de *C. lactucae-sativae* oriundos de áreas de cultivo com e sem histórico de aplicação de fungicidas, cultivos convencionais e orgânicos, respectivamente. As seguintes hipóteses foram testadas: i) isolados oriundos de plantios convencionais e orgânicos de alface possuem o mesmo nível de resistência *in vitro* a azoxistrobina; e ii) o valor de indicadores de adaptabilidade *in vivo* (período de incubação, período latente, severidade e germinação de esporos produzidos) e *in vitro* (germinação de esporos) são iguais para isolados resistentes e sensíveis.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos inerentes a cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta pertencente à família *Asteraceae*, originária da região sul da Europa e Ásia Ocidental (RESENDE et al., 2007; FILGUEIRA, 2008; HENZ; SUINAGA, 2009). Apesar de ser originária de uma região de clima temperado, existem hoje muitas variedades adaptadas a regiões tropicais disponíveis (HENZ; SUINAGA, 2009; KOBORI; BRUNELLI; GLORIA, 2011). As cultivares classificadas em dois grupos, folhas lisas e folhas crespas. O grupo das folhas lisas ou manteiga é caracterizado por reunir plantas que podem ou não formar cabeça compacta e possuem folhas delicadas, de coloração verde amarelada. Deste grupo destacam-se as cultivares Regina, Elisa, Brasil 303, Daniele e Quatro estações, cujo período de colheita varia de 55 a 85 dias. O segundo grupo, das folhas crespas, compreende plantas que não formam cabeça e possuem folhas mais resistentes. São cultivares importantes deste grupo a Grand Rapids, Verônica, Marianne, Hortência, Renata, Crespa Loura e Vanessa, cujo período de colheita varia de 60 a 80 dias (RESENDE et al., 2007). Por essa razão, a alface é produzida em todas as regiões do Brasil, sendo a hortaliça folhosa de maior consumo no país - o que se atribui, em grande parte as suas características organolépticas e baixo preço de venda (RESENDE et al., 2007).

No Brasil a produção de alface é realizada em sistemas de cultivo orgânico, convencional e hidropônico (MIYAZAWA; KHATOUNIAN; PENHA, 2001; FAVARO-TRINDADE et al., 2007; RESENDE et al., 2007; SOUZA, 2012). A qualidade, custo de produção, problemas fitossanitários, dentre outras características, variam em função do sistema adotado (SILVA et al., 2011; SOUZA, 2012).

A agricultura orgânica apresenta maior vantagem em relação à agricultura convencional em alguns aspectos, visto pela qualidade dos produtos adquiridos e preservação do meio ambiente, por meio do cultivo mínimo e exclusão do uso de produtos artificiais, tais como os organismos geneticamente modificados (OGM) e certos insumos agrícolas externos, como agrotóxicos, aditivos e fertilizantes (MIGUEL; GRIZOTTO; KURLANETO, 2010; MORGERA; CARO; DURÁN, 2012). O controle de pragas e doenças nesse sistema ocorre por meio da utilização de extratos de plantas, caldas a base de cobre e enxofre, controle biológico e métodos físicos e mecânicos (RESENDE et al., 2007), em que os produtos utilizados são de baixa toxicidade e só devem ser preconizados se a cultura sofrer risco imediato (ECOSERT, 2008), sendo recomendados apenas os agrotóxicos orgânicos, que pertencem à classe toxicológica IV (pouco tóxico) (EMBRAPA, 2007). Porém, algumas desvantagens são inerentes ao sistema, tais como: a produção em pequena escala; instabilidade decorrente da baixa capacitação gerencial por parte dos produtores; escassez de pesquisa científica em agricultura orgânica; falta de preparo dos extensionistas da rede pública para o atendimento aos produtores; maior demanda de mão-de-obra; dificuldades de acesso ao crédito bancário; custos de certificação (garantia do selo orgânico) e de acompanhamento das exigências da certificação; efeitos ambientais negativos caso as práticas de cultivo forem realizadas de forma inadequada, como exemplo, o favorecimento ao desenvolvimento de fitopatógenos devido ao manejo inadequado do solo, entre outros (CAMPANHOLA; VALARINE, 2001).

Em contrapartida, o aumento da produção mundial de alimentos e diminuição dos custos de produção, deve-se ao sistema convencional (KAMIYAMA, 2011). No entanto, algumas desvantagens podem ser citadas tais como: o uso intensivo de pesticidas, o monocultivo e o preparo intensivo do solo, o que pode resultar em degradação ambiental, erosão do solo, contaminação da água, poluição do ar, perda de biodiversidade e desertificação (PRIMAVESI, 2003; LOPES; LOPES, 2011;

MORGERA; CARO; DURÁN, 2012). O controle de doenças acontece principalmente pelo uso de diferentes fungicidas recomendados para a cultura (ANDREI, 2009).

Por outro lado, o sistema de produção hidropônico propicia uma maior uniformidade na produção; maior produção por área; redução do ciclo de cultivo; menor gasto de mão-de-obra; uso racional de água e fertilizantes; produtos limpos e de qualidade. Porém, necessita de maior investimento inicial, comparado ao cultivo convencional; necessidade de conhecimentos técnicos e dependência de energia elétrica; e a vulnerabilidade do sistema com relação à ocorrência de epidemias de podridões radiculares. O controle de doenças nesse sistema ocorre através de métodos preventivos e do controle biológico, já que não existem fungicidas registrados para culturas hidropônicas no Brasil (CORRÊA; BETTIOL, 2009).

No agreste alagoano a produção de hortaliças, sobretudo as folhosas, é feita no sistema de cultivo convencional. Na região, a alface e outras folhosas como o coentro e a cebolinha são as principais hortaliças produzidas. A região tornou-se auto-suficiente na produção de folhosas, sendo o excedente destinado, majoritariamente, à comercialização na Ceasa, em Maceió, onde atende a 98% da demanda do Centro de Abastecimento. A elevada procura, curto período para produção (entre dois e três meses), e a possibilidade de produção durante o ano inteiro, garante ao pequeno produtor trabalho permanente e retorno financeiro rápido e regular. Apesar da importância da produção de hortaliças e dos benefícios gerados para os produtores, estes reclamam da falta de assistência técnica para manejar problemas fitossanitários, o que tem ocasionado problemas na qualidade e quantidade dos produtos em função da ocorrência de pragas e doenças (MONTEIRO, 2008a, 2008b).

2.2 Mancha de cercospora em alface

A mancha de cercospora é muito comum em campos de produção de alface, tanto em cultivo protegido como em campo (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 1998). O agente causal da doença pertence à classe Deuteromicetos e se reproduz assexuadamente. Os sintomas afetam, principalmente, as folhas mais velhas e correspondem a manchas foliares de coloração pardacenta e formato circular com centro mais claro. Com o passar do tempo a intensidade da doença aumenta, em função do

coalescimento e/ou surgimento de novas lesões, e provoca depreciação de valor comercial do produto (PAVAN; KUROZAWA, 1997; TONIN et al., 2011). Em campo, os sinais da doença são facilmente visualizados a olho nu, ou com auxílio de uma lupa de pequena magnitude. Os sinais correspondem às estruturas reprodutivas, conidióforos e conídios do patógeno e, embora sejam expressas em ambas as faces da folha, predominam na face abaxial. Os conidióforos são multiseptados, anfígenos ou fasciculados e de coloração marrom-olivácea. A partir dos conidióforos são produzidos conídios hialinos, multiseptados e filiformes, com a porção basal mais larga e extremidade apical mais fina. As dimensões de comprimento e largura variam, respectivamente, de 11 a 170 µm e de 3,8 a 7,5 µm. Em relação a aspectos culturais, o fungo apresenta coloração variando de verde-escuro a marrom-escuro (HSIEH; GOH, 1990; RAID, 1997; PAVAN; KUROZAWA, 1997; TONIN et al., 2011). A dispersão do patógeno ocorre predominantemente pelo vento, sendo a água das chuvas e da irrigação outros importantes agentes. Os conídios, quando depositados sobre a superfície da planta hospedeira, necessitam de água para germinar. Três dias após a penetração e estabelecimento da infecção os primeiros sintomas podem ser observados. Além da umidade elevada e presença de água livre, temperaturas em torno de 25°C favorecem a patogênese. A sobrevivência do patógeno pode ocorrer por meio da infecção de hospedeiros alternativos e da associação a restos culturais e/ou sementes (TONIN et al., 2011). Apesar das lesões e conídios terem certa semelhança, a mancha de cercospora pode ser distinguida da mancha causada por *Septoria lactucae* pela ausência de picnídios (PAVAN; KUROZAWA, 1997; TONIN et al., 2011).

O controle da doença pode ser feito por meio de, dentre outras medidas, o uso de sementes certificadas, o transplântio de mudas saudáveis, propiciar boas condições de drenagem para evitar o acúmulo de água, aumento do espaçamento entre plantas em períodos quentes para permitir uma melhor ventilação, não cultivar na proximidade de plantios velhos para evitar possíveis fontes de inóculo, utilizar irrigação localizada quando possível, destruir restos de cultura e adotar a rotação de culturas por um período de um ano ou mais (PEREIRA; PINHEIRO; CARVALHO, 2013).

2.3 Aspectos relacionados aos fungicidas

Os fungicidas são produtos utilizados há mais de 200 anos para o controle de doenças fúngicas (BRENT; HOLLOMON, 2007), e podem ser aplicados em várias partes das plantas, em produtos que serão armazenados, no solo, etc. A classificação dos fungicidas é baseada em características distintas, como: a) a mobilidade na planta, podendo ser de contato (baixa absorção pela planta, atuando na superfície da mesma) ou sistêmicos (são absorvidos pela planta e translocados via xilema e/ou floema para outras partes da planta); b) a função que exercem, sendo de ação preventiva ou de ação curativa; c) o sítio de ação, o qual pode ser único ou múltiplo; d) o modo de ação, causando danos à célula e/ou a processos importantes que ocorrem dentro da célula; e) o tipo de químicos, podendo ser inorgânico ou orgânico; f) o ingrediente ativo (componente ativo de um agrotóxico); biofungicida, um produto natural a base de micro-organismos ou substâncias químicas que ocorrem naturalmente no ambiente; g) grupo químico ou classe, compostos químicos de modo de ação bioquímica comum (MCGRATH, 2004).

A aplicação de fungicidas nem sempre implica na morte dos fungos. Os fungicidas podem atuar inibindo a germinação ou o crescimento micelial por determinado período, sendo chamados de fungistáticos; ou inibindo a produção de esporos, sem, contudo, interferir no crescimento vegetativo do fungo, estes são conhecidos como antiesporulantes (SOUZA; DUTRA, 2003).

Os fungicidas interferem em processos importantes das células fúngicas podendo causar a sua morte. Os principais processos em que os fungicidas atuam são: interferência generalizada das funções celulares; interrupção das funções da membrana celular; inibição da síntese de esteróis; síntese de lipídios e membrana celular; síntese de ácidos nucleicos; glucanas e síntese da parede celular; efeitos sobre as funções da membrana celular; inibição da mitose e divisão celular; inibição da síntese de proteínas e aminoácidos; inibição da respiração; sinais de transdução; mecanismo de ação indefinido (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007).

2.4 Resistência a fungicidas e adaptabilidade

Generalizando, o controle de doenças de plantas é realizado prioritariamente pelo emprego dos fungicidas em razão da, dentre outras razões, facilidade de aplicação e da rápida obtenção de resultados. Entretanto, o freqüente uso desses produtos, sobretudo os mais modernos, com modo de ação específico, pode selecionar, ao longo do tempo, indivíduos resistentes na população do fitopatógeno alvo e findar por ser tornar menos eficaz ou atóxico ao patógeno (GHINI; KIMATI, 2002).

