



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

**ETIOLOGIA E PREVALÊNCIA DA PODRIDÃO DE SAIA EM  
ALFACE NO DISTRITO FEDERAL**

**LUIZ HENRIQUE ROCHA LOPES**

**Brasília – DF**

**2020**

**Luiz Henrique Rocha Lopes**

**ETIOLOGIA E PREVALÊNCIA DA PODRIDÃO DE SAIA EM ALFACE  
NO DISTRITO FEDERAL**

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

**Orientador**

Adalberto Corrêa Café Filho

**Brasília**

**Distrito Federal – Brasil**

**2020**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Lopes, Luiz Henrique Rocha

Etiologia e Prevalência da Podridão de saia em alface no Distrito Federal. Orientação: Adalberto Corrêa Café Filho. 2020. 128 p.

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

Lopes, L.H.R. 2020. Etiologia e Prevalência da Podridão de saia em alface no Distrito Federal. Brasília, Universidade de Brasília, Tese de Doutorado. 128 p.

## **CESSÃO DE DIREITOS**

NOME DO AUTOR: Luiz Henrique Rocha Lopes

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Etiologia e Prevalência da podridão de saia em alface no Distrito Federal.

GRAU: DOUTOR

ANO: 2020

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

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Adalberto Corrêa Café Filho, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e da Fundação de amparo à pesquisa do Distrito Federal – FAPDF.

**ETIOLOGIA E PREVALÊNCIA DA PODRIDÃO DE SAIA EM ALFACE NO  
DISTRITO FEDERAL**

**Luiz Henrique Rocha Lopes**

TESE APROVADA em 20/03/2020, por:

---

Murillo Lobo Junior, D.Sc. (Embrapa Arroz e Feijão)  
Examinador Externo

---

Marcos Paz Saraiva Câmara, Ph.D. (Universidade Federal Rural de Pernambuco)  
Examinador Externo

---

Robert Neil Gerard Miller, Ph.D. (Universidade de Brasília)  
Examinador Interno

---

Adalberto Corrêa Café Filho, Ph.D. (Universidade de Brasília)  
Orientador

---

Carlos Alberto Lopes, Ph.D. (Embrapa Hortaliças)  
Suplente

Brasília – Distrito Federal  
Brasil  
2020

*Dedicatória*

Dedico esta tese aos meus pais, Luiz Otávio Raiol Lopes e Maria Eliete Rocha Lopes, por abdicarem de suas vidas para darem sempre o melhor que puderam para minha educação.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus por cuidar sempre de mim, me auxiliando e me ajudando na concretização dos meus planos durante minha estadia nesta terra. Além disso, quero expressar meus agradecimentos aos meus pais, Luiz Otávio Lopes e Maria Eliete Lopes, por toda dedicação na minha criação, pelo amor que sempre tiveram por mim e por sempre me apoiarem em todos os momentos decisivos da minha vida. Expresso também minha gratidão aos meus irmãos, Victor Hugo Lopes e Isabella Vitória Lopes, por estarem sempre ao meu lado nos momentos que mais precisei, pelo carinho e cumplicidade sem igual.

Toda minha gratidão aos meus professores, sem exceções. Desde aqueles dos primórdios de minha educação até os que tive na lauta fase acadêmica de doutorado. Cada um de vocês contribuíram diretamente para a eterna soma de caracteres que hoje fazem de mim, Doutor em Fitopatologia. Jamais irei esquecê-los.

Quem me conhece, sabe o quanto eu aprecio o ato de fazer amigos, e nesta cidade tive o privilégio de conhecer pessoas incríveis a quem devo minha eterna gratidão por terem me ajudado a tornar esta fase de *posgrado* mais descontraída. Em especial à Artur Araújo, Lucas Baraúna, Pedro Queiroz, Júlio, Guilherme Moreno, Edimilson, Leozinho e Yuri por compartilharem suas artes e por colaborarem na promessa pessoal de nunca enterrar meu dom musical, responsável por me fornecer mais da metade de todas as minhas experiências de vida e amizades conquistadas.

Uma tese nunca foi e nunca será construída por única pessoa. Gostaria de expressar minha eterna gratidão a todos os meus amigos do Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças que colaboraram para que minha pesquisa pudesse ser finalizada. Fabiana, Luana, Wagner, Cléia, Elenice, Maurício, Dorian, Caio, Breno, Alba, Gustavo, Rafa, Josefa, Cris, Tadeu e Hagassi, muito obrigado a todos vocês pelo companheirismo, amizade e pela preciosa ajuda de cada um! Estendo de modo especial esta gratidão aos meus orientadores, Ailton Reis e Café Filho, pela compreensão, amizade e paciência durante minha orientação no doutorado e a Raiany Sousa por todo o carinho, apoio e ensinamentos compartilhados. Sem vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui.

Gostaria de agradecer especialmente a Ana Júlia Torres e família por todo o carinho, cuidado, cumplicidade e apoio para comigo, durante o desenvolvimento desta tese. Muito obrigado!

E aos amigos João, Jefferson Velez e Catharine pelos inesquecíveis momentos de descontração!

# SUMÁRIO

LISTA DE DE FIGURAS.....	IX
RESUMO GERAL.....	XII
GENERAL ABSTRACT .....	XIV
<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 - ORIGEM, HISTÓRIA E TAXONOMIA DA ALFACE.....	17
1.2 - OS TIPOS DE ALFACE E O PANORAMA MERCANTIL .....	18
1.3 - NUTRACÊUTICA DA ALFACE .....	20
1.4 – DOENÇAS DA ALFACE.....	21
1.4.1 - Vírus como agente de doenças na alface .....	22
1.4.2 - Bactérias como agentes de doenças na alface .....	24
1.4.3 - Nematoides como agentes de doenças na alface.....	26
1.4.4 - Fungos como agentes de doenças na alface.....	27
1.5 - RIZOCTONIOSE OU PODRIDÃO DA SAIA .....	28
1.5.1 - Histórico, aspectos epidemiológicos e sintomatológicos da doença.....	28
1.5.2 - O gênero <i>Rhizoctonia</i> .....	30
1.5.3 - O uso da biologia molecular na taxonomia do gênero <i>Rhizoctonia</i> .....	38
1.5.4 - O gênero <i>Pythium</i> no complexo de espécies da podridão de saia em alface .....	40
1.5.5 - O uso da biologia molecular na taxonomia do gênero <i>Pythium</i> .....	43
1.6 - CONTROLE DA PODRIDÃO DE SAIA EM ALFACE.....	44
1.7 - JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E HIPÓTESES .....	46
1.7.1 - Objetivos .....	47
1.7.2 – Geral.....	47
1.7.3 - Específicos.....	47
1.7.4 – Hipóteses .....	48
1.8 –REFERÊNCIAS .....	48
<b>2 – DETERMINAÇÃO DO TAMANHO IDEAL DE AMOSTRAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DA PODRIDÃO DE SAIA EM ALFACE CRESPA NO DISTRITO FEDERAL – BRASIL. ....</b>	<b>70</b>
2.1 - RESUMO .....	70
2.2 - ABSTRACT .....	71
2.3 - INTRODUÇÃO.....	72
2.4 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	74
2.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
2.4 – AGRADECIMENTOS .....	78
2.4 – REFERÊNCIAS .....	79
<b>3 – ETIOLOGIA E PREVALÊNCIA DA PODRIDÃO DE SAIA EM ALFACE NO DISTRITO FEDERAL.....</b>	<b>84</b>
3.1 - RESUMO .....	84
3.2 - ABSTRACT .....	86
3.3 - INTRODUÇÃO.....	87
3.4 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	90
3.4.1 - PREVALÊNCIA DA DOENÇA.....	90
3.4.2 - OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	91
3.4.3 - EXTRAÇÃO DE DNA.....	92

3.4.4 - AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS REGIÃO GENÔMICAS.....	92
3.4.5 - ANÁLISES FILOGENÉTICAS .....	93
3.4.6 - TESTES DE PATOGENICIDADE, PERÍODO DE INCUBAÇÃO, INCIDÊNCIA E AGRESSIVIDADE.....	97
3.5 – RESULTADOS.....	99
3.5.1 - PREVALÊNCIA DA DOENÇA.....	99
3.5.2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES CAUSAIS .....	104
3.5.3 - TESTES DE PATOGENICIDADE, PERÍODO DE INCUBAÇÃO, INCIDÊNCIA E AGRESSIVIDADE <i>in Planta</i> .....	106
3.6 – DISCUSSÃO .....	112
3.7 – REFERÊNCIAS .....	118
<b>4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>127</b>