A resistência a fungicidas ocorre quando surgem, e passam a predominar na população do micro-organismo alvo, indivíduos com sensibilidade reduzida, ou com total perda de sensibilidade, ao fungicida (MCGRATH, 2004). É uma característica herdável e estável do micro-organismo (GHINI; KIMATI, 2002; SOUZA; DUTRA, 2003; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). A especificidade do modo de ação dos fungicidas favorece o desenvolvimento da resistência porque, em alguns casos, pequenas alterações genéticas podem propiciar menor sensibilidade ao(s) produto(s) empregado(s) ao longo do tempo (MCGRATH, 2004). As alterações podem ser resultados da modificação no local de ação, considerada como o principal mecanismo de resistência (BRENT; HOLLOMON, 2007), o aumento da produção do composto que serve como sítio de ação do fungicida, o desenvolvimento de uma via metabólica alternativa, a exclusão ou expulsão do fungicida através de proteínas transportadoras (bombas de efluxo), degradação metabólica do fungicida, entre outros. Indicadores de alto risco para o desenvolvimento de resistência é a especificidade desses produtos, a resistência cruzada, o uso repetitivo de produtos, a rápida multiplicação do patógeno, mutantes resistentes em laboratório, entre outros (BRENT; HOLLOMON, 2007).

A frequência e nível da sensibilidade são importantes fatores no desenvolvimento da resistência, em que o primeiro corresponde a proporção na população indivíduos resistentes *versus* sensíveis e o segundo se refere a diferença da sensibilidade entre indivíduos/populações sensíveis e resistentes, sendo expresso pelo Fator de Resistência (FR), o qual pode ser calculado dividindo-se a concentração efetiva capaz de inibir em 50% o desenvolvimento (CE_{50}) da linhagem resistente/ CE_{50} da linhagem sensível (GHINI; KIMATI, 2002; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). O fator de resistência tem sido empregado para comparar o grau de resistência entre populações sensíveis e resistentes (KARAOGLANIDIS; LOANNIDIS;

THANASSOULOPOULOS, 2002), além de ser empregada para estimativa da resistência cruzada, como foi observado em estudo com *Cercospora beticola*, cujos resultados evidenciaram variabilidade nos níveis de resistência cruzada entre os isolados testados (KARAOGLANIDIS; LOANNIDIS; THANASSOULOPOULOS, 2000).

A resistência a fungicidas pode ser quantitativa ou qualitativa, em que a primeira ocorre quando o fungicida age em várias rotas metabólicas do fungo e a segunda quando a ação do fungicida afeta uma ou poucas rotas metabólicas, sendo que o aparecimento de mutantes resistentes é mais freqüente para a resistência qualitativa (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2001). Outro aspecto da resistência, é que ela pode ser cruzada ou múltipla, em que a resistência cruzada ocorre quando o fungo é resistente a dois ou mais fungicidas com o mesmo mecanismo de ação e é governada pelo mesmo fator genético; já a múltipla faz referência a resistência de um fungo a dois ou mais fungicidas, porém com distintos fatores genéticos envolvidos (GHINI; KIMATI, 2002).

No século passado, a maioria dos fungicidas agrícolas eram protetores, com atuação em múltiplos sítios. Porém, devido a custos elevados esses fungicidas eram economicamente viáveis apenas para uma pequena gama de culturas. Além disso, problemas de resíduos no produto fizeram com que o uso desses fungicidas fosse restringido. Com passar dos anos, a partir da introdução dos fungicidas sistêmicos as opções para o controle de doenças foi ampliado especialmente com o uso dos fungicidas inibidores da respiração (QoIs). Dentre estes, as estrobilurinas foram as primeiras a serem comercializadas. Elas tiveram boa aceitação e foram rapidamente difundidas, englobando, só na sua “primeira década de vida”, 20% do mercado mundial de fungicidas (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

As estrobilurinas são substâncias produzidas por Basidiomicetos e Ascomicetos. As estrobilurinas possuem ação fungicida sobre espécies de fungos do filo Basidiomycota, Ascomycota, fungos do grupo mitospórico e os Oomicetos. Embora possuam amplo espectro de ação, as estrobilurinas apresentam um único mecanismo de ação, sendo o azoxistrobina, o kresoxim-metil, o piraclostrobina, o trifloxistrobina e o metominostrobinos os principais ingredientes ativos. Estes fungicidas inibem a respiração mitocondrial, interferindo no transporte de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c1, afetando, desta forma, a produção de ATP (SOUZA; DUTRA, 2003). As

estrobilurinas atuam como antiesporulantes, inibindo a germinação dos esporos e o desenvolvimento dos fungos após a germinação (LOMBARDI, 2002).

O rápido desenvolvimento de resistência as estrobilurinas tornou-se cada vez mais problemático, o que se atribui ao seu modo de ação altamente específico (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). Por apresentarem modo de ação específico, agindo sobre um único sítio do metabolismo de micro-organismos, aspecto inerente a todos os sistêmicos, apenas uma alteração nesse sítio seria suficiente para o surgimento da resistência (SOUZA; DUTRA, 2003). A resistência a fungicidas sistêmicos é um processo lento e gradual, porém, quanto maior a pressão de seleção, maiores as chances de ocorrência de resistência em menor intervalo de tempo (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). Na literatura já são relatados a ocorrência de vários fitopatógenos resistentes as estrobilurinas, principalmente a resistência associada a modificação no local alvo (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008; BANNO et al., 2009; ISHII et al., 2009; WALKER et al., 2009; FURUYA et al., 2009; ZHANG et al., 2009; BLIXT et al., 2009; KILDEA et al., 2010; VEGA et al., 2012; FREDERICK et al., 2014; ROSENZWEIG et al., 2014; RALLOS et al., 2014).

Apesar de serem eficazes no manejo de cercosporioses os fungicidas pertencentes ao grupo químico estrobilurina apresentam elevado risco ao desenvolvimento da resistência em vários fitopatógenos, e a resistência em campo a esses fungicidas têm sido relatadas em várias espécies de gêneros distintos, tais como: *Mycosphaerella graminicola*, *Plasmopara viticola*, *Venturia inaequalis*, *Mycosphaerella fijiensis* var. *Difformis*, *Cercospora beticola*, *Cercospora graminicola*, *Cercospora soja*, entre outros (ANESIADIS; KARAOGLANIDIS; TZAVELLA-KLONARI, 2003; FRAC, 2013; KARADIMOS; KARAOGLANIDIS, 2006; KARAOGLANIDIS; BARDAS, 2006). Entretanto, em alguns casos, a resistência não é um grande problema, pois, o controle da doença não é afetado gravemente, como no caso das espécies *Cercospora beticola*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora soja* em que são consideradas de médio risco de desenvolverem resistência aos fungicidas (FRAC, 2014).

Os principais mecanismos de resistência a fungicidas Qol são: a respiração alternativa, os transportadores de efluxo e a modificação no local alvo (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

A respiração alternativa consiste no desvio de elétrons mitocondriais contornando o complexo de citocromo bc1 que é o sítio de inibição do fungicida Qol (WOOD; HOLLOMON, 2003). Embora a respiração alternativa seja detectada *in vitro* para algumas espécies/isolados através de testes de inibição de desenvolvimento fúngico por meio da deposição destes em meios de cultivo suplementados com fungicida mais uma alíquota de um agente inibidor da respiração alternativa, o ácido salicílico (SHAM) (KUBICEK et al., 1980; MINAGAWA; YOSHIMOTO, 1987; VINCELLI, DIXON, 2002; WISE et al., 2008; BRADLEY; PEDERSEN, 2011; ZHANG et al., 2012), especula-se que sua importância *in vivo* deve ser pequena, uma vez que as plantas produzem flavonas, que, similarmente ao SHAM, atuam preventivamente evitando a indução da oxidase alternativa (MIZUTANI et al., 1996; OLAYA; ZHENG; KOLLER, 1998; OLAYA; KOLLER, 1999). Outra razão para a ausência da respiração alternativa *in vivo* é a menor quantidade de produção de energia fornecida por essa via, o que inviabiliza processos importantes no ciclo da doença tais como: a germinação de esporos e a penetração no hospedeiro, os quais necessitam de grande quantidade de energia para serem concluídos e propiciarem uma colonização bem sucedida na planta hospedeira (WOOD; HOLLOMON, 2003).

Os transportadores de efluxo permitem que os fungos expostos a compostos tóxicos consigam sobreviver, uma vez que promovem proteção da células por impedirem o acúmulo em seu interior de compostos tóxicos (DEL SORBO; SCHOONBEEK; DE WAARD, 2000). A primeira ocorrência de transportadores de efluxo envolvidos na resistência a fungicidas Qol foi encontrado em *Aspergillus nidulans*, um sistema transportador tipo ABC, multidrogas, mediado pelo produto do gene AtrBp (ANDRADE et al., 2000). Entretanto, assim como a respiração alternativa, o impacto dos transportadores de efluxo sobre a resistência a fungicidas Qol parece ser limitado, sendo a modificação no local alvo o principal mecanismo de resistência a fungicidas Qol (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

Dentre as mudanças do local alvo, mutações no gene do citocromo b (CYTB) podem resultar em duas substituições de aminoácidos importantes, as quais tem sido detectadas em vários fungos fitopatogênicos e oomicetos resistentes a QoIs. São elas: a substituição de glicina por alanina na posição 143 (G143A) e a substituição de fenilalanina por leucina na posição 129 (F129L) (GISI et al., 2002). A mutação na posição 143 (G143A) é considerada mais grave devido ao alto fator de resistência

encontrado, onde os portadores desta mutação expressam um nível de resistência superior a 100 vezes do que é suportado por isolados sensíveis (ZHANG, 2012). A mutação na posição 143 (G143A) tem sido relatada para vários fungos fitopatogênicos (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008), como exemplos, *Botrytis cinerea*, *Microdochium nivale* e *Microdochium majus*, *Penicillium digitatum*, *Venturia inaequalis*, *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, *Alternaria alternata*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Mycosphaerella graminicola*, *Cercospora beticola*, entre outros (ISHII et al., 2009; WALKER et al., 2009; FONTAINE et al., 2009; ZHANG et al., 2009; BLIXT et al., 2009; FURUYA et al., 2009; KILDEA et al., 2010; LESNIAK et al., 2011; VEGA et al., 2012; FREDERICK et al., 2014; ROSENZWEIG et al., 2014; RALLOS et al., 2014). Em estudo com estirpes mutantes de *Cercospora beticola*, foi encontrada a substituição de glicina (GGT) para serina (AGT) na posição 143 (G143S) que tem sido associada com alto nível de resistência a estrobilurina (MALANDRAKIS et al., 2006; MALANDRAKIS et al., 2011).

Além dos mecanismos citados o surgimento, aumento de frequência e perpetuação de indivíduos resistentes na população do patógeno depende de outros fatores diretamente relacionados ao patógeno, como tamanho da população no momento da aplicação do produto e a ocorrência de reprodução sexual; sendo populações grandes, com reprodução cruzada, mais favorável ao surgimento de resistência. Após o aparecimento de mutantes resistentes, alguns aspectos são fundamentais para que estes indivíduos se multipliquem e predominem na população: o seu potencial reprodutivo e sua adequação ao meio e a pressão de seleção exercida sobre a população do fungo alvo. Generalizando, as chances de mutantes resistentes prevalecerem em uma população são maiores para aqueles indivíduos resistentes que não sofreram decréscimo em sua adaptabilidade, as quais podem se manifestar negativamente em importantes funções epidemiológicas, como: reprodução, sobrevivência, capacidade de disseminação, esporulação, etc. (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2001). Ou seja, quanto menor a redução na adaptabilidade dos indivíduos resistentes, maior a chance da resistência ser estabelecida na população.

A adaptabilidade é uma variável relativa e diretamente relacionada à capacidade de um determinado indivíduo sobreviver, desenvolver e se reproduzir, contribuindo assim com novos indivíduos que vão ajudar a perpetuar a espécie. Assim, considerando um micro-organismo fitopatogênico, pode-se deduzir que a adaptabilidade de uma

determinada linhagem resistente depende da capacidade de infecção, da velocidade de colonização dos tecidos do hospedeiro, da capacidade de esporulação e da sobrevivência (GHINI; KIMATI, 2002). Outra característica importante para perpetuação da resistência é que os indivíduos resistentes sejam capazes de competir com indivíduos sensíveis na ausência do fungicida (GHINI; KIMATI, 2002). Por essa razão, a adaptabilidade, estimada por meio da avaliação de, por exemplo, características epidemiológicas, com avaliação de variáveis *in vitro* e *in vitro*, tem sido alvo frequente em estudos sobre sensibilidade a fungicidas (KIM; XIAO, 2011; ZHANG, 2012; RALLOS et al., 2014). Assim, tem sido constatado que penalidades à aptidão em indivíduos resistentes a Qol variam entre os patossistemas (ZHENG; OLAYA; KÖLLER, 2000; CHIN et al., 2001; AVILA-ADAME; KÖLLER, 2003), podendo i) haver um ganho, como relatado para *Cercospora sojina*, onde foi quantificado aumento de agressividade associado à resistência (ZHANG, 2012), ii) redução, como menor virulência associada à resistência, conforme descrito para *Magnaporthe grisea* (AVILA-ADAME; KÖLLER, 2003); ou iii) não estar associada a decréscimo na adaptabilidade, como em *Botrytis cinerea* (KIM; XIAO, 2011).

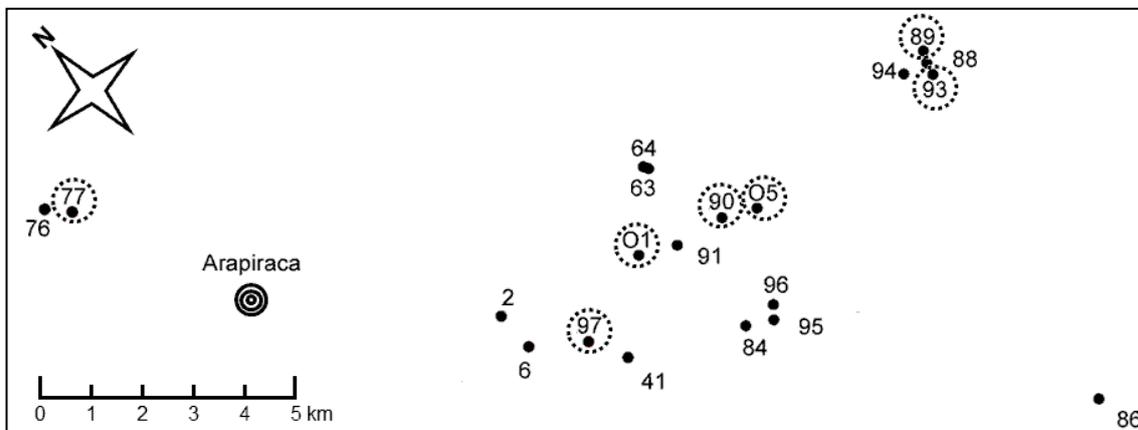
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem dos isolados e obtenção de isolados monospóricos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Alagoas – *Campus* Arapiraca, no período de dezembro de 2014 a fevereiro de 2015.

Os isolados foram obtidos a partir de amostras (folhas com sintomas de mancha de cercospora) coletadas em áreas com sistema de produção comercial convencional ou orgânico de alface localizado na zona rural de Arapiraca (Figura 1). Em cada área, plantas com folhas exibindo diferentes níveis de severidade da doença foram coletadas aleatoriamente entre os canteiros da cultura. Adicionalmente, coordenadas geodésicas de cada área visitada foi obtida com o uso de aparelho de GPS.

Figura 1. Áreas de produção comercial de alface em que isolados de *Cercospora lactucae-sativae* foram obtidos. Cada área recebeu um número único (a numeração de áreas de produção orgânicas são precedidas pela letra O) e as que estão envoltas por um círculo pontilhado, indicam as áreas de origem dos isolados utilizados nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.



Fonte: Autora, 2015.

Em todos os experimentos conduzidos em laboratório adotou-se a temperatura de 25°C e fotoperíodo variável em função do experimento: fotoperíodo de 12 horas (desenvolvimento de colônia em placa de Petri e incubação em condição de câmara úmida), escuro contínuo (desenvolvimento de micélio para produção de esporos) ou luz contínua (indução de esporulação para produção de inóculo e viabilidade de esporos).

Os isolados utilizados nos experimentos foram obtidos via técnica de obtenção de monospóricos a partir de lesões com a presença de esporos. Com este fim, folhas de alface com lesões características de mancha de cercospora foram mantidas em condição de câmara úmida para estimular a produção de esporos durante 24 horas (Figura 2A). Em seguida, as lesões foram observadas em microscópio estereoscópico e uma das lesões, contendo estruturas reprodutivas, foi recortada e agitada sobre o fundo de uma placa de Petri para liberação dos conídios (Figura 2B e C). Em seguida, com o uso de uma agulha esterilizada, cinco conídios foram transferidos para placa de Petri contendo BDA. Após sete dias de incubação, uma das colônias desenvolvidas (Figura 2D) foi repicada para uma nova placa contendo BDA. Desta forma, apenas um isolado monospórico foi obtido por amostra. A preservação dos isolados foi feita em tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado e pelo Método de Castellani (PIMENTEL; FIGUEIREDO, 1989). Dentre os isolados obtidos, 20 foram selecionados, com base na distância entre as áreas de origem, para os experimentos executados *in vitro*

(sensibilidade ao fungicida e efeito da respiração alternativa na sensibilidade, proporção do crescimento micelial e viabilidade de esporos). Com base nos resultados de sensibilidade *in vitro*, quatro isolados, representando extremos de sensibilidade, foram selecionados para avaliar os componentes epidemiológicos durante teste de patogenicidade para estimativa dos componentes epidemiológicos.

Figura 2. Etapas realizadas para obtenção de isolados monospóricos de *Cercospora lactucae-sativae*. Folhas com sintomas de cercospora em câmara úmida (A); esporos produzidos sobre as lesões (B); esporos espalhados sobre a placa de Petri (C) e colônias desenvolvidas em BDA (D).



Fonte: Autora, 2015.

3.2 Testes de sensibilidade e efeito da respiração alternativa na sensibilidade

A estrobilurina selecionada para estudo foi a azoxistrobina. Uma solução estoque foi preparada previamente por meio da diluição do fungicida comercial (Amistar/Syngenta®) em água destilada esterilizada (ADE). A partir da solução estoque, a solução de trabalho para cada concentração foi obtida por meio de uma diluição em série. Em seguida, alíquota de cada solução de trabalho foi adicionada a BDA para conseguir as concentrações de ingrediente ativo a serem testadas: 0, 0,01, 0,1, 0,5, 1 e $5\mu\text{g}$ de i. a. mL^{-1} (as concentrações foram definidas em pré-teste realizado com cinco isolados). Adicionalmente, os isolados menos sensíveis também foram cultivados nas concentrações 10, 50 e $100\mu\text{g ml}^{-1}$. Para avaliar o efeito da respiração alternativa na sensibilidade, um segundo experimento, no qual $100\mu\text{g}$ de ácido salicílico-hidroxâmico (SHAM), diluído em metanol foram adicionados ao BDA contendo o fungicida. A solução estoque do fungicida e do SHAM foram adicionados ao BDA autoclavado quando este estava com temperatura entre 45 e 50°C (BRADLEY; PEDERSEN, 2011; BIRLA et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

Para execução dos experimentos com e sem SHAM, discos de 5 mm de diâmetro contendo estruturas fúngicas foram retirados da borda de colônias com 15 dias de idade e depositados, com a face contendo as estruturas voltada para baixo, em placas de Petri de 9 mm contendo BDA. Após quinze dias de incubação, o crescimento micelial dos isolados em diferentes tratamentos foi quantificado por meio da estimativa do diâmetro médio da colônia a partir da mensuração do diâmetro em duas direções diametralmente opostas.

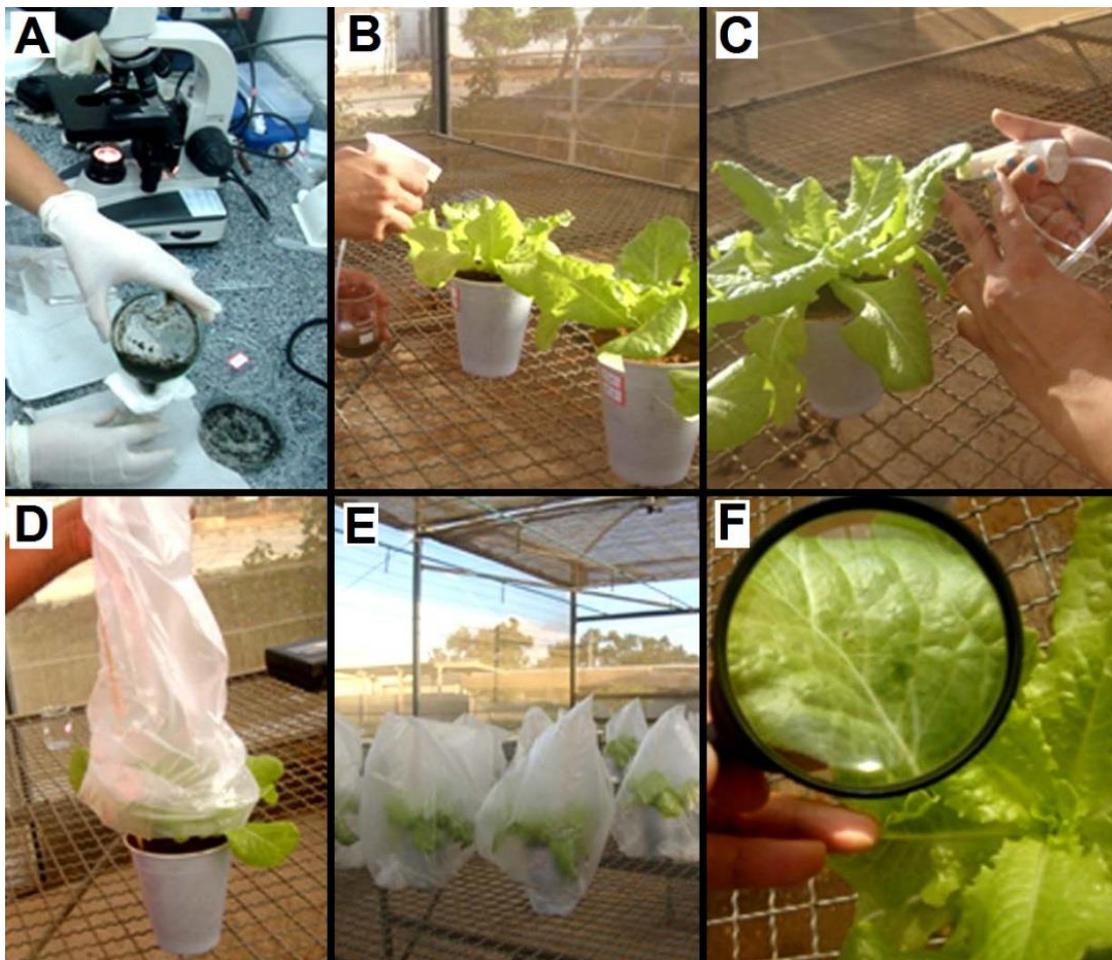
A partir dos dados de diâmetro médio do crescimento das colônias foi calculado o percentual de inibição do crescimento micelial [% de inibição = $100 - (\text{diâmetro na concentração } i \times 100) / \text{diâmetro na concentração } 0$] para cada concentração por isolado em cada repetição. Em seguida, a concentração efetiva capaz de inibir em 50% o crescimento micelial do patógeno (CE₅₀) foi estimada por meio de regressão da % de inibição *versus* o log₁₀ da concentração do fungicida. A estimativa de CE₅₀ foi obtida para cada repetição por isolado com e sem SHAM (TUMBEK et al., 2011; KARAOGLANIDIS; LOANNIDIS; THANASSOULOPOULOS et al., 2000; 2002). Adicionalmente, visando comparar os níveis de sensibilidade entre os isolados testados, o fator de resistencia (FR) foi calculado dividindo o valor de CE₅₀ média dos isolados mais resistentes pelo valor de CE₅₀ média do isolado mais sensível (KARAOGLANIDIS; LOANNIDIS; THANASSOULOPOULOS et al., 2000; 2002).