## LISTA DE DE FIGURAS

- Figura 1: Sintomas da podridão de saia. A) Sintoma na nervura principal da folha de coloração marrom chocolate. B) Folhas da saia em estado necrótico sendo atingidas pela doença. Fotos: Luiz Lopes. .... 30
- Figura 2: As 5 grandes regiões produtoras de alface do Distrito federal (Brazlândia, Inkra 9, Estrutural, Vargem Bonita e Samambaia-veredas) utilizadas neste estudo. .... 75
- Figura 3: Prevalência da podridão de saia em alface em núcleos rurais no Distrito Federal nos anos de 2017-2019 ..... 100
- Figura 4: Boxplot do teste de Kruskal-Wallis para a prevalência da podridão de saia em alface em núcleos rurais do Distrito Federal, nos anos 2018-2019..... 101
- Figura 5: Registro do manejo inadequado nas áreas do Inkra 9: A) Mudanças em ambiente aberto, em contato direto com o solo; B e C) Ruas totalmente encharcadas por irrigação inadequada; D e E) Restos de cultura no plantio com presença da podridão de saia; E) Presença massiva de plantas invasoras no plantio. Fotos: Luiz Lopes. .... 103
- Figura 6: Índice de chuva acumulada no território do Distrito Federal durante os anos de 2017 a 2019. Os dados foram obtidos a partir de 54 estações pluviométricas. Todos os registros utilizados para plotagem desta figura pertencem à Agência Nacional de Águas – ANA (Ministério do Desenvolvimento Regional). .... 104
- Figura 7: Árvore filogenética gerada por análise Bayesiana obtida dos alinhamentos de 59 isolados de *Rhizoctonia* com referências de AGs pertencentes à *R. solani* e espécies binucleadas. .... 105
- Figura 8: Árvore filogenética gerada por análise Bayesiana obtida dos alinhamentos de 14

isolados de *Pythium* com referências tipo de espécies deste gênero..... 107

Figura 9: Sintomas primários da podridão de saia em alface observados após 24 horas da inoculação. A) Testemunha; B) Sintomas iniciais da podridão de saia causadas por *Rhizoctonia* (isolado LH 43) caracterizados por pequenas manchas marrons; C) Sintomas iniciais similares ao causado pelo isolado de *Rhizoctonia* LH 43 causados pelo isolado de *Pythium* Pyt 754. Fotos: Luiz Lopes.. ..... 108

Figura 10: A) Folha com sintomas da podridão de saia causados por *Pythium tracheiphilum*; B) nervura central do limbo indicando lesão vascular. C) secção transversal do limbo com lesão na região medular (RM) e comprometimento dos vasos de xilema (XL) D e E) secção de transição entre tecido sadio e tecido lesionado indicando vasos de xilema sadios (translúcidos) e vasos necrosados (escurecidos) por *P. tracheiphilum* F) secção longitudinal indicando apodrecimento vascular do xilema bem como das estruturas (do tipo helicoidal) de revestimento interno dos vasos (ERV)..... 111

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localidade das áreas amostradas indicando o total de plantas avaliadas por área, média e variância da incidência, o padrão predominante de agregação da doença (LIP) e a quantidade ideal de plantas para amostragens da incidência de podridão de saia em campos de produção de alface no Distrito Federal, considerando erros aceitáveis de 5%, 10% e 20%....	77
Tabela 2: Acessos do GenBank utilizados para as análises filogenéticas deste estudo .....	93
Tabela 3: Teste de Nemenyi para a Prevalência da podridão de saia no Distrito Federal. ....	101
Tabela 4: Resultado do teste de patogenicidade, período de incubação, incidência e agressividade dos isolados de <i>Rhizoctonia</i> representativos dos AGs relatados neste trabalho. ....	108
Tabela 5: Resultado do teste de patogenicidade, período de incubação, incidência e agressividade dos isolados de <i>Pythium</i> utilizados neste trabalho. ....	110

## Resumo Geral

Lopes, Luiz Henrique Rocha. **Etiologia e Prevalência da Podridão de Saia em Alface no Distrito Federal. 2020.** 128 p. Doutorado em Fitopatologia- Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O Distrito Federal (DF) produz grande quantidade de hortaliças. Esta atividade é uma das mais importantes do agronegócio local, gerando mais de 30 mil empregos em toda a cadeia produtiva, utilizando mais de 8 mil hectares para o cultivo de diversas hortaliças, sobretudo de alface. Toda esta atividade abastece o mercado interno de folhosas. Sendo que o excedente é exportado para outros estados especialmente os da Região Centro Oeste. Apesar da robustez do segmento, fatores têm impedido um maior crescimento do comércio de folhosas no DF. Entre eles, a doença conhecida como podridão de saia da alface, sobre a qual importantes aspectos são desconhecidos. Desta forma, os principais objetivos deste estudo foram: (i) determinar o tamanho ideal de amostras para a quantificação da podridão de saia em alface crespa; (ii) estimar a prevalência da podridão de saia em plantios comerciais de alface nos principais núcleos rurais produtores do Distrito Federal, (iii) identificar as espécies de patógenos causadores de podridão de saia de alface no Distrito Federal e (iv) avaliar a patogenicidade e agressividade de isolados de *Rhizoctonia* e *Pythium* obtidos de alface crespa. As amostragens foram realizadas em cinco grandes áreas produtoras de alface no DF. Determinou-se o total de 24 parcelas/ha, com 20 plantas por cada parcela, para avaliação do tamanho ideal de amostragem para quantificação da doença. A incidência em cada área foi calculada pela porcentagem de plantas com sintomas da podridão de saia em relação ao total de plantas saudias. Foram obtidos isolados dos gêneros *Rhizoctonia* (analisados com base na região ITS) e *Pythium* (analisados com base na região COX II). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o DF apresenta grande incidência desta doença em campo (47,8%) sendo que a grande área Incra 9 foi a que teve maior prevalência (81,4%) quando comparada

com as demais. Dentro do gênero *Rhizoctonia* foram detectados quatro grupos de anastomose (AG's): AG1-IB, AG4-HGI, AG4-HGIII e AG-A. E dentre os isolados de *Pythium* foram detectadas quatro espécies: *P. sylvaticum*, *P. tracheiphilum*, *P. nodosum* e *P. ultimum*. Todos os representantes testados in vitro dos AGs e das espécies de *Pythium* encontrados nesta pesquisa foram patogênicos em folhas de alface. Esta é a primeira vez que os grupos AG4-HGI, AG4-HGIII e AG-A são relatados a nível nacional causando podridão da saia em alface, bem como os grupos AG-A e AG4-HGIII à nível mundial causando esta doença em alface. As espécies *P. tracheiphilum*, *P. sylvaticum* e *P. nodosum* não haviam sido detectadas no Brasil e este estudo constitui os respectivos primeiros relatos. Estas informações podem servir como base para um melhor planejamento das estratégias de controle e/ou estudos epidemiológicos envolvendo esta importante doença que acomete todos os campos de cultivo de alface no Distrito Federal e de outras regiões nacionais.

**Palavras chave:** Filogenia; Grupos de Anastomose; *Pythium*; *Rhizoctonia solani*; *Lactuca sativa*.

---

Orientador – Dr. Adalberto Corrêa Café Filho – Universidade de Brasília.

## General Abstract

Lopes, Luiz Henrique Rocha. **Etiology and Prevalence of Bottom Rot of Lettuce in the Federal District. 2020.** 128 p. Doctorate in Plant Pathology- University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

The Brazilian Federal District (DF) produces a large amount of vegetables, and this activity is one of the most important in the local agribusiness. More than 30 thousand jobs are generated throughout the production chain, in an area of over 8 thousand hectares for the cultivation of various vegetables, especially lettuce. The bulk of the yield supplies the domestic regional market, while the surplus is exported to other states, mostly to those in the Brazilian Midwest Region. Despite the robust lettuce industry, several factors have prevented a more sustained growth of the lettuce business in DF. Among them, one of the most relevant is the disease known as bottom rot of lettuce, about which much information is lacking. Therefore, the main objectives of this study were: (i) to determine the most appropriate sample size for the quantification of lettuce bottom rot, (ii) to estimate the prevalence of bottom rot in commercial lettuce fields in the main rural centers producing the Distrito Federal, (iii) to identify the species of pathogens that cause bottom rot of lettuce in the Federal District and (iv) to evaluate the pathogenicity and aggressiveness of *Rhizoctonia* and *Pythium* isolates obtained from curly lettuce. Sampling was carried out in five large lettuce producing areas in DF. In our studies, it was determined that the number of plots to be evaluated for disease prevalence was 24 plots/ha, with 20 plants per plot. The incidence in each area was calculated by the percentage of plants with symptoms of bottom rot in relation to the total of healthy plants. Isolates of the genera *Rhizoctonia* (analyzed with basis on the ITS region) and *Pythium* (analyzed with basis on the COX II region) were obtained. The results demonstrate that the DF has a high field incidence of this disease in all the evaluated areas (47.8%) and that the large area Incra 9 is the one with the highest prevalence (81.4%) when compared with the

others. Within the *Rhizoctonia* genus, four anastomosis groups (AG's) were detected: AG1-IB, AG4-HGI, AG4-HGIII and AG-A. Among the *Pythium* isolates, four species were detected: *P. sylvaticum*, *P. tracheiphilum*, *P. nodosum* and *P. ultimum*. All *Rhizoctonia* AGs and *Pythium* species representatives were pathogenic to lettuce leaves in *in vitro* assays. To the best knowledge of the author, this is the first time that the groups AG4-HGI, AG4-HGIII and AG-A are reported at national level causing bottom rot in lettuce. In addition, this is the first worldwide report of groups AG-A and AG4-HGIII causing this disease in lettuce. The species *P. tracheiphilum*, *P. sylvaticum* and *P. nodosum* had not been detected in Brazil and this study constitutes each their first respective report. This information can serve as a basis for better planning of control strategies and/or epidemiological studies involving this important disease that affects all fields of lettuce cultivation in the Federal District and elsewhere.