3.3 Componentes epidemiológicos *in vivo* e *in vitro*

Para avaliação dos componentes epidemiológicos *in vivo*, foram utilizadas mudas de alface de cultivar do grupo Lisa com 20 dias. As mudas foram adquiridas em sementeira comercial e transplantadas para vasos, com capacidade para 500 ml de solo (esterilizado em autoclave), os quais foram acondicionados em casa de vegetação. As mudas foram irrigadas manualmente em dois turnos, no início da manhã, a partir das 7h, e ao final da tarde, às 17h. As mudas foram observadas diariamente por um período de 17 dias antes da montagem do experimento e as que eventualmente apresentaram sintomas de doença foram descartadas, restando apenas mudas sadias para serem utilizadas na avaliação dos componentes.

Quatro isolados monospóricos com níveis distintos de sensibilidade a azoxistrobina, dois sensíveis (isolados 5H e 90E) e dois resistentes (76E e 77C), foram inoculados nas mudas. O inoculo foi produzido via técnica de secagem micelial, descrita adiante em testes *in vitro*, excetuando-se o volume de ADE adicionado durante a raspagem das colônias para obtenção de suspensão de estruturas fúngicas: 20 ml. Em seguida, a suspensão foi filtrada através de uma camada de gaze dupla e a concentração de conídios estimada por meio de uma câmara de Neubauer (YEH; SINCLAIR, 1980). Para inoculação, a suspensão de 5×10^4 conídios ml^{-1} , acrescido de uma gota de Tween 20 a 0,1% (vol / vol), foi borrifada até o escorrimento em ambas as faces de folhas de mudas de alface com 17 dias de transplantadas (KARAOGLADINIS; BARDAS, 2006). Em seguida, cada muda inoculada foi envolta por um saco plástico, contendo ADE borrifada em seu interior, por um período de 15 horas. Findo este período, os sacos foram removidos e as plantas observadas diariamente para avaliação do surgimento de sintomas e sinais (Figura 3) (SOUZA, 2007). O experimento foi montado em DIC, com 4 repetições por isolado. A unidade experimental foi constituída por uma planta/vaso. Como tratamento controle, plantas foram aspergidas com ADE contendo Tween 20.

Figura 3. Preparo de suspensão de conídios de *Cercospora lactucae-sativae* para ser utilizada na inoculação (A); inoculação (B e C); câmara úmida (D e E); e observação dos primeiros sintomas (F).



Fonte: Autora, 2015.

As variáveis quantificadas foram o período de incubação (PI) (considerado completo quando foi observada ao menos uma lesão na metade das folhas inoculadas/planta), período latente (PL) (considerado completo quando foi observada a presença de estruturas reprodutivas em pelo menos uma lesão, de metade das folhas inoculadas/planta), severidade (percentual de tecido foliar lesionado, estimado com auxílio de escala diagramática desenvolvida por Gomes et al. (2004) – a severidade da doença foi estimada 13 dias após a inoculação em 5 folhas/planta) e germinação de esporos produzidos durante a patogênese.

Para avaliação da germinação de esporos, folhas sintomáticas foram destacadas e postas em câmara úmida para estimular a produção de esporos. Após 24h, os esporos produzidos foram transferidos diretamente da lesão através da ponta de uma agulha

esterilizada para uma alíquota de 200µl de ADE disposta sobre uma fina camada AA que recobria uma lâmina de microscopia. Após cinco horas de incubação, a germinação dos esporos foi paralisada pela adição de 250 µL de lactofenol e a germinação quantificada pela observação de 100 conídios (ASSUNÇÃO et al., 2013). Foram considerados germinados os conídios que apresentaram pelo menos um tubo germinativo de comprimento maior ou igual ao diâmetro da base do conídio (ZHANG, 2012; MARTINS, 2007). O experimento foi montado em DIC, com 4 repetições por isolado. A unidade experimental foi constituída por uma lâmina de microscopia.

Para os testes *in vitro*, conídios de *C. lactucae-sativae* dos 4 isolados testados nos experimentos *in vivo* foram obtidos por meio da técnica de secagem de massa micelial desenvolvida por Walker (1980), modificada por Necher et al. (2006) e Souza et al. (2005), com alterações, descrita abaixo.

Três discos de 5mm de diâmetro de BDA, contendo estruturas de *C. lactucae-sativae*, obtidos de colônias com 15 dias de crescimento, foram transferidos para erlenmeyers contendo 25ml de meio de cultura aveia água (30g de aveia e 1000ml de água destilada). Os erlenmeyers foram mantidos no escuro e agitados manualmente, três vezes por dia, durante 9 dias. Posteriormente, a suspensão contida em cada erlenmeyer foi vertida sobre camada de Agar água (AA) a 0,13%, contida em placas de Petri. Em seguida, as placas, abertas, foram acondicionadas a 25°C, sob luz contínua, proporcionada por lâmpada fluorescente branca de 40W disposta a 40cm de distância das placas. Após cinco dias, 15 mL de ADE foi adicionado a cada placa e, com o auxílio de um bastão de vidro, procedeu-se a raspagem das estruturas reprodutivas/somáticas desenvolvidas sobre o AA desidratado. A suspensão obtida foi filtrada através de uma camada de gaze e uma alíquota de 300µL do filtrado foi adicionando sobre uma lâmina de microscopia, recoberta com uma fina camada de AA, disposta dentro de uma placa de Petri. As lâminas foram mantidas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e, após 5 horas, foi adicionado 250 µL de lactofenol a lâmina para paralisar a germinação dos esporos. Em seguida, 100 conídios foram observados sob microscópio ótico e o percentual de conídios germinados contabilizado (ASSUNÇÃO et al., 2013). O experimento foi montado em DIC, com 4 repetições. A unidade experimental foi constituída por uma lâmina de microscopia.

Para todos os experimentos, foi possível a aplicação de teste de Tukey ($P=0,05$) para comparação dos tratamentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Origem dos isolados e obtenção de isolados monospóricos

Este é o primeiro estudo sobre sensibilidade de *C. lactucae-sativae* a estrobilurina. Este estudo deu-se em função de três situações: i) a relevância da doença causada pelo fungo, por ser a doença de maior prevalência na região agreste de Alagoas, tendo sido encontrada em 83% das 76 áreas de produção visitadas em levantamento fitopatológico realizado durante a safra 2013/2014 (SANTOS et al., 2014); ii) a constatação do uso intensivo de fungicidas no manejo da doença, sobretudo a azoxistrobina, pertencente ao grupo das estrobilurinas; e iii) o relato de que em muitas áreas a aplicação do fungicida não tem proporcionado o mesmo nível de controle de safras anteriores. Das 76 áreas visitadas durante levantamento fitopatológico prévio, optou-se, por questões operacionais de estrutura física e de recursos humanos, por focar no estudo da sensibilidade de isolados oriundos de oito áreas de cultivo (Figura 1), as quais foram selecionadas com base na distância geográfica entre si e na forma de cultivo. Das áreas selecionadas, seis são cultivadas sob sistema convencional e duas sob sistema orgânico e, do total de 20 isolados estudados, 15 são provenientes de áreas de cultivo convencional e cinco de áreas de cultivo orgânico.

4.2 Testes de sensibilidade e efeito da respiração alternativa na sensibilidade

A sensibilidade a azoxistrobina diferiu significativamente entre os isolados testados, variando de 0,07 a 1,98 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e de 0,007 a 13,52 $\mu\text{g ml}^{-1}$ na ausência e presença de SHAM, respectivamente (Tabela 1). Em função do fenótipo de sensibilidade, os isolados puderam ser reunidos em dois grupos, sendo o grupo um formado por isolados mais sensíveis, cuja a CE_{50} , individualmente, foi inferior a 2 μgml^{-1} , e o grupo dois, formado por isolados que manifestaram dois fenótipos: 1) a CE_{50} só pôde ser estimada na presença de SHAM, com valores superiores a 11 $\mu\text{g MI}^{-1}$; e 2)

isolados para os quais, em função da insensibilidade, não foi possível estimar a CE_{50} . Assim, os isolados do grupo um foram denominados como sensíveis e os isolados do grupo dois como insensíveis. Do total de isolados testados, 30% foram classificados como insensíveis – todos oriundos de duas áreas de produção mantidas sob sistema de produção convencional, 77 e 76 (Figura 1). Dos 70% restantes, 38% são oriundos de áreas com sistema de cultivo orgânico (Tabela 1). Embora o grupo 1 tenha sido classificado como sensível, convém ressaltar que os valores de CE_{50} estimados neste estudo foram maiores do que o relatado para espécies do mesmo gênero, como *Cercospora kicuchii*, *Cercospora sojina* e *Cercospora zea-maydis*, para as quais os valores da concentração de referência (Baseline) não ultrapassou $0,09 \mu\text{g}$ de i.a. ml^{-1} (PRICE, 2013; ZHANG, 2012; BRADLEY; PEDERSEN, 2011). A mesma ponderação é aplicável a CE_{50} relatada para espécies de outros gêneros. Por exemplo, para *Guignardia citricarpa* e *Monilinia fructicola* cuja a CE_{50} média foi de $0,027$ e $0,05 \mu\text{g}$ i.a. ml^{-1} , respectivamente (AMIRI; BRANNEN; SCHNABEL, 2010; HINCAPIE et T., 2014). Apesar da inexistência de uma concentração de referência, definida a partir de valores de CE_{50} estimada para isolados de *C. lactucae-sativae* nunca expostos a azoxistrobina, é razoável supor que esteja havendo seleção para resistência do patógeno à azoxistrobina por duas razões: 1) a CE_{50} média do grupo um ($0,45 \mu\text{g ml}^{-1}$) é mais de 40 vezes maior do que o relatado para baseline de *Cercospora* spp.; 2) 30% dos isolados não demonstraram sensibilidade; e 3) os isolados insensíveis foram encontrados em associação a plantios de duas áreas próximas, onde o uso de controle químico é aplicado intensivamente.

Tabela 1. Sensibilidade de populações de *C. lactucae-sativae* a azoxistrobina testados *in vitro* com e sem a adição de SHAM.