**Keywords:** Filogeny; Anastomose groups; *Pythium*; *Rhizoctonia solani*; *Lactuca sativa*.

Advisor –Adalberto Corrêa Café Filho, Ph.D. – University of Brasília.

# CAPÍTULO 1

---

## **Introdução**



# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 - ORIGEM, HISTÓRIA E TAXONOMIA DA ALFACE

Etimologicamente, o vocábulo “alface” originou-se do árabe “الخس Al-khass” (Ferreira, 1985) e é conhecida pelo binômio latino *Lactuca sativa* L. Aparentemente o centro de origem da alface está localizado no território Sul Europeu e na Ásia Ocidental (Ryder, 1999). Para manter esta suposição, existem dois indícios: o primeiro, é o fato de existirem pinturas rupestres e em tumbas no Egito, datadas de 4500 a.C. que mostram feixes de folhas que muito se parecem com as alfaces cultivadas atualmente. E o segundo, é o fato que nestas regiões é encontrada uma forma considerada primitiva da alface, a *Lactuca serriola* L. (Davis *et al.*, 1997), conhecida popularmente em países de língua portuguesa como alface-brava.

O primeiro registro escrito que se conhece sobre a cultura da alface é remetido ao ano de 550 a.C. por Herodotus, que relatou a presença desta hortaliça como sendo comum na cozinha real do Império Persa na época. Após isso, diversos outros ilustres gregos abordaram em seus escritos assuntos envolvendo a alface. Como é o caso de registros feitos em 430 a.C por Hipócrates, o pai da medicina, onde consta a importância das propriedades medicinais atribuídas à alface. Além destes, Aristóteles em 356 a.C. e Cláudio Galeno em 164 a.C., relataram sobre a popularidade desta planta na Grécia antiga (Davis *et al.*, 1997). No entanto, cientificamente, a alface só foi descrita em 1753 por Carl Linnaeus no segundo volume do seu livro “*Species Plantarum*”. Recebeu o binômio latino que hoje conhecemos por influência da expressão latina “lac” que significa leite, fazendo alusão ao látex que exsuda quando ocorre o rompimento dos tecidos deste vegetal (Katz & Weaver, 2003).

No Brasil, a alface foi introduzida no século XVI, através dos portugueses que vieram no processo de colonização (Filgueira, 2008). Sendo atualmente, a hortaliça folhosa mais cultivada e consumida no Brasil (Azevedo Filho, 2017).

Quanto à morfologia botânica, a alface é classificada como um vegetal de porte

herbáceo com folhas alternas ligadas a um caule curto e rijo (Azevedo Filho, 2017). As folhas são amplas e se desenvolvem em forma de roseta, rodeando o caule. Seu sistema radicular é bastante ramificado e relativamente curto. Quando se usa o processo de transplântio, o sistema radicular utiliza apenas a camada superior de até 25 cm do solo para o seu desenvolvimento, ao passo que, em casos de semeadura direta, a raiz axial pode atingir até os 60 cm de profundidade (Filgueira, 2013). Quanto à taxonomia a alface pertence à família Asteraceae, subfamília Cichorioideae e a tribo Lactuceae (Ryder, 1999). Sendo esta família a maior dentro das plantas dicotiledôneas, contendo aproximadamente 23.000 espécies alocadas em mais de 1.500 gêneros (Almeida, 2006).

## 1.2 - OS TIPOS DE ALFACE E O PANORAMA MERCANTIL

De acordo com as cultivares, a alface pode apresentar folhas lisas ou crespas que podem ter coloração variando entre verde e roxo, podendo ou não formar “cabeça”. Essas cultivares são agrupadas segundo Filgueira (2013) em seis tipos distintos, a saber: **tipo I** – repolhuda crespa; **tipo II** – repolhuda manteiga; **tipo III** – solta lisa; **tipo IV** – solta crespa; **tipo V** – mimosa e **tipo VI** – romana.

A repolhuda crespa possui folhas crespas e bem firmes com nervuras destacadas, formando uma cabeça compacta sendo as internas mais crocantes que as externas, preferidas para a confecção de sanduíches em redes de “*fastfood*”. Já a tipo repolhuda manteiga, possui folhas bem mais lisas e delicadas, com aspecto amanteigado, formando também cabeça compacta. A alface tipo solta lisa, possui folhas macias e soltas sem a formação de cabeças. A do tipo mimosa, possui folhas delicadas com aspecto recortado e é um tipo varietal recente que vem adquirindo certa relevância comercial no Brasil. E por sua vez, a tipo romana, que possui folhas alongadas, com nervuras bem proeminentes, formando cabeças diferentes dos demais tipos varietais, por apresentarem cabeças pouco densas e menos compactas. Além da classificação supracitada, as cultivares de alface no Brasil podem ser divididas em cinco

grupos: grupo americana; grupo crespada; grupo lisa ou manteiga; grupo mimosa e grupo romana (Azevedo Filho, 2017).

A alface é muito cultivada em todo o mundo. Em 2017, a produção desta hortaliça acumulada com a da chicória (*Chicorium endívia* L.), alcançou a marca de 27 milhões de toneladas. Sendo que a China ocupou o primeiro lugar do ranking com 15,2 milhões de toneladas. Em segundo lugar os Estados Unidos com 3,8 milhões de toneladas e em terceiro a Índia com 1,1 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2017). Na América do Norte, os Estados Unidos é o maior produtor, com a produção concentrada no estado do Arizona e na região Central da Califórnia, sendo considerada como um dos dez mais valiosos produtos do agronegócio, movimentando cerca de US\$ 2 bilhões por ano (Kandel, 2015).

A alface é uma cultura que permite ao produtor plantar várias vezes ao longo de um único ano. Este fato, somado ao hábito do brasileiro no consumo desta hortaliça e uma demanda alimentar cada vez maior por parte da população, fazem desta cultura a folhosa mais consumida e produzida em nosso país, conferindo-lhe alta importância social e econômica (Sala & Costa, 2016). No campo, os plantios de alface são feitos de forma intensiva e praticados na maior parte das vezes por agricultores familiares, conseguindo gerar cerca de cinco empregos diretos por cada hectare cultivado. Sendo desta forma, de grande importância para o agronegócio brasileiro (Costa & Sala, 2005).

Cerca de 50% de toda a produção e comercialização do segmento de folhosas é oriundo da cultura da alface. Sendo que esta atividade, ocupa o terceiro maior volume de produção, superada apenas pelas produções de melancia e de tomate, movimentando anualmente R\$ 8 bilhões no comércio do varejo com uma produção de mais de 1,5 milhões de toneladas por ano (Exame, 2016).

Até a década de 90, as alfaves do grupo ‘lisa’ eram as mais cultivadas no Brasil, com predomínio da cultivar “Regina”. Com o passar dos anos, esta posição foi ocupada pelas

cultivares de alface crespa, que até hoje mantém seu destaque na produção nacional. Curiosamente, esta preferência pela alface crespa é exclusiva do Brasil em termos mundiais. As características intrínsecas destas cultivares como, folhas flabeladas e a não formação de cabeça, deram a elas destaques para suportar as altas temperaturas e pluviosidades durante o período de verão (Sala & Costa, 2012). Atualmente, tem se observado no mercado brasileiro um crescimento do grupo varietal americano por conta da atividade dos restaurantes e lanchonetes de “*fastfood*”. Este crescimento do mercado consumidor está associado à sua textura crocante e seu diferenciado sabor. Estas mudanças são refletidas em dados levantados pela Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo – CEAGESP, a qual mostrou que a comercialização de alfaces do grupo americana passou de 9% em 1995 para mais de 34% em 2010. No mesmo íterim, a comercialização do grupo crespa passou de 38% para 54%, ao passo que o grupo Lisa regrediu de 52% para 10%, demonstrando assim, a alteração na preferência do consumidor brasileiro pelos diferentes tipos de alface (Azevedo Filho, 2017).

As diferenças entre os tipos varietais são extremamente importantes para o incremento do consumo nacional, além de ser uma forma de agregar valor aos diversos elos da produção. Tipos varietais como a “romana” e “mimosa” vem se destacando dentro das demandas de restaurantes e casas especializadas em comercialização de saladas. A existência da ampla variedade das alfaces consegue atender aos mais diversos consumidores, com diferentes exigências e diferentes níveis financeiros, levando o consumo deste vegetal a patamares cada vez mais altos (Henz & Suinaga, 2009; Silva, 2009; Sala & Costa, 2012).