ISOLADOS	CE ₅₀ ($\mu\text{g de i.a. mL}^{-1}$)	
	SEM SHAM	COM SHAM
77A	0.528cd	0.3391b
77B	n.e.	n.e.
77C	n.e.	n.e.
77D	n.e.	11.324 ^a
77E	n.e.	n.e.
76C	n.e.	13.521 ^a
76E	n.e.	n.e.
97A	0.576c	0.0071b
97E	0.545cd	0.0943b
90B	1.127b	0.433b
90C	1.989 ^a	0.2927b
90E	0.233cde	0.1239b
1B*	0.428cde	0.0196b
1C*	0.117e	0.066b
1E*	0.103e	0.0316b
5H*	0.077e	0.0143b
5J*	0.176de	0.0846b
93B	0.107e	0.0920b
89C	0.161de	0.0385b
89D	0.187de	0.0481b

Fonte: Autora, 2015.

n.e. A CE₅₀ não pôde ser estimada.

Médias obtidas através da aplicação do teste Tukey (P=0,01).

*Isolados provenientes de sistema de produção orgânica.

O estabelecimento de uma concentração inibitória mínima (CIM), também conhecida como dose discriminante, otimiza o monitoramento temporal da sensibilidade de populações de fitopatógenos a fungicidas. Estudos de sensibilidade *in vitro* a fungicidas implicam em intenso trabalho porque as estimativas de sensibilidade envolvem o cultivo do patógeno em substratos contendo diferentes concentrações do fungicida testado. Como em monitoramentos o número de isolados oriundos da

população do patógeno deve ser elevado para garantir a representatividade das estimativas, chega-se a um impasse por questões operacionais. Por essa razão é desejável que exista uma concentração capaz de permitir a discriminação entre isolados sensíveis e insensíveis, a CIM. Ou seja, uma concentração capaz de inibir totalmente o desenvolvimento de isolados sensíveis (AMIRI; BRANNEN; SCHNABEL, 2010; ZHANG, 2012). Por exemplo, para *C. sojina* e *C. kikuchii*, a CIM foi de 1 e 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. (ZHANG, 2012; PRICE, 2013). No presente estudo, todos os isolados insensíveis foram totalmente inibidos, tanto na presença como na ausência de SHAM na composição do substrato, quando cultivados em concentração igual ou maior do que de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Já os isolados insensíveis não foram inibidos, mesmo quando cultivados em substrato contendo 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; excetuando-se os isolados 77D e 76C, os quais tiveram o desenvolvimento inibido, apenas na presença de SHAM, quando cultivados em substrato contendo 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Assim, propõe-se que a concentração de 10 $\mu\text{g de i.a. ml}^{-1}$ seja utilizada como CIM em monitoramentos do nível de sensibilidade *C.lactucae-sativae*.

A respiração alternativa é um dos possíveis mecanismos de resistência a azoxistrobina em *C. lactucae-sativae*. Todos os isolados sensíveis de *C. lactucae-sativae* cultivados em meio contendo SHAM tiveram um aumento de sensibilidade ao fungicida, o que reduziu a CE_{50} média do grupo dos sensíveis de 0,45 para 0,12 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabela 1). O uso de oxidase alternativa ao complexo de citocromo III no transporte de elétrons já foi descrito em espécies de *Cercospora* (BRADLEY; PEDERSEN, 2011; ZHANG et al., 2012) e em espécies de outros gêneros (ZIOGAS; BALDWIN; YOUNG, 1997; OLAYA; KOLLER, 1999; VINCELLI, DIXON, 2002; WISE et al., 2008; CHEN; JIN; ZHOU, 2009). Em todas as espécies o mecanismo não resultou em resistência total ao fungicida, mas em tolerância. Embora os isolados não adquiram resistência total, especula-se que populações patogênicas que tenham em sua composição indivíduos portadoras deste mecanismo possam persistir após o emprego de controle químico, propiciando um tempo maior para que outros mecanismos de resistência mais eficientes surjam entre os indivíduos e que os mesmos sejam selecionados, passando, então, a predominar na população. Assim, a constatação do aumento de sensibilidade dos isolados sensíveis de *C. lactucae-sativae*, quando os mesmos foram cultivados em substrato contendo SHAM, permite assumir que este

mecanismo esteja ocorrendo na população de *C. lactucae-sativae* associada aos plantios de alface da região estudada (Tabela 1).

Outros mecanismos de resistência podem estar ocorrendo em paralelo à respiração alternativa. Considerando os isolados insensíveis, a CE_{50} não pôde ser estimada para 66,6% destes, independente do uso ou não de SHAM. Para os isolados insensíveis restantes, a CE_{50} só foi estimada com o uso de SHAM e, mesmo assim, os valores foram elevados, maiores do que $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabela 1). Isto evidencia a ocorrência de, pelo menos, um segundo mecanismo. Dentre os demais mecanismos de resistência conhecidos, as bombas de efluxo e a modificação no sítio alvo destacam-se a ocorrência de mudança no sítio alvo como principal mecanismo porque o impacto das bombas de efluxo sobre a resistência a fungicidas Qol parece ser limitado (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). A modificação no local alvo, envolvendo as mutações no gene do citocromo b (CYTB), é relacionada à resistência, sendo a substituição de glicina por alanina no códon 143 (G143A) presente na maioria dos fungos fitopatogênicos resistentes (BANNO et al., 2009; ISHII et al., 2009; WALKER et al., 2009; FREDERICK et al., 2014; FURUYA et al., 2009; ROSENZWEIG et al., 2014; RALLOS et al., 2014; VEGA et al., 2012; ZHANG et al., 2009; BLIXT et al., 2009; KILDEA et al., 2010). Outras mutações no mesmo gene envolvem a substituição do aminoácido fenilalanina por leucina ou valina no códon 129 (F129L e F129V, respectivamente), e glicina por arginina no códon (G137R) (MA; MICHAILIDES, 2005; MALANDRAKIS et al., 2006; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

Dentre as mutações no CYTB, a G143A além de mais frequente, é a que está relacionada com os maiores níveis de resistência a Qol, enquanto as mutações F129L e G137R estão associadas à expressão de resistência moderada a QoIs (KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2011). Em testes *in vitro* com a espécie *Pyricularia grisea* foi observado que isolados com a mutação G143A foram significativamente mais resistentes à azoxistrobina e trifloxistrobina do que aqueles com a mutação F129L (KIM et al., 2003). Na literatura relata-se que a mutação na posição 143 (G143A) é considerada mais grave devido ao alto fator de resistência (FR) encontrado, que é geralmente superior a 100 (ZHANG, 2012). Segundo a FRAC (2006), geralmente, isolados, que são pelo menos 100 vezes menos sensíveis aos fungicidas QoI têm a mutação G143A. Para isolados de *C. sojina*, por exemplo, a diferença da sensibilidade encontrada em isolados resistentes em relação aos isolados de linha de

base é muito alta, acima de 100 vezes (ZHANG, 2012), o que sugere a existência da mutação G143A.

No presente estudo o FR calculado variou de 1 a 26 para os isolados mais sensíveis. Entretanto, para os isolados insensíveis, para os quais a CE_{50} foi possível ser estimada apenas com o uso de SHAM, o FR observado foi de 147 e 175 (Tabela 2). Assim, sugere-se que, a mutação no local alvo, mais especificamente a mutação G143A, pode ser o mecanismo de resistência associado aos isolados insensíveis. Futuras pesquisas devem se concentrar no sequenciamento do CYTB de isolados insensíveis e sensíveis para confirmar esta suposição.

Tabela 2. Sensibilidade de isolados de *C. Lactucae-sativae* a azoxistrobina e cálculo do fator de resistência (FR) para comparação da sensibilidade dos isolados insensíveis em relação ao isolado mais sensível.

ISOLADOS	CE_{50} ($\mu\text{g de i.a. mL}^{-1}$)	
	MÉDIA	FR
76C*	13.521 ^a	175
77D*	11.324 ^a	147
90C	1.989 ^a	26
90B	1.127 ^b	15
97A	0.576 ^c	7
97E	0.545 ^{cd}	7
77A	0.528 ^{cd}	7
1B	0.428 ^{cde}	6
90E	0.233 ^{cde}	3
89D	0.187 ^{de}	2
5J	0.176 ^{de}	2
89C	0.161 ^{de}	2
1C	0.117 ^e	2
93B	0.107 ^e	1
1E	0.103 ^e	1
5H	0.077^e	

Fonte: Autora, 2015.

* CE_{50} estimada apenas com o uso do SHAM.

FR=fator de resistência

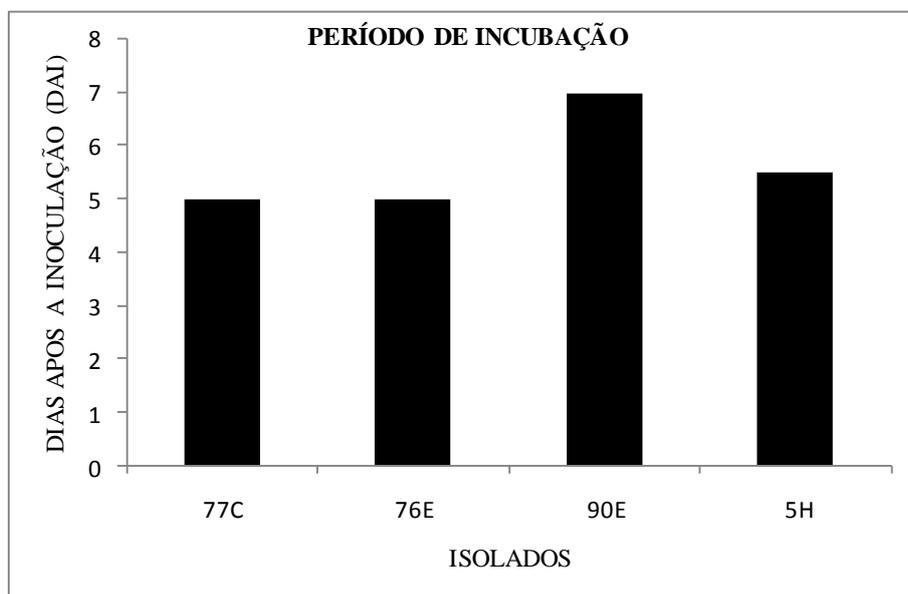
5H=isolado mais sensível

4.3 Componentes epidemiológicos *in vivo* e *in vitro*

Com base nos resultados da CE_{50} do teste de sensibilidade, foram selecionados dois isolados sensíveis, 90E e 5H, com CE_{50} média de 0,233 e 0,077 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente, e dois insensíveis, 76E e 77C, cuja CE_{50} não pôde ser estimada.