### **1.3 - NUTRACÊUTICA DA ALFACE**

Basicamente, o consumo da alface se dá pela ingestão das folhas cruas nos diversos preparos em que ela pode ser utilizada. Na China e no Egito, além das folhas, são consumidos também o caule cru ou em conservas, desidratados ou servindo de composto para molhos

(Mou, 2008). Os benefícios do seu consumo são conhecidos desde o tempo da Grécia antiga. A alface possui baixo valor calórico, pois em maior parte (95%), seu conteúdo é composto por água. Além disso, a alface contém sais minerais e vitaminas essenciais ao bom funcionamento de processos fisiológicos humanos, como vitaminas do complexo B e vitaminas C, E, A e K (USDA Nutrient Database, 2010).

Assim como o alho e o tomate, registros indicam que inicialmente, a alface não era utilizada como alimentação, mas sim por conta de suas propriedades medicinais (Rubatzky & Yamaguchi, 1997). Além de todos os benefícios nutricionais, a alface oferece um composto conhecido como lactucina. Quimicamente, este composto pertencente ao grupo das lactonas sesquiterpênicas, as quais possuem propriedades sedativas e analgésicas similares ao ópio. A alface também possui propriedades laxativas, diuréticas e antialérgicas que são reconhecidas atualmente pela medicina e vem sendo usadas desde tempos remotos, a exemplo do uso do chá do talo da alface, muito consumido até hoje pelos Egípcios (Pamplona, 2015).

#### **1.4 – DOENÇAS DA ALFACE**

Como toda cultura, a alface é acometida por diversas doenças de origem biótica e abiótica. As doenças de origem abiótica são capazes de causar anormalidades que são expressas basicamente no crescimento das plantas, na pigmentação foliar e na capacidade dos tecidos manterem-se túrgidos. Injúrias causadas por frio intenso provocam alterações no limbo foliar e causam problemas no crescimento, deixando as plantas subdesenvolvidas. Além disso, o crescimento das plantas é também afetado por anomalias genéticas e pelo plantio em solos ácidos ou salinos para o cultivo desta hortaliça. Solos nessas condições alteram a disponibilidade de nutrientes essenciais ao bom desenvolvimento da alface (Blancard *et al.*, 2006). Outra doença abiótica comum é a “queima-marginal” nas extremidades das folhas, causada por um desequilíbrio entre as concentrações de Ca e N, pela falta de água e por temperaturas elevadas (Filgueira, 2013).

As doenças bióticas ocorrem pelo resultado da interação entre um ou mais patógenos (fungos, bactérias, vírus e nematoides), a planta hospedeira e condições ambientais favoráveis (Davis *et al.*, 1997). São conhecidas mais de 75 doenças em alface causadas por diversos patógenos em todo o mundo. Quando instalados, estes patógenos são capazes de causar doença tanto na parte aérea quanto na porção das raízes e caule (Davis *et al.*, 1997; Blancard *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2016).

#### **1.4.1 - Vírus como agente de doenças na alface**

Os vírus são importantes agentes de doenças em plantas. Uma lista divulgada em 2016 pelo “International Committee on Taxonomy of Viruses” (ICTV), relata a ocorrência de 4.404 espécies de vírus, além das espécies que foram propostas e ainda não estão incluídas no rol definitivo do ICTV. Deste total, aproximadamente 1.369 espécies são capazes de causar doenças em plantas (Rezende & Kitajima, 2018). Na cultura da alface, 26 espécies de vírus já foram relatadas em diversas regiões de cultivo no mundo, são eles: *Alfafa mosaic virus* – (AMV, *Alfamovirus*); *Arabis mosaic virus* (ArMV, *Nepovirus*); *Beet western yellows* (BWYV, *Luteovirus*); *Beet yellow stunt virus* (BYSV, *Closterovirus*); *Bidens mottle virus* (BiMoV, *Potyvirus*); *Bidens mosaic virus* (BiMV, *Potyvirus*); *Broad bean wilt virus* (BBWV, *Fabavirus*); *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*); *Dandelion yellow mosaic virus* (DYMV, *Sequivirus*); *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV, *Varicosavirus*); *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV, *Ophiovirus*); *Lettuce chlorosis virus* (LCV, *Closterovirus*); *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV, *Closterovirus*); *Lettuce mosaic virus* (LMV, *Potyvirus*); *Lettuce mottle virus* (LeMov, possivelmente um *Sequivirus*); *Lettuce necrotic yellow virus* (LNYV, *Cytohabdovirus*); *Lettuce speckles mottle* (LSMV, *Umbravirus*); *Sonchus yellow net virus* (SKVV, *Nucleorhabdovirus*). *Tobacco rattle virus* (TRV, *Tobravirus*); *Tobacco ringspot virus* (TRSV, *Nepovirus*); *Tobacco streak virus* (TSV, *Iilarvirus*); *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, *Orthotospovirus*); *Tomato chlorotic spot virus*

(TCSV, *Tospovirus*) e *Turnip mosaic virus* (TuMV, *Potyvirus*) (Pavan *et al.*, 2008; Colariccio *et al.*, 2017). As doenças de origem viral possuem destaque na agricultura pela ausência de medidas curativas para o controle, pelas suas complexidades e por estarem associadas frequentemente com perdas significativas na produção (Lima *et al.*, 2016).

O LMV é uma das duas viroses mais importantes para a cultura da alface no Brasil (Dinant & Lot, 1992; Krause-Sakate *et al.*, 2002). Este vírus pode ser transmitido pela semente (Jadão *et al.*, 2002) e tem sua disseminação no campo feita através de insetos afídeos. Possivelmente, sua ocorrência em todo o mundo está associada ao intercâmbio de sementes entre países produtores de alface na busca por novos materiais. Fáceis de serem reconhecidos, os sintomas desta doença em alface adulta consistem em: mosaico, amarelecimento foliar, clareamento de nervura, má formação e distorção da cabeça e necrose de nervuras e folhas (Stangarlin *et al.*, 2000; Krause-Sakate *et al.*, 2016).

Outra virose importante da alface no Brasil, causada predominantemente por *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e transmitida por tripes é o “vira-cabeça”. Este termo abrange diversas doenças que induzem sintomas que são parecidos, no entanto, são causados por um complexo de espécies (Lima *et al.*, 2016). O primeiro relato mundial desta doença se deu em 1919 na Austrália afetando tomateiros (Brittlebank, 1919) e posteriormente houve um relato em 1937 de plantas de fumo com a doença (Silberschmidt, 1937). Ela ocorre em todas as regiões produtoras do Brasil podendo se tornar um fator limitante à produção. Na alface, a doença foi detectada em 1930 e em 1970 (Costa & Foster, 1938; Chagas, 1970) e foi somente na década de 80 que foi registrado o primeiro surto epidêmico da doença em plantios de alface localizados no município de Vitória de Santo Antão no estado de Pernambuco, causando perdas estimadas entre 30% e 100% (Moraes *et al.*, 1988). Desde então, o “vira-cabeça” está amplamente alastrado na maior parte das regiões produtoras de alface no Brasil. Durante muito tempo, o agente causal desta doença pertenceu ao gênero *Tospovirus*, que

recentemente foi reclassificado como *Orthotospovirus* (Junglen, 2016; ICTV, 2018). Os sintomas que este patógeno causa consistem em numerosas manchas cloróticas e/ou necróticas, de coloração marrom e em muitos dos casos, um nítido bronzeamento. Os sintomas podem se manifestar também com deformações assimétricas ou irregulares em apenas um conjunto de folhas da roseta. Com a evolução da doença, ocorre o coalescimento das lesões, resultando numa necrose acentuada (Krause-Sakate *et al.*, 2016; Lima, 2016).

Uma vez que não se tem conhecimento da existência de métodos curativos para plantas infectadas com vírus, é imprescindível empregar múltiplos métodos de controle. As estratégias neste ponto, visam evitar infecções ou reduzir as fontes de inóculo da doença. Neste sentido, escolha de sementes de qualidade, plantas resistentes, controle de hospedeiras alternativas, eliminação de restos de cultura, evitar plantio escalonado, eliminar plantas sintomáticas dos canteiros, produzir mudas em telado com o monitoramento de tripes e afídeos, com controle químico destes insetos quando possível, são alguns dos principais métodos de controle recomendados de maneira geral para as viroses em alface (Krause-Sakate *et al.*, 2016; Lima, 2016).

#### **1.4.2 - Bactérias como agentes de doenças na alface**

De todas as espécies de bactérias já relatadas no mundo responsáveis por causarem doenças em alface, somente as seguintes foram relatadas no Brasil: *Burkholdeira cepacia*, *Dickeya* sp., *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cichorii*, *P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. viridiflava*, *Rhizobium radiobacter*, *Serratia marcescens* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians*. Destas, as mais importantes para a cultura da alface no Brasil, são: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians*, *P. cichorii* e aquelas que causam podridões mole, pertencentes aos gêneros *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Enterobacter* e *Serratia* (Beriam & Almeida, 2017).