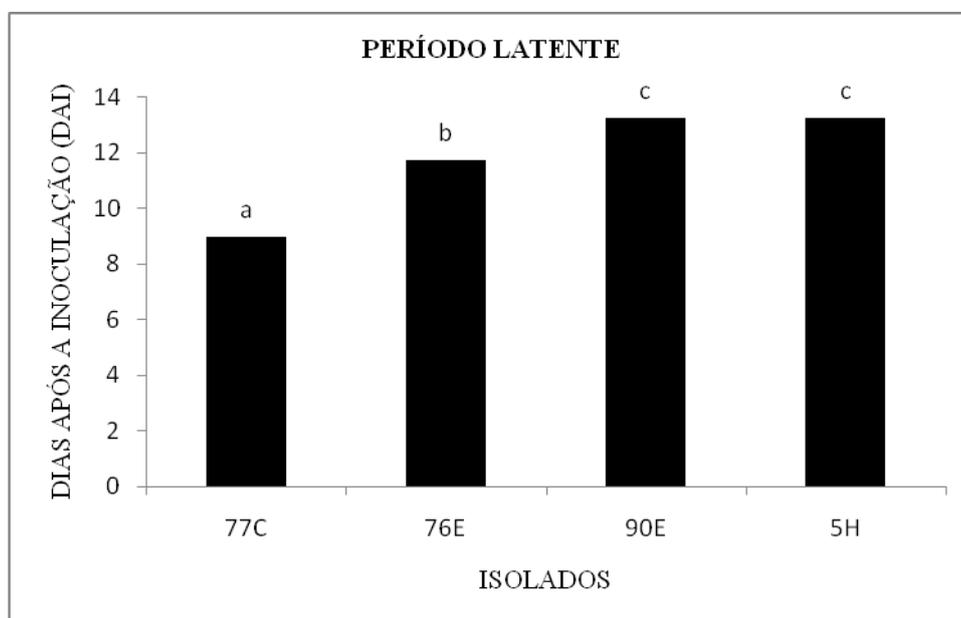
O PI variou de 5 a 7 dias e não houve diferença significativa entre os isolados ($P=0,11$). Porém, o PI para os isolados insensíveis foi menor em relação aos isolados sensíveis. Já o PL variou de 9 a 13,25 dias, tendo os isolados insensíveis um PL médio entre 12 a 22% menor do que o dos isolados sensíveis (Gráfico 1 e 2). Assim, os isolados insensíveis podem propiciar um número maior de ciclos da doença durante o ciclo da cultura, o que é preocupante, pois de acordo com a FRAC (2014), o risco da resistência é comumente aumentado quando o patógeno alvo apresenta vários ciclos da doença. Na literatura relata-se que para *C. lactucae-sativae* sintomas e novos esporos podem ser produzidos de 4 a 8 dias após a inoculação (SHERF; MACNAB, 1986), o que difere em relação aos resultados observados neste estudo, em que a visualização de sintomas ocorreu entre 5 a 7 dias e a produção de esporos de 9 a 14 dias em geral. Porém, de acordo com Naqvi (2004) a temperatura ótima para o desenvolvimento da doença é 25°C em que os primeiros sintomas podem ser visualizados dentro de 3 dias após a inoculação. No entanto, caso as temperaturas não sejam adequadas tais como de 15, 20 e 30°C os períodos de incubação podem ser de 7, 5 e 5 dias, respectivamente. Isso pode explicar os resultados obtidos neste estudo, uma vez que as temperaturas observadas durante o período de avaliação do experimento variou de 17 a 35° C.

Gráfico 1. Período de incubação (PI) de isolados de *C. lactucae-sativae* inoculados em mudas de alface em casa de vegetação, sendo dois isolados sensíveis (5H e 90E) e dois isolados insensíveis (76E e 77C) a azoxistrobina. Para comparação das médias foi aplicado o teste Tukey (P=0,01).



Fonte: Autora, 2015.

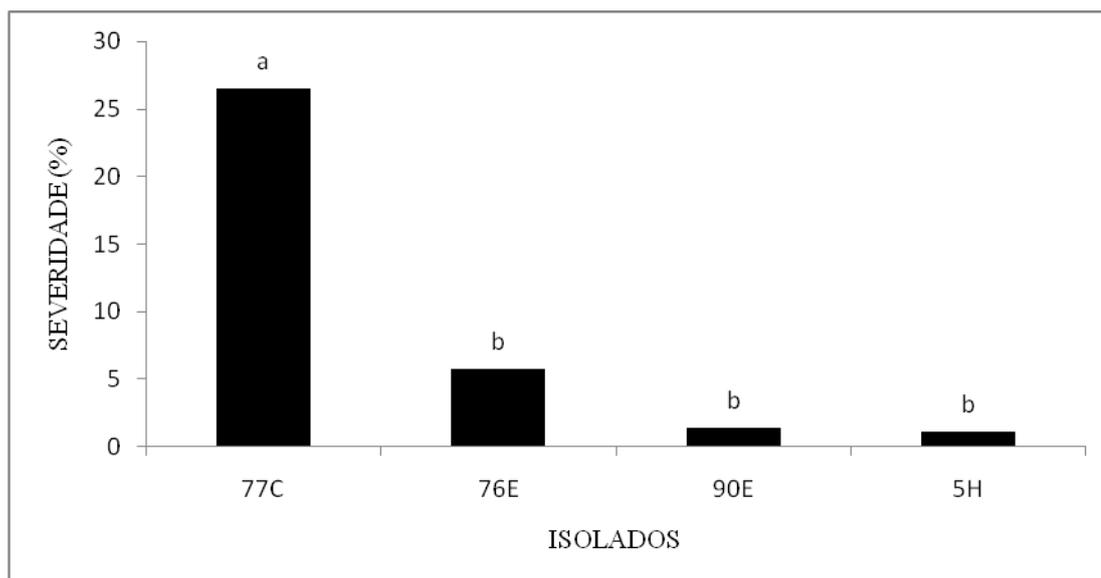
Gráfico 2. Período latente (PL) de isolados de *C. lactucae-sativae* inoculados em mudas de alface em casa de vegetação, sendo dois isolados sensíveis (5H e 90E) e dois isolados insensíveis (76E e 77C) a azoxistrobina. Para comparação das médias foi aplicado o teste Tukey (P=0,01).



Fonte: Autora, 2015.

A severidade da doença variou de 1,16 a 26,5%, sendo os isolados insensíveis os de maior virulência, com destaque para o isolado 77C estatisticamente superior aos demais ($P < 0,0001$) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Severidade da cercosporiose em mudas de alface inoculadas com isolados de *C. lactucaesativae*, sendo dois isolados sensíveis (5H e 90E) e dois isolados insensíveis (76E e 77C) a azoxistrobina. Para comparação das médias foi aplicado o teste Tukey ($P = 0,01$).



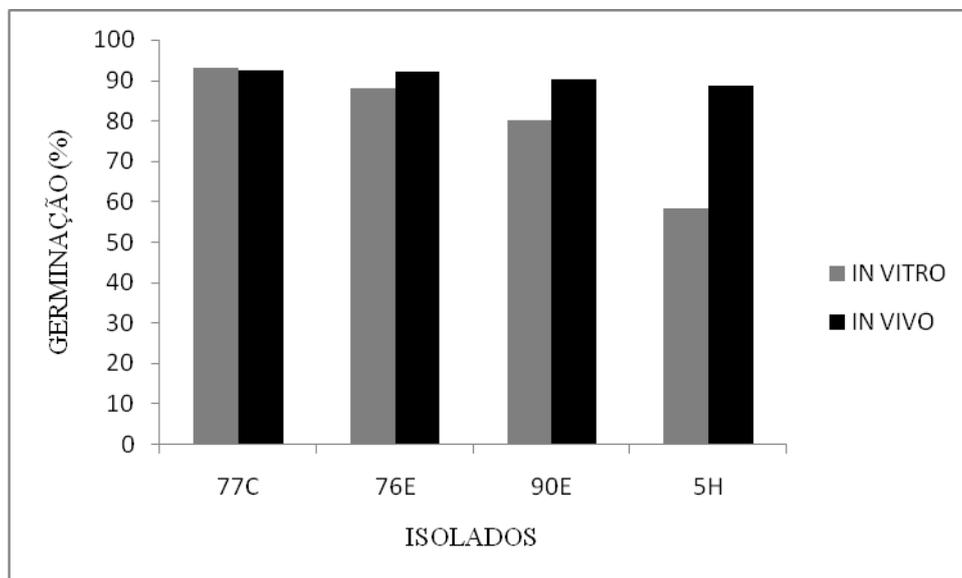
Fonte: Autora, 2015.

Neste estudo, as plantas foram mantidas com folhas molhadas durante o primeiro dia, o que pode ter favorecido o desenvolvimento da doença, uma vez que para *C. lactuca sativae* o efeito do molhamento foliar propicia as condições ideais para germinação dos conídios (SAVARY, 1983), principalmente, quando esse período é superior a 24 horas considerado ideal para a penetração bem sucedida (NAQVI, 2004). O aumento ou redução da severidade da doença está ligado a fatores do ambiente como foi observado em um levantamento feito em Pernambuco, em que a influência da precipitação foi determinante para o aumento da doença em plantios de alface em sistema de produção convencional e orgânico, em que o nível de severidade variou de 0,84 a 16,86 para este e de 0,07 a 22,53 para aquele quando o índice pluviométrico durante o período de avaliação foi 434,2 mm. Entretanto, em outro período, quando o índice pluviométrico foi de 165,7 mm houve redução da severidade que variou de 0,0 a 2,4% para o sistema de produção convencional e de 0,0 a 15,1% para o sistema orgânico (GOMES, 2006).

A maior severidade observada para os isolados insensíveis pode ter relação com a maior patogenicidade destes em relação aos isolados sensíveis. Além disso, os isolados insensíveis produziram esporos mais rapidamente dado um PL inferior ao dos isolados sensíveis. Resultado semelhante foi observado por Zhang (2012) em que para *C. sojina* as lesões da doença apareceram um dia antes para isolados resistentes o que pode explicar a rápida produção de esporos para estes em relação aos isolados sensíveis e a própria severidade da doença que foi significativamente maior do que a causada pelos isolados sensíveis. A severidade da doença também foi maior para plantas de pepino inoculadas com o isolado resistente em comparação com o isolado sensível de *Pseudoperonospora cubensis* (ISHII et al., 2001). Em outro estudo a capacidade competitiva entre um mutante resistente e o tipo selvagem de *Magnaporthe oryzae* foi avaliada e apesar do mutante resistente ter produzido maior inoculo secundário, a severidade da doença da estirpe de tipo selvagem foi significativamente mais elevada (MA; UDDIN, 2009).

Para a viabilidade de esporos, não foi observada diferença significativa entre os ensaios *in vivo* e *in vitro* (valor de F da ANOVA variando de 0,23 a 0,88), embora exista a tendência dos esporos produzidos *in vivo* terem uma taxa maior de germinação. Não foi detectada diferença significativa em relação à viabilidade de esporos entre os isolados, tanto para os testes *in vivo* como para os testes *in vitro* (P=0,32). Porém, houve uma tendência de maior viabilidade de esporos para os isolados insensíveis (Gráfico 4). Já para isolados mutantes de *Cercospora beticola* um estudo prévio sobre características da aptidão mostrou que houve uma redução da esporulação em comparação com a de tipo selvagem (MALANDRAKIS et al., 2006). Em mutantes de *Botrytis cinerea* resistentes a piraclostrobina também houve efeito negativo sobre a capacidade de mutantes para competir com a estirpe selvagem, em que a esporulação e/ou germinação de esporos foi reduzida (MARKOGLOU et al., 2006). No entanto, em outro estudo, isolados de *Botrytis cinerea* resistentes a piraclostrobina, não diferiram quanto as variáveis analisadas mantendo-se os aspectos de aptidão inalterados (KIM; XIAO, 2011).

Gráfico 4. Percentagem de germinação de esporos *in vivo* de isolados de *C. lactucae-sativae* inoculados em mudas de alface em casa de vegetação e *in vitro* de isolados de *C. lactucae-sativae* cultivados em laboratório, sendo dois isolados sensíveis (5H e 90E) e dois isolados insensíveis (76E e 77C) a azoxistrobina.



Fonte: Autora, 2015.

Sabe-se que fungicidas que tem modo de ação específico, aumentam o risco de desenvolvimento de resistência, principalmente, quando isolados resistentes não sofrem penalidades na sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se no ambiente (ISHII et al., 2001). Custo adaptativo devido a mutações associadas à resistência torna-se evidente na ausência do fungicida (SCHOUSTRÁ et al., 2005; JEGER; WIJNGAARDEN; HOEKSTRA, 2008). Na ausência do fungicida foi observado uma menor capacidade competitiva de um mutante resistente de *Magnaporthe oryzae* em relação ao tipo selvagem indicando custo em aptidão para o mutante resistente (MA; UDDIN, 2009). Quando ocorrem penalidades na aptidão de isolados resistentes, a ausência do fungicida poderá reduzir a frequência de resistência e possibilitar a reintrodução do produto (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008), do contrário, estratégias anti-resistência devem ser empregadas para que se possa retardar o desenvolvimento da resistência (FRAC, 2010).