*Pseudomonas cichorii* causa a doença conhecida como “crestamento bacteriano”. Essa doença foi descrita pela primeira vez em 1935 na Alemanha (Stapp, 1935; Grogan *et al.*, 1977) e no Brasil em 1954 no estado do Rio Grande do Sul (Freire, 1954). No Brasil, estima-se que essa bactéria possui em torno de 45 espécies botânicas como hospedeiras. Os principais sintomas são manchas irregulares que partem da parte interna do limbo foliar, de conformação aproximadamente triangular e que avançam no sentido dos bordos da folha. Com o tempo, as lesões coalescem e o tecido fica necrosado podendo ter agravamento da lesão por bactérias oportunistas que causam também podridão mole. É comum a associação de *P. cichorii* com *X. axonopodis* pv. *vitians* em infecções mistas de crestamento bacteriano. Além dos sintomas supracitados, pode ocorrer também o “colo preto”, que é caracterizado pelo escurecimento do colo da planta, podendo ter de 1 a 2 cm de extensão e geralmente é localizado entre a inserção da folha e o caule. Nestes casos, pode ocorrer ainda a redução do sistema radicular da planta (Freire, 1954; Beriam & Almeida, 2017).

A podridão mole é uma doença muito comum em plantios de alface. Inicialmente, essas bactérias colonizam os espaços intercelulares do parênquima e posteriormente, após atingirem elevado nível populacional, começam a produzir enzimas usadas para colonizar o hospedeiro. Celulases, hemicelulases, ligninases e pectinases ou enzimas pectinolíticas estão entre estas enzimas. Estas últimas, são capazes de degradar a parede celular e lamela média das células vegetais, macerando tecidos e contribuindo desta forma para o extravasamento do conteúdo celular vegetal, resultando em alterações na morfologia da folha dando a ela um aspecto mole (Amorim & Pascholati, 2018). Com a evolução da doença, as plantas murcham e a parte interna do caule torna-se totalmente macerada, por este motivo a doença é também conhecida como “talo oco”. Esse tipo de podridão pode ser diferenciado de outras, causadas por fungos, pela ausência de micélio e/ou escleródios, além do fétido cheiro que exala quando os tecidos afetados são contaminados também, por outras bactérias (Beriam & Almeida,

2017).

Em 1962, foi descrita no estado do Rio de Janeiro a mancha foliar bacteriana, causada por *X. axonopodis* pv. *vitians*. Hoje, ela encontra-se distribuída nos campos de produção de alface em todo o Brasil (Robbs, 1962). Os sintomas são caracterizados por lesões negras ou marrons escuras, aquosas, no limbo foliar e que coalescem com o tempo (Carisse *et al.*, 2000; Beriam & Almeida, 2017). O controle para esta bacteriose basicamente se dá por uso adequado de irrigação, eliminação de restos de cultura, escolha da área, eliminação de hospedeiras alternativas e pelo uso de sementes de qualidade, uma vez que esta bactéria é capaz de ser disseminada por sementes (Davis *et al.*, 1997).

#### **1.4.3 - Nematoides como agentes de doenças na alface**

Existem relatos que mostram a associação da alface com espécies dos gêneros: *Aorolaimus*, *Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Mesocriconema*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Trichodorus*, *Xiphinema* e *Meloidogyne*. Apesar de poucas espécies terem patogenicidade comprovada, os nematoides das galhas inclusos no gênero *Meloidogyne* são os que causam maior prejuízo para a cultura da alface. (Oliveira *et al.*, 2017). As espécies de *Meloidogyne* constituem o gênero de fitonematoides mais agressivo e prejudicial para a agricultura. Polípagos, são capazes de atacar hortaliças, fruteiras, soja, algodão, café, feijão dentre outras culturas de interesse agrícola. Estima-se a ocorrência de mais de 100 espécies dentro deste gênero (Hunt & Hadoo, 2009). Estes nematoides causam diversos tipos de sintomas, sejam os diretos que são observados nos próprios órgãos parasitados das plantas (galhas nas raízes) ou os reflexos, que são verificados nas porções aéreas das plantas (Ferraz, 2018).

Os sintomas de galhas nas raízes de alface, acontecem normalmente em reboleiras e são resultantes de hiperplasia e hipertrofia das células do cilindro vascular e parênquima cortical. Essas galhas são formadas pelas próprias plantas em resposta à reação com toxinas

produzidas por estes vermes. Por conta deste parasitismo, as raízes podem ter seu volume reduzido e sua anatomia alterada, desfavorecendo o processo de absorção de nutrientes e favorecendo a infecção por outros patógenos de solo. As alterações que ocorrem nas raízes podem ter seu reflexo em tamanho desigual das folhas por privação de nutrientes essenciais ao desenvolvimento deste órgão, além de causarem também em alguns casos o sintoma de murcha, prejudicando dessa forma a produção de alface como um todo (Ferraz, 2018).

O controle desta doença deve ser feito de forma integrada visando maximizar a ação dos agentes de controle. Alguns métodos que podem ser considerados em casos de infestação são a utilização de mudas sadias com substratos livre de fitonematoides, a rotação de culturas com plantas não hospedeiras e quando possível, o uso de cultivares resistentes. Controle químico não é recomendado por não haver produtos registrados para a cultura da alface, considerando-se a toxicidade e o período residual (AGROFIT, 2019), que desta forma, impedem seu emprego em alface, por esta cultura ter um ciclo relativamente curto (Moraes *et al.*, 2006; Oliveira, 2017).

#### **1.4.4 - Fungos como agentes de doenças na alface**

Na cultura da alface, são relatadas 15 doenças fúngicas que têm importância mundial (Davis, 1997). No Brasil as doenças fúngicas mais importantes para a cultura da alface são: Míldio – *Bremia lactucae* Regel; Septoriose – *Septoria lactucae* Pass; Cercosporiose – *Cercospora lactucae-sativae* Sawada; Oídio – *Golovinomyces cichoracearum* (D.C) V.P Heluta; Mofo cinzento – *Botrytis cinerea* Pres.: FR.; Mofo Branco – *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib). De Bary, *Sclerotinia minor* Jeger; Fusariose – *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*; Podridão da saia – *Rhizoctonia solani* Kühn e *Pythium* spp. (Töfoli & Domingues, 2017), sendo estas duas últimas, objetos de estudo desta pesquisa.

## 1.5 - RIZOCTONIOSE OU PODRIDÃO DA SAIA

### 1.5.1 - Histórico, aspectos epidemiológicos e sintomatológicos da doença

Na literatura internacional, a rizoctoniose da alface é conhecida por “*lettuce bottom rot*” e no Brasil por queima da saia. No entanto, levando-se em consideração o termo original em inglês e considerando-se o fato de outros patógenos estarem relacionados com o sintoma de queima foliar, propõe-se neste trabalho o termo “podridão da saia” em substituição ao termo “queima da saia”.

O agente causal da podridão da saia da alface foi descrito inicialmente como *Rhizoctonia solani* e sua primeira observação causando podridão da saia em alface foi descrita em 1900 ao ser detectada em casas de vegetação no estado de Massachusetts – EUA (Stone *et al.*, 1900). Cinco anos mais tarde, no estado da Flórida – EUA este patógeno teve seu primeiro relato em campos de produção (Davis, *et al.*, 1997).

A podridão da saia pode ser encontrada em todos os tipos e estádios fenológicos da alface. Em condições favoráveis, estima-se que nos EUA esta doença pode causar perdas de até 70% na produção. Sob condições altamente favoráveis, as alfaces afetadas não podem ser comercializadas e mesmo quando a doença no campo não tem sua severidade tão alta, ela causa prejuízos indiretos, pois se faz necessário a remoção das folhas afetadas o que leva a uma redução do peso, tamanho e forma da planta, exercendo dessa forma uma forte influência negativa na sua comercialização (Raid, 1997).

Estudos posteriores à primeira ocorrência desta doença no mundo, demonstraram a participação de várias espécies de fungos associados à doença da alface. Apesar da predominância de *R. solani* em isolamentos de plantas com sintomas de podridão da saia, à época, já se detectava a presença de *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia* spp. e frequentemente *Pythium* spp. como componentes de um complexo etiológico causando esta doença (Townsend, 1934, Blok & Plaats-Niterink, 1978). Atualmente, esta questão do complexo

etiológico ainda é discutida. Pesquisas realizadas na Bélgica demonstraram a ocorrência de *Sclerotinia* spp., *B. cinerea* e *Pythium* spp. como espécies envolvidas na podridão da saia em estufas de alface. Além de *R. solani*, tido como o principal agente etiológico da rizoctoniose (Van Beneden *et al.*, 2009; Claerbout *et al.*, 2019).

Após penetrar no tecido da hospedeira, o fungo *R. solani* coloniza os tecidos sob temperatura ideal entre 25-28°C, e dentro das 36 a 48 horas, aparecem as primeiras lesões que geralmente acometem as folhas mais baixas, que formam a saia da alface, exatamente por estarem em contato ou próximas do solo. Inicialmente os sintomas aparecem como pequenas manchas variando de cor de ferrugem a cor marrom chocolate, principalmente na parte interior da nervura principal, no meio da folha (Figura 1.A). Posteriormente, o patógeno afeta todo o limbo foliar, colapsando os vasos pelos quais circulam os nutrientes e a água, promovendo alteração para um limbo foliar necrosado, com aspecto de queimado (Figura 1.B). Além de prejudicar a planta de alface diretamente, a podridão da saia favorece a instalação de microrganismos saprófitas e bactérias fitopatogênicas, como as do gênero *Pectobacterium*, que provocam podridões-mole e promovem o surgimento de sintomas como o talo-oco (Raid, 1997).





**Figura 1:** Sintomas da podridão de saia. A) Sintoma na nervura principal da folha de coloração marrom chocolate. B) Folhas da saia em estado necrótico sendo atingidas pela doença. Fotos: Luiz Lopes.

### ***1.5.2 - O gênero Rhizoctonia***

O gênero *Rhizoctonia* pertence ao Domínio Eukarya, Reino Fungi, Sub-reino Dikarya, Filo Basidiomycota, Sub-Filo Agaricomycotina, Classe Agaricomycetes, Ordem Ceratobasidiaceae, Família Cantharalles e Gênero *Rhizoctonia* (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018).

A primeira descrição deste gênero foi realizada por De Candolle no ano de 1815.

Neste trabalho, estudando fungos até então desconhecidos, atacando alfafa (*Medicago sativa* L.) e açafrão-verdadeiro (*Crocus sativus* L.), ele relatou a ocorrência de duas espécies dentro deste gênero: *R. medicaginis* afetando alfafa e *R. crocorum* afetando açafrão-verdadeiro sendo esta espécie de *Rhizoctonia* determinada como espécie tipo. Desde sua descrição, mais de 120 espécies já foram relatadas dentro do gênero *Rhizoctonia* atacando plantas ao redor do mundo. Atualmente existem 148 registros com o nome *Rhizoctonia* no banco de dados da plataforma *Index Fungorum*. A espécie importante deste gênero é *R. solani*, que foi descrita em 1858 em associação com túberculos de batata por Kühn (Sneh *et al.*, 1991). Esta espécie é capaz de causar doenças em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo aproximadamente 500 gêneros botânicos (McNabb & Talbot, 1973) promovendo diversos sintomas em diferentes órgãos, como por exemplo: podridões em sementes, raízes, hipocótilos, no limbo foliar e “*dumping-off*” na pré e pós emergência (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018).

No Brasil, a espécie *R. solani* já foi relatada como agente causal de doenças em diversas culturas além da alface, como: cafeeiro (Sussel *et al.*, 2001); fumo (Ceresini *et al.*, 2002); soja (Yorinori, 1998; Meyer & Yorinori, 1999); pimentão (Almeida *et al.*, 1980; Bolkan & Ribeiro, 1985); amendoim (Campaci & Figueiredo, 1964; Ceresini *et al.*, 1996; Kuramae *et al.*, 2002); feijão (Ceresini & Souza, 1997; Godoy-Lutz *et al.*, 2003; Kuramae *et al.*, 2002); batata (Ceresini *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2005); yacon (Grau & Rea, 1997; Fenille *et al.*, 2005); crotalária (Paula Júnior *et al.*, 2011); brócolis, espinafre e tomate (Kuramae *et al.*, 2003); seringueira (Gasparato *et al.*, 1981; Tanaka & Coqueiro, 1981); eucalipto (Silveira *et al.*, 2000) e teca (Poltronieri *et al.*, 2008).

Os fungos do gênero *Rhizoctonia* não são necessariamente causadores de enfermidades em plantas. Curiosamente, além de ocuparem nichos ecológicos de decompositores vivendo em atividade saprofítica na matéria orgânica do solo, eles também atuam como simbiontes em orquídeas e musgos promovendo um bom desenvolvimento a

estes tipos de vegetais. (Warcup & Talbot, 1966; Currah *et al.*, 1987; Gónzales *et al.*, 2016).

Morfologicamente, este gênero apresenta: células que podem ser binucleadas ou multinucleadas (sendo este aspecto importante para separar *R. solani* que é multinucleada das demais espécies de *Rhizoctonia* spp. que são binucleadas); hifas hialinas que, ao amadurecer do micélio, torna-se pigmentadas com coloração próxima do marrom; apresentam próximo ao septo distal em hifas jovens, ramificações em ângulo reto. Além disso, apresentam também um septo na ramificação da hifa nas proximidades do ponto de origem, sendo estas ramificações constrictas em sua região basal; os septos são do tipo doliporo os quais impedem movimento de organelas célula-a-célula e as hifas não apresentam grampos de conexão além de não apresentarem diferenciação para formação de células conidiogênicas, tendo, portanto, um micélio estéril. Alguns grupos de *Rhizoctonia* produzem, não necessariamente, escleródios que são aproximadamente uniformes e de coloração marrom-escuro (melanizados) e que são capazes de sobreviverem por muitos anos no solo (Takashi & Tadao, 1978). Estes fungos não apresentam rizomorfos e obrigatoriamente, suas fases teleomórficas quando presentes, pertencem ao filo Basidiomycota (Mordue, 1974; Parmeter & Whitney, 1970; Sneh *et al.*, 1974).

Os fungos anamórficos classificados no gênero *Rhizoctonia* têm seu relativo teleomórfico abrigado em diferentes famílias e ordens. A maioria dos representantes do gênero *Rhizoctonia* são formas assexuadas de quatro gêneros de Basidiomicetos, são eles: *Thanatephorus* Donk., *Waitea* Warcup & Talbot *Ceratobasidium* Rogers e o gênero *Tulasnella* Schröter. Sendo aqueles dois primeiros gêneros teleomórficos, correspondentes respectivos das espécies: *R. solani* - espécie multinucleada, *R. zae* e *R. oryzae* – espécies multinucleadas. Espécies como *R. repens* e *R. oryzae-sativae* são binucleadas e associam-se com várias espécies de *Ceratobasidium* ou ainda a espécies de *Tulasnella* (Ogoshi, 1987; Sneh *et al.*, 1991; Carling & Summer, 1992; Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018).



Estudos pioneiros na década de 30 basearam-se na grande variação do aspecto morfológico da colônia, agressividade, gama de hospedeiros, exigências nutricionais e na anastomose de hifas para classificar as espécies de *Rhizoctonia* em grupos (Matsumoto *et al.*, 1932). Ao longo dos anos, estes estudos têm sido modificados por diversos autores que favoreceram a atual compreensão do conceito vigente dos grupos de anastomose (AGs) (Richter & Schneider, 1953; Parmeter *et al.*, 1969; Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018).

A utilização do conceito de AGs foi importante não somente como um critério válido para melhor classificar a diversidade infra-genética e infra-específica em *Rhizoctonia*, mas também para revelar que *R. solani* é um complexo de espécies que não tem compatibilidade entre grupos distintos, o que indica que são de populações isoladas reprodutivamente (Anderson *et al.*, 1972; Anderson, 1984).

O sistema de classificação por AGs consiste em juntar ou separar isolados geneticamente semelhantes com base no contato entre suas hifas. Quando ocorre facilmente a anastomose de hifas com troca citoplasmática e de núcleos, tais isolados são agrupados no mesmo AG. Ao passo que, isolados que não conseguem contato e fusão de hifas com troca de núcleos e citoplasma, são considerados membros de distintos AGs (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018). O uso do conceito de AGs tem sido essencial para estudos com o objetivo de caracterizar isolados de *R. solani*, *R. repens*, *R. zaeae* e *R. oryzae* e espécies binucleadas utilizando isolados de *Ceratobasidium* como teleomorfo (Yang & Li, 2012).

Atualmente 14 grupos de anastomose em *R. solani* são conhecidos, assim denominados como: AG-1, AG-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-7, AG-8, AG-9, AG-10, AG -11, AG-12, AG-13 e AG-BI (Agarwal, 2010; Yang & Li, 2012; de Melo *et al.*, 2017; Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018). É importante ressaltar que alguns pesquisadores entendem o AG-BI como sendo uma porção do AG-2 (Carling, 1996; Carling *et al.*, 2002). No ano de 2010 foi proposto um novo grupo de anastomose (provável AG-14) ocorrendo em citrus na

região norte do Brasil no estado do Acre. Sendo estes isolados distintos de todos os outros que até então foram relatados no mundo (Gaino *et al.*, 2010). Além dos AGs, os isolados de *R. solani* podem ser diferenciados em grupos intraespecíficos (ISGs). Atualmente, considerando-se evidências de anastomose, patogenicidade, morfologia, requerimento de vitaminas, taxa de crescimento micelial, temperatura ótima de crescimento, tipos de escleródios produzidos e gama de hospedeiros dos isolados, têm-se o total de 23 ISGs. Estudos que consideram estes 23 ISGs também baseiam-se em análises sorológicas, de ácidos graxos, de eletroforese de proteínas e na sequência de determinados segmentos de DNA (Carling, 2000; Nakatani, 2006).