No presente estudo, não houve penalidades na aptidão dos isolados insensíveis, que por sua vez se mostraram mais competitivos em relação aos isolados sensíveis. Com isto, os isolados insensíveis podem prevalecer em campos de produção de alface na ausência do fungicida. Como agravante, a disseminação do patógeno ocorre

principalmente pelo vento (TONIN et al., 2011), podendo promover a disseminação de esporos a longas distâncias e contaminar áreas ainda não afetadas pela resistência. Entretanto, as chances de disseminação dos isolados insensíveis para outras áreas podem ser reduzidas em função da direção dos ventos da região, geralmente, em sentido leste (E) ou leste sul (E-S) (INMET, 2015) e pelo fato da distribuição desses isolados ser pontual e em áreas distantes das demais. Assim, outros estudos com um número maior de isolados devem ser conduzidos em casa de vegetação e em campo para avaliar se a frequência de isolados resistentes permanece sem a presença do fungicida em mais ciclos da planta hospedeira. Além disso, outros parâmetros epidemiológicos devem ser incluídos em estudos futuros.

Por fim, tendo em vista a confirmação da presença de isolados resistentes na região e como não foram estabelecidos valores de linha de base para *C. lactucae-sativae*, devido a ausência de plantios sem histórico de aplicação de estrobilurinas, os valores encontrados neste estudo servirão como referencia para monitorar mudanças na sensibilidade a esses fungicidas nos anos seguintes. A dose discriminatória sugerida para o acompanhamento temporal da sensibilidade da população de *C. lactucae-sativae* deve ser de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, uma vez que todos os isolados considerados insensíveis apresentaram a CE_{50} acima desse valor.

5 CONCLUSÕES

Está ocorrendo resistência de *C. lactucae-sativae* à azoxistrobina na região Agreste de Alagoas, uma vez que 30% dos isolados avaliados foram insensíveis ao fungicida nos testes de inibição do crescimento micelial.

Para 80% dos isolados, a respiração alternativa pode constituir um dos mecanismos de resistência presentes em *C. lactucae-sativae*, uma vez que, para estes, o crescimento micelial foi menor na presença do SHAM.

Para 20% dos isolados avaliados, o uso do SHAM não provocou aumento significativo da sensibilidade, evidenciando a ocorrência majoritária de outro mecanismo de resistência que não a respiração alternativa.

Não foi detectado custo adaptativo dos isolados resistentes para maioria das variáveis avaliadas, excetuando-se o PL e a Severidade. Para estas, os valores estimados para os isolados insensíveis foram significativamente mais favoráveis ao desenvolvimento de doença, o que pode indicar que mesmo descontinuando ou suspendendo a aplicação do fungicida, eles podem persistir e até aumentar de frequência na população do patógeno associada aos plantios da região.

REFERÊNCIAS

- AGENCIA ALAGOAS. **Ceasa/AL registra aumento no volume de vendas**, 2010. Disponível em: <http://aquiacontece.com.br/noticia/2010/08/19/ceasaal-registra-aumento-no-volume-de-vendas>. Acesso em: 3 de jan. 2015.
- AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. 2015. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 20 de abr. 2015.
- AMIRI, A.; BRANNEN, P. M.; SCHNABEL, G. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. **Plant Dis.**, v. 94, p. 737-743, 2010.
- ANDRADE, A.C. et al. The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. **Microbiology**, v. 146, p.1987-1997, 2000.
- ANDREI. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 8 ed. São Paulo – SP: Editora Andrei, 2009. P.1378
- ANESIADIS, T.; KARAOGLANIDIS, G. S.; TZAVELLA-KLONARI, K. Protective, Curative and Eradicant Activity of the Strobilurin Fungicide Azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. **J. Phytopathology**, v. 151, p. 647–651, 2003.
- ASSUNÇÃO, E. F. et al. Avaliação do efeito dos extratos de *Lippia sidoides* e *Morinda citrifolia* sobre a germinação de esporos de *Cercospora longissima*. In. **Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, XIII, 2013, Recife – PE.
- AVILA-ADAME, C.; KÖLLER, W. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qoinhibiting fungicide azoxystrobin. **Curr. Genet.**, v. 42, p. 332-338, 2003.
- BAMPI, D. et al. Sensibilidade de *Stenocarpella macrospora* fungicidas. **Biosci. J.**,v. 29, n. 4, p. 787-795, 2013.
- BANNO, S. et al. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene. **PlantPathology**, v. 58, p. 120–129, 2009.
- BARTLETT, D. W. et al. B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, pag. 649-662, 2002.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: conseqüências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 119-127, 2001.

- BIRLA, K. et al. Characterization of cytochrome b from European field isolates of *Cercospora beticola* with outside inhibitor resistance. **Eur J Plant Patho.**, v. 134, p.475–488, 2012.
- BLIXT, E. et al. Fungicide sensitivity in Swedish isolates of *Phaeosphaeria nodorum*. **Plant Pathology**, v. 58, p.655–664, 2009.
- BRADLEY, C. A.; PEDERSEN, D. K. Baseline sensitivity of *Cercospora zeae-maydis* to outside inhibitor fungicides. **Plant Disease**, v. 95, n. 2, p. 189-194, 2011.
- BRENT, K.J.; HOLLOMON, D.W.; **Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?**. 2 ed. Crop life international. FRAC Monograph. 2007. N. 1, pág. 43.
- CAMOANHOLA, C.; VALARINI, P. J. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v.18, n.3, p.69-101, 2001.
- CHEN, Y.; JIN, L.-H.; ZHOU, M.-G. Effect of Azoxystrobin on Oxygen Consumption and *cyt b* Gene Expression of *Colletotrichum capsici* from Chilli Fruits. **Agricultural Sciences in China**, v.8, n. 5, p.628-631, 2009.
- CHIN, K. M. et al. Characterizing resistance risk of *Erysiphegraminis*f. Sp. *Triticito strobilurinus*.**Crop Prot.**, v. 20, p. 87-96, 2001.
- CORRÊA, E. B.; BETTIOL, W. **Controle Biológico da Podridão de Raízes Causada por *Pythium* spp. em Cultivos Hidropônicos**. 1 ed. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. P. 1-26. Documentos 77.
- DEL SORBO, G.; SCHOONBEEK, H.; DE WAARD, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. **Fungal Genet Biol.**, v. 30, p. 1-15, 2000.
- DELEN. N.; TOSUN. N. Modo de ação de fungicidas: Parte 2: Fungicidas com modos de ação específicos. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI. E. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, 2004, v. 12, pag. 27-90.
- ECOCERT. **Produção orgânica de acordo com o regulamento cee 2092/91 consolidado**. (Série: documentos para informação dos produtores). 2008.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **História da Embrapa. Projeto memória** EMBRAPA. 2007. Disponível em: <<http://hotsites.sct.embrapa.br/pme/historia daembrapa>>. Brasília. Acesso em 09 Jul. 2008.
- FAVARO-TRINDADE, C. S. et al. Efeito dos sistemas de produção orgânico, hidropônico e convencional na qualidade de alface lisa. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 111-115, 2007.
- FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D. et al. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v. 11, p. 1-9, 2008.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3 ed. Universidade Federal de Viçosa: Editora UFV, 2008. P. 300.

FONTAINE, S. et al. Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays **Pest Manag Sci**, v. 65, p. 74–81, 2009.

FRAC. 2010. **FRAC recommendations for fungicide mixtures designed to delay resistance evolution**. Disponível em: <www.frac.info>. Acesso em: 01 de jun. 2015.

FRAC. 2013. **List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents**. Disponível em: <<http://www.frac.info/frac/index.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

FRAC. 2014. **FRAC Pathogen Risk List**. Disponível em: <<http://www.frac.info/frac/index.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

FREDERICK, Z. A. et al. Prevalence and Stability of Qualitative QoI Resistance in Populations of *Venturia inaequalis* in the Northeastern United States. **Plant Disease**, v. 98, n. 8, p. 1122-1130, 2014.

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. 2006. **Mutations associated with QoI-resistance**. Disponível em: <<http://www.frac.info>>. Acesso em: 02 de jul. 2015.

FURUYA, S. et al. Rapid method for detecting resistance to a QoI fungicide in *Plasmopara viticola* populations. **Pest Manag Sci**, v.65, p. 840–843, 2009.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2002. P. 78.

GOMES, A. M. A.; MICHEREFF, S. L.; MARIANO, R. L. R. Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, 2004.

GOMES, A. M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; RODRIGUES, V. J. L. B. **Intensidade da cercosporiose da alface em cultivos convencionais e orgânicos em Pernambuco**. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 384-385, 2006.

GROENEWALD, J.Z. et al. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, v.75, p. 115–170, 2013.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alface cultivado no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa hortaliças, 2009. Circular técnico, 75.

HINCAPIE, M. et al. Baseline sensitivity of *Guignardia citricarpa* isolates from Florida to azoxystrobin and pyraclostrobin. **Plant Dis.**, v. 98, p. 780-789, 2014.

HSIEH, W. H.; GOH, T. K. **Cercospora and similar fungi from Taiwan**. Taiwan: Maw Chang Book Company, 1990. P. 376.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia, 2015. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em: 06 de jul. 2015.

- ISHII, H. et al. Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Manag Sci*, v. 65, p. 916–922, 2009.
- ISHII, H. et al. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*, v. 91, p. 1166-1171, 2001.
- JEGER, M. J., WIJNGAARDEN, P. J., AND HOEKSTRA, R. F. Adaptation to the cost of resistance in a haploid clonally reproducing organism: the role of mutation, migration and selection. *J. Theor. Biol.*, v.252, p. 621-632, 2008.
- KAMIYAMA, A. **Agricultura sustentável**. Secretaria do Meio Ambiente / Coordenadoria de Biodiversidade e Recursos Naturais. São Paulo: SMA, 2011. Série II.
- KARADIMOS, D. A.; KARAOGLANIDIS, G. S. Comparative Efficacy, Selection of Effective Partners, and Application Time of Strobilurin Fungicides for Control of *Cercospora* Leaf Spot of Sugar Beet. *Plant Disease*, v. 90, n. 6, p.820-820, 2006.
- KARAOGLADINIS, G. S.; BARDAS, G. Control of Benzimidazole- and DMI-Resistant Strains of *Cercospora beticola* with Strobilurin Fungicides. *Plant Disease*, v. 90, n. 4, p. 419-424, 2006.
- KARAOGLANIDIS, G. S.; LOANNIDIS, P. M.; THANASSOULOPOULOS, C. C. Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol-demethylation-inhibiting fungicides. *Plant Pathology*, v. 49, p. 567-572, 2000.
- KARAOGLANIDIS, G. S.; LOANNIDIS, P. M.; THANASSOULOPOULOS, C. C. Changes in sensitivity of *Cercospora beticola* populations to sterol-demethylation-inhibiting fungicides during a 4-year period in northern Greece. *Plant Pathology*, v. 51, p. 55 – 62, 2002.
- KARAOGLANIDIS, G. S.; LUO, Y.; MICHAILEDIS, T. J. Competitive Ability and Fitness of *Alternaria TTP nate* Isolates Resistant to QoI Fungicides. *Plant Disease*, v. 95, n. 2, 2011.
- KILDEA, S. et al. Pyraclostrobin reduces germ tube growth of QoI-resistant *Mycosphaerella graminicola* pycnidiospores and the severity of septoria tritici blotch on winter wheat. *Plant Pathology*, v. 59, p. 1091–1098, 2010.
- KIM, Y. K.; XIAO, C. L. Stability and Fitness of Pyraclostrobin- and Boscalid Resistant Phenotypes in Field Isolates of *Botrytis cinerea* from Apple. *Phytopathology*, v. 101, n. 11, p.1385-1391, 2011.
- KIM, Y. S.; DIXON, E. W.; VINCELLI, P.; FARMAN, M. L. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology*, v. 93, p. 891-900, 2003.
- KOBORI, R. F.; BRUNELLI, K. R.; GIORIA, R. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da alface no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. **Impacto das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. 1ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011. P. 129 – 144.