Os 23 ISGs de *R. solani* são distribuídos em diversos AGs, a saber: IA, IB, IC, ID no AG-1; 2-1I, 2-1II, 21III, 2-2IIIB, 2-2IV, 2-2LP, 2-3 e 2-t no AG-2; HGI, HGII E HGIII no AG-4; HGI e GV no AG-6; ZG1-1, ZG1-2, ZG1-3, ZG1-4 e ZG1-5 no AG-8; TP e TX no AG-9 (Carling, 2000; Kuninaga & Carling, 2000; MacNish & O'Brien, 2000; Yang & Li, 2012).

O grupo AG-1 é cosmopolita e tem hospedeiras gramíneas e leguminosas. O grupo AG1-IA (conhecido como “sasaki”) por exemplo, é um patógeno de parte aérea que em arroz causa a seca da bainha (Carling & Summer, 1992; Jones & Belmar, 1989), em gramados causa bronzeamento (Martin & Lucas, 1984) e no milho, sorgo e soja causam queima das folhas (Yang *et al.*, 1988). O AG1-IB conhecido também como microesclerocial é um grupo de patógenos de parte aérea. O AG1-IC possui isolados que são patógenos de solo e causam tombamentos em diversas hospedeiras como a soja e a cenoura. O AG1-ID causa queima das folhas também e tem como exemplo de hospedeira o cafeeiro. (Yang & Li, 2012).

Recentemente, um grupo de pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, situada no estado do Acre, descreveu uma nova doença na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) a nível mundial. Os estudos se deram no maior polo

de produção desta cultura no estado, situado no município de Mâncio Lima. Testes de patogenicidade, moleculares e filogenéticos, utilizando a região do espaço interno transcrito (ITS) do DNA ribossomal, constataram a presença de *Rhizoctonia solani* pertencente ao grupo AG1-IA. Os sintomas da doença intitulada “queima-do-fio da mandioca” consistem em queima das folhas da parte superior da planta e sinal do patógeno pela presença de intenso crescimento micelial na parte aérea (Siviero *et al.*, 2019).

O AG-2 possui 8 sub-grupos. O primeiro, AG-2-1 é conhecido em culturas de inverno. É importante como patógeno de solo e é capaz de causar tombamento em crucíferas (Watanabe & Matsuda, 1966), podridão de raiz em rabanete (Homma & Ishii, 1984) e queima foliar de tulipas (Nakatomi & Kaneko, 1971). O AG2-1I é composto por isolados de origem japonesa e holandesa de culturas de inverno, já o AG2-1II possui isolados oriundos do Alaska e Austrália e o AG2-2-1III composto por isolados provenientes da Itália (Kuninaga & Carling, 2000). O grupo AG-2-2IIIB (“rush type”) possui isolados capazes de atacar tanto órgãos em contato como o solo como a parte aérea das hospedeiras, causam também tombamentos na pré e pós-emergência em culturas como a beterraba (Watanabe & Matsuda, 1966), crisântemo (Kajiwara & Sugata, 1971). Em gramados, causam bronzeamento (Hurd & Grisham, 1983) e na cultura do arroz, causam a falsa seca da bainha (Watanabe & Matsuda, 1966). O grupo AG-2-2IV conhecido também como “*root rot type*” ataca tanto os órgãos subterrâneos como a parte aérea causando queima e podridões de raízes em beterraba e em inúmeras outras culturas causando também seca em gramados (Carling & Summer, 1992). O grupo AG-2-2LP causa a doença conhecida como “*large patch*” em gramados (Hyakumachi *et al.*, 1998). Já o grupo AG-2-3 possui isolados que foram constatados no Japão como causadores de queima foliar em soja (Naito *et al.*, 1995).

O grupo AG-3, denominado como “*potato type*” é um grupo mais delimitado e sem muita diversificação não possuindo sub-grupos conhecidos (Watanabe & Matsuda, 1966).

Causa podridões em raízes e colo na cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.), lesão foliares em tomate, berinjela e fumo. Este grupo abriga isolados mais tolerantes à temperaturas amenas em comparação a isolados pertencentes a outros AGs (Date *et al.*, 1984; Meyer *et al.*, 1990; Kodama *et al.*, 1982, Yang & Li, 2012).

O AG-4 denominado “*praticola type*” possui três grupos que são diferenciados geneticamente, mas não é possível diferenciá-los em reações de anastomose. São isolados que atacam uma ampla gama de hospedeiras e causam danos tanto em órgãos em contato com o solo quanto em porções aéreas das plantas. Algumas culturas afetadas são: batata, ervilha, soja, amendoim, limão, espinafre, tomate, alfafa, canola e fumo (Elango, 1986; Shehata *et al.*, 1983, Muyolo *et al.*, 1993; Ceresini *et al.*, 1996; Yang & Li, 2012).

O grupo AG-5 é também pouco diversificado e causa podridão em raízes e colo e tombamentos em batata, mas é quase sempre menos agressivo que os isolados pertencentes ao AG-3 (“potato type”). Ocorre majoritariamente na Europa, Ásia e América do Norte (Carling & Summer, 1992; Eken & Dermici; 2004; Naito, 2004).

Existem isolados de *R. solani* que não são patogênicos e ocorrem no Japão. Estes pertencem ao grupo AG-6 e formam micorrizas associadas à orquídeas e musgos (Naito, 2004). Além do AG-6, ocorre no Japão o grupo AG-7. Os isolados deste grupo são patógenos de solo que causam danos não expressivos em algumas culturas (Homma *et al.*, 1983).

O AG-8 possui isolados que são de solo e causam a doença “*bare patch*” em cereais (Neate & Warcup, 1985) e podridão de raiz em batata (Carling & Leiner, 1990). Foi relatado na Austrália, EUA e Reino Unido (Ogoshi *et al.*, 1990; Burton *et al.*, 1988; Naito, 2004).

Nos estados de Alaska e Oregon, EUA ocorre o grupo AG-9. Este grupo abriga isolados que são considerados pouco agressivos que podem atacar batata, couve-flor e linho e que com base em análises de DNA são subdivididos em TP e TX (Carling & Kuninaga, 1900; Naito 2004).

O grupo AG-10 é pouco relatado. Ocorre como saprófita no Nordeste do Pacífico, associados a cereais de grãos pequenos (Sneh *et al.*, 1998).

AG11 é um grupo relatado no oeste da Austrália e nos EUA no estado de Arkansas causando “*damping-off*” em plantas de *Lupinus angustifolius* e soja (Kumar *et al.*, 2002).

Assim como o AG-6, o AG-12 é encontrado como isolados simbióticos formando micorrizas em orquídeas na Austrália (Kumar *et al.*, 2002).

O grupo AG-13 causa podridão de colo e raiz em plantas de algodão, podendo atacar couve-flor, rabanete, alface e milho (Carling *et al.*, 1990; Carling *et al.*, 2002; Tomaso-Peterson & Trevathan, 2004; Kumar *et al.*, 2002).

O grupo AG-BI é conhecido também como “*bridging isolate*” e ocorre no Japão. Os isolados deste grupo podem anastomosar com isolados pertencentes a outros AGs, como: AG-2, AG-3, AG-6, AG-8 e AG-11 (Yang & Li, 2012).

O detalhamento na caracterização destes fungos utilizando o conceito de AGs e de IGSs representa um grande avanço na descrição de variabilidade genética existente dentro dos gêneros *Thanatephorus*, *Ceratobasidium* e *Waitea*. Os diferentes ISGs podem refletir importantes variações na patogenicidade, cruzamento e dispersão destes fungos (Vilgalys & Cubeta, 1994) que trazem importantes informações para a pesquisa que envolve resistência genética de plantas e/ou aspectos epidemiológicos e ecológicos, proporcionando assim, um controle mais bem direcionado (Ogoshi, 1987). Na prática em campo, a caracterização dos AGs incidentes em uma determinada área de plantio pode ajudar por exemplo na decisão de qual cultura instalar na próxima rotação com objetivo de controlar o patógeno em campo pela redução de inóculo. Ainda que a maioria dos AGs sejam polífagos, existem casos em que este manejo leva a resultados positivos (Nakatani, 2006).

Como nada é exato biologicamente, a análise de reação de anastomose pode se mostrar inconclusiva para a elucidação da posição taxonômica em determinados casos. Nesse sentido,

dois relatos mostram incompatibilidades entre AGs e características morfológicas, fisiológicas e de patogenicidade em plantas de fumo (Nicoletti *et al.*, 1999) e soja (Naito & Kanematsu, 1994). Isto demonstra as limitações do uso do conceito de AGs e ISGs como critério único para caracterizar e identificar fungos do gênero *Rhizoctonia*. Desta forma, diversos fatores ambientais que podem levar a uma alta variação fenotípica são tidos como uma das principais dificuldades que os micologistas possuem para utilizar o critério taxonômico convencional, até o momento estabelecido (Carling, 1996; Nakatani, 2006).