KUBICEK, C.P. et al. Regulation of citric acid production by oxygen: effect of dissolved oxygen tension on adenylate levels and respiration in *Aspergillus niger*. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 9, p. 101-115, 1980.

LESNIAK, K. E. et al. Occurrence of QoI Resistance and Detection of the G143A Mutation in Michigan Populations of *Venturia inaequalis*. **Plant Disease**, v. 95, n. 8, p. 927-934, 2011.

LOMBARDI, A. P. Z. **Caracterização patogênica, morfológica, fisiológica, molecular e sensibilidade a fungicida de *Cercospora coffeicola***. 2002. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu – SP, 2002. P. 24 -101.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. **Doenças da alface**. Embrapa Hortaliças, circular técnica 14, 1998. P. 1-18. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107340/1/cnph-documentos-14-doencas-da-alface-fl-07824.pdf>>. Acesso em: 08 nov. 2014.

LOPES, P. R.; LOPES, K. C. S. A. sistemas de produção de base ecológica – a busca por um desenvolvimento rural sustentável. **REDD – Revista Espaço de Diálogo e Desconexão**, Araraquara, v. 4, n. 1, 2011.

LOPES, S.; ROSSO, S. Evolução – teorias e evidências. In: LOPES, S.; ROSSO, S. **Biologia**. 1 ed. São Paulo: Saraiva, 2005, volume único, p. 511-523.

MA, B.; UDDIN, W. Fitness and competitive ability of an azoxystrobin-resistant G143A mutant of *Magnaporthe oryzae* from perennial ryegrass. **Plant Dis.**, v. 93, p. 1044-1049, 2009.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, p. 853-863, 2005.

MALANDRAKIS, A. A. et al. Biological and molecular characterization of laboratory mutants of *Cercospora beticola* resistant to Qo inhibitors. **European Journal of Plant Pathology**, v.116, p. 155–166, 2006.

MALANDRAKIS, A. A. et al. Molecular diagnostic for detecting the cytochrome b G143S – QoI resistance mutation in *Cercospora beticola*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, p. 87–92, 2011.

MARKOGLU, N.A. et al. Characterization of laboratory mutant of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. **Eur. J. Plant Pathol.** V. 115, p. 149-162, 2006.

MARTINS, R. B. **Variabilidade de *Cercospora coffeicola* em Minas Gerais com base em compatibilidade vegetativa e produção de cercosporiose**. 2007. Tese (*DoctorScientiae*) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

MCGRATH, M. T. 2004. **What are Fungicides?**. Disponível em: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/Fungicides.aspx>. Acesso em: 30 de agos. 2013.

- MIGUEL, F. B.; GRIZOTTO, R. K.; FURLANETO, F. P. B. Custo de produção de alface em sistema de cultivo orgânico. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 7, n. 2, 2010.
- MINAGAWA, N.; YOSHIMOTO, A. The induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. **J. Biochem.**, v.101, p. 1141-1146, 1987.
- MIYAZAWA, M.; KHATOUNIAN, C. A.; PENHA, L. A. O. Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. **Agroecologia**, 2001.
- MIZUTANI, A. et al. A possible mechanism of control of rice blast disease by a novel alkoxyimino acetamide fungicide, SSF126. **Phytopathology**, v. 86, p. 295-300, 1996.
- MONTEIRO, P. **Alagoas se torna auto-suficiente na produção de alface, coentro e cebolinha**: cultura de hortaliças em Arapiraca gera faturamento regular aos produtores. Agência SEBRAE de Notícias, 2008. Disponível: <<http://www.agenciasebrae.com.br>>. Acesso: 8 jan. 2013.
- MONTEIRO, P. **Alagoas se torna auto-suficiente na produção de alface, coentro e cebolinha**. Agência Alagoas – AL, 2008. Disponível em: <http://agenciaalagoas.al.gov.br>. Acesso em: 05 de set. 2013.
- MORGERA, E.; CARO, C. B.; DURÁN, G. M. **Organic agriculture and the Law**. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2012.
- NECHET, K.L. ; BARRETO, R.W.; MIZUBUTI, E.S.G. *Bipolaris euphorbiae* as a biological control agent for wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*): host-specificity and variability in pathogen and host populations. **Bio Control**, v. 51, n. 2, p.259–275, 2006.
- OLAYA, G.; KOLLER, W. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoximmethyl. **Plant Dis.**, v. 83, p. 274–278, 1999.
- OLAYA, G.; KOLLER, W. Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. **Pestic. Sci.**, v. 55, p. 1083-1088, 1999.
- OLAYA, G.; ZHENG, D.; KOLLER, W. Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. **Pestic. Sci.**, v. 54, p. 230-236, 1998.
- PAVAN, M. A.; KUROZAWA, C. Doenças da alface. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia, volume 2: Doenças das plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. P. 27-32. V. 2.
- PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; CARVALHO, A. D. F. **Diagnose e controle alternativo de doenças em alface, alho, cebola e brássicas**. Circular técnica. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2013. P. 4.
- PIMENTEL, C.P.V.; FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos em meio de cultura. **Biológico**, v.55, n.1/2, p.27-33, 1989.

- PRICE, P. P. **Sensitivity and resistance of *Cercospora kikuchii*, causal agent of cercospora leaf blight and purple seed stain of soybean, to selected fungicides.** Dissertação (Doctor of Philosophy) 2013. Louisiana State University, 2013.
- PRIMAVESI, A. **Revisão do conceito de agricultura orgânica: conservação do solo e seu efeito sobre a água.** *Biológico*, São Paulo, v.65, n.1/2, p.69-73, jan./dez., 2003.
- RAID, R. N. *Cercospora*. In: DAVIS, R. M.; SUBBARAO, K. V.; RAID, R. N.; KURT, E. A. (Eds). **Compedium of lettuce disease**. St. Paul: APS Press, 1997. p.16-17.
- RALLOS, L. E. E. et al. Fitness of *Erysiphe necator* with G143A-Based Resistance to Quinone Outside Inhibitors. **Plant Disease**, v. 98, n. 11, p. 1494-1502, 2014.
- RESENDE, F. V. et al. **Cultivo de alface em sistema orgânico de produção.** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007. p. 16. Circular Técnica, 56.
- ROSENZWEIG, N. et al. Use of PCR-RFLP Analysis to Monitor Fungicide Resistance in *Cercospora beticola* Populations from Sugarbeet (*Beta vulgaris*) in Michigan, UnitedStates. **Plant Disease**, p. 1-36, 2014.
- S. A. M. H. NAQVI. **Diseases of fruits and vegetables.** Volume II. 125-126. 2004 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- SANTOS, K. M. et al. Levantamento e prevalência de doenças em cultivo alface, coentro e cebolinha no Agreste de Alagoas. In. 47º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2014, Londrina - PR. **Anais do CBF**. Fitopatologia Brasileira, p. 438.2.
- SAVARY, S. Épidémiologie de la cercosporiose de la laitue (*Lactuca sativa* L.) em republique de Côte-d'Ivoire: étude de quelques étapes du cycle épidémiologique. **Agronomie**, Paris, v. 3, n. 9, p. 903-909, 1983.
- SCHOUSTRA, S. E. et al. Comparing artificial and natural selection in rate of adaptation to genetic stress in *Aspergillus nidulans*. **J. Evol. Biol.**, v. 18, p. 771-778, 2005.
- SHERF, A. F.; MACNAB, A. A. **Vegetable diseases and their control.** 2. ed. Canada: John Wiley & Sons, 1986. p. 415.
- SILVA, E. M. N. C. P. et al. Qualidade de alface crespa cultivada em sistema orgânico, convencional e hidropônico. **Horticultura brasileira**, v. 29, n. 2, abr.- jun. 2011.
- SOUZA, A. G. C. **Variabilidade fisiológica de isolados de *Cercospora coffeicola*.** 2007. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- SOUZA, A. L. G. **Efeito dos sistemas de produção orgânico e convencional na qualidade nutricional de alface dos grupos lisa, crespa e americana.** 2012. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão – SE, 2012. p. 52-67.

- SOUZA, A.G.C. et al. Esporulação in vitro de *Cercospora coffeicola*. In. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, XXXVIII, 2005, Brasília - DF. **Anais do CBF**. Fitopatologia Brasileira, p. 216.
- SOUZA, P. E.; DUTRA, M. R. **Fungicidas no controle e manejo de doenças de plantas**. Lavras: Editora UFLA, 2003. p. 174.
- TONIN, R. B. et al. **Informativo técnico nº28**. Laboratório de Fitopatologia – Universidade de Passo Fundo, 2011.
- TUMBEK, A. C. et al. Sensitivity of *Cercospora beticola* populations in Turkey to *utriafol, mancozeb, and fentin acetate. **Turk J Agric For**, v. 35, p. 65-71, 2011.
- VEGA, B. et al. A Rapid Resazurin-Based Microtiter Assay to Evaluate QoI Sensitivity for *Alternaria alternata* Isolates and Their Molecular Characterization. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p. 1262-1270, 2012.
- VINCELLI, P.; DIXON, E. Resistance to QoI (strobilurin-like) fungicides in isolates of *Pyricularia grisea* from perennial ryegrass. **Plant Dis.**, v. 86, p. 235-240, 2002.
- WALKER, A.-S. et al. First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains. **Pest Manag Sci**, v. 65, p. 906–915, 2009.
- WALKER, H.L. *Alternaria macrospora* as a potential biocontrol agent for spurred anoda: production of spores for field studies. **USDA Advanced Agricultural Techniques**, n. 12., p. 5, 1980.
- WISE, K.A. et al. Baseline sensitivity of *Ascochyta rabiei* to azoxystrobin, pyraclostrobin, and boscalid. **Plant Dis.**, v. 92, p. 295-300, 2008.
- WOOD, P. M.; HOLLOMON, D. W. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. **Pest Manag Sci**, v. 59, p. 499-511, 2003.
- YEH, C. C.; SINCLAIR, J. B. Sporulation and Variation in Size of Conidia and Conidiophores Among Five Isolates of *Cercospora kikuchii*. **Plant Disease**, v. 64, n. 4, 1980.
- ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S.; OLIVEIRA, S. H. F. **Manejo da resistência de fungos a fungicidas**. Viçosa, MG: UFV, DFP, 2007. p. 168.
- ZHANG , G. et al. Sensitivity of *Cercospora soja* isolates to quinone outside inhibitor fungicides. **Crop Protection**, v. 40, p. 63-68, 2012.
- ZHANG, G. *Cercospora soja*: over-winter survival and fungicide resistance. 2012. Dissertação (Doutor em Filosofia em Ciências da cultura) Universidade de Illinois em Urbana-Champaign, 2012.
- ZHANG, Z. et al. A molecular mechanism of azoxystrobin resistance in *Penicillium digitatum* UV mutants and a PCR-based assay for detection of azoxystrobin-resistant

strains in packing- or store-house isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 157–161, 2009.

ZHENG, D.; OLAYA, G.; KÖLLER, W. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. **Curr. Genet.**, v. 38, p. 148-155, 2000.

ZIOGAS, B. N.; BALDWIN, B. C.; YOUNG, J. E. Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. **Pestic.Sci.**, v. 50, p. 28-34, 1997.