### ***1.5.3 - O uso da biologia molecular na taxonomia do gênero Rhizoctonia***

O uso do método de classificação em AGs e ISGs pode ser importante para a taxonomia de *Rhizoctonia*. No entanto, não é considerado atualmente o único método para classificação devido à frequente variação na fusão de hifas levando a erros de interpretação dos resultados e conseqüentemente na identificação. Estas falhas podem estar associadas a condições ambientais, nutricionais ou mesmo ao próprio envelhecimento dos isolados em coleções micológicas. Ademais, este método não consegue informar sobre os aspectos de variantes genéticas ou a relação entre e dentro de cada um dos AGs (Sneh *et al.*, 1991; Parmeter *et al.*, 1969; Hyakumachi & Ui, 1987; Carling, 1996). Estas limitações foram superadas através do desenvolvimento e uso de técnicas de biologia molecular.

Desde a década de 80 são realizados estudos de populações baseadas em métodos moleculares (Brasier, 1987) como: técnicas de hibridização DNA/DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) da região interna transcrita (ITS) do gene do RNA ribossomal, com posterior sequenciamento, gel de eletroforese em campo pulsado e polimorfismo do comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP) (Vilgalys, 1994; Liu *et al.*, 1993; Boysen *et al.*, 1996; Kuninaga *et al.*, 1997; Keijer *et al.*, 1996; Ceresine *et al.*, 2002; Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018).

Tais técnicas foram importantes para estudar a similaridade genética entre os AGs de

*R. solani* utilizando sequências das unidades transcritas 18S, 28S e 5,8S e ITS do DNA ribossomal, sendo utilizada posteriormente para inferências taxonômicas e filogenéticas de *Rhizoctonia* spp. (Gonzales *et al.*, 2016; Carling *et al.*, 2002; Fenille *et al.*, 2005).

Vilgalys & Gonzáles (1990) fizeram análises filogenéticas utilizando a sequência parcial do 28S rDNA de 10 AGs distintos de *R. solani* e conseguiram observar pequenas variações entre eles. Boysen e colaboradores (1996), baseados também em análises filogenéticas da região ITS1-5.8S-ITS2 e com o uso de técnica de sequenciamento de PCR assimétrico, obtiveram 3 diferentes subgrupos dentro do AG-4, e que correlacionaram com dados de origem e virulência dos isolados. Kuninaga *et al.* (1997) explicitaram a importância dos estudos de sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 como ferramenta para identificar subgrupos dentro da espécie *R. solani*.

Atualmente, o uso da região ITS ainda se mostra eficaz para o estudo filogenético dentro do gênero *Rhizoctonia*. Jaafar *et al.* (2015), utilizando sequências de ITS rDNA, conseguiram mapear a distribuição geográfica dos grupos de anastomose envolvidos em plantios de canola (*Brassica napus* L.) no estado de Washington, EUA. González *et al.* (2016), utilizando sequências de diferentes regiões, incluindo ITS rDNA, conseguiram separar diversos isolados de *Rhizoctonia solani* em clados congruentes aos grupos conhecidos de anastomose. Melo *et al.* (2016) relataram pela primeira vez no Brasil, a ocorrência de isolados de *R. solani* pertencentes ao AG-1IB e AG-4-HGI causando queima foliar e podridão de raízes em plantas da família Lamiaceae utilizando caracterização morfológica com pareamento de hifas em grupos de anastomose e análise molecular envolvendo primers pertencentes ao ITS rDNA. Inokuti *et al.* (2018) estudaram a patogenicidade e diversidade de espécies de *Rhizoctonia* e grupos de anastomoses associados à plantas de batata em campos de produção no Brasil. Neste estudo, os 35 isolados analisados filogeneticamente através de sequências de ITS rDNA, agruparam em distintos clados referentes aos AGs: AG-3, AG-4-

HGI, AG-R, AG-2-1, AG-A e AG-1-IB. Basseto *et al.* (2019), com o uso de filogenia envolvendo a região ITS rDNA detectaram a ocorrência do grupo AG 2-2-HB em seringueira (*Hevea brasiliensis*) na região amazônica do Brasil.

Apesar do uso da região ITS nas análises filogenéticas ser importante para a caracterização de espécies de *Rhizoctonia*, existem estudos que demonstram o uso de outros genes como ferramenta para dar maior resolução às análises genômicas dos fungos incluindo *Rhizoctonia*. Por exemplo, Thon & Royse (1999) pesquisaram sobre a importância da sequência parcial de Beta-tubulina entre basidiomicetes. Kretzer & Bruns (1999) demonstraram que a região ATP6 (subunidade mitocondrial ATPase) é bastante eficaz para inferências filogenéticas de Boletales, pertencentes ao filo Basidiomycota. A segunda subunidade maior da polimerase II de RNA – RPB2 e o gene do fator de alongação EF-1alfa também têm sido utilizados como alternativas para melhor elucidar as relações filogenéticas entre espécies de *Rhizoctonia*. Mesa (2015), utilizando análises filogenéticas com as regiões ITS, RPB2 e EF-1alfa, identificou pela primeira vez *R. solani* AG-1-IF associado a mela da soja e do feijão caupi e *R. solani* AG-1-ID associados ao feijão-caupi no estado de Roraima-Brasil.

Além das regiões genômicas supracitadas, existem trabalhos que utilizam primers específicos baseados na região ITS para detectar a presença de determinados grupos de anastomose em patossistemas envolvendo espécies de *Rhizoctonia*. Sandoval *et al.* (2019), por exemplo, relataram a ocorrência de espécies multinucleadas de *Rhizoctonia* pertencentes ao grupo AG1-IA associadas à queima da bainha do arroz nas Filipinas utilizando primers específicos para o subgrupo AG1-IA baseados na região ITS rDNA.

#### ***1.5.4 - O gênero Pythium no complexo de espécies da podridão de saia em alface***

O gênero *Pythium* Pringsheim foi relatado pela primeira vez em 1858 e é classificado atualmente como pertencente ao Reino Chromista; Filo Oomycota; Classe Oomycetes; Ordem



Pythiales e Família Pythiaceae (Pringsheim, 1858; Kirk *et al.*, 2008).

Estes oomicetos encontram-se nos mais variados ecossistemas, tanto terrestres, como aquáticos, seja em fonte continental ou marinha. Além de serem importantes para a patologia de plantas como agentes etiológicos de diversas doenças, estes microrganismos são responsáveis por atuarem na reciclagem de nutrientes, sendo capazes de degradar compostos quitinosos, celulósicos e queratinosos com proximidade ao nicho ecológico de decompositores dos fungos verdadeiros (Jesus *et al.*, 2013; Sousa & Rocha, 2017). Além disso, podem atuar como parasitas de outros oomicetos e fungos tanto em ambiente aquático ou no solo, crustáceos, peixes, macrófitas, nematoides, algas e artrópodes. Podendo servir também como fonte de alimentos às espécies de zooplâncton (Voronin 2008; Kestrup *et al.*, 2011; Kageyama, 2014; Rocha *et al.*, 2017).

O gênero *Pythium* possui aproximadamente 196 espécies conhecidas (Kageyama, 2014) e atualmente existem 327 registros na plataforma *Index Fungorum* com o nome do gênero *Pythium*. Muitas dessas espécies são conhecidas na fitopatologia por causarem sérios problemas em culturas de interesse agrícola, como a podridão de frutos, raízes e caules, tombamento de mudas e podridão de sementes na pré e pós-emergência (Plaats-Niterink, 1981; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Assim como os fungos verdadeiros, as espécies de *Pythium* apresentam crescimento micelial com nutrição por absorção e produção de esporos durante sua reprodução (Fry & Grünwald, 2010). Características bioquímicas e estruturais, no entanto, levaram a necessidade de realocar este gênero em um reino diferente ao que os fungos verdadeiros pertencem, sobretudo por produzirem esporos flagelados, apresentarem composição da parede celular constituída de celulose e B-glucanas, hifas sem septos e mitocôndrias com cristas tubulares. Os esporos produzidos pelas espécies de *Pythium* durante a reprodução assexuada são conhecidos como zoósporos, que são diploides e flagelados, sendo um flagelo mais curto e

liso denominado “chicote” e outro do tipo “tinsel” com presença de mastigonemas (Alexopoulos, 1996; Amorim *et al.*, 2016). Durante a reprodução sexuada destes oomicetos são produzidos oósporos que facilitam a sobrevivência na ausência de hospedeiros. Ao encontrar condições favoráveis, estes oósporos germinam produzindo esporângios no qual há um encaminhamento do citoplasma para a formação de vesículas, ocorrendo no interior destas a diferenciação dos zoósporos (esporos que possuem habilidade de nadar em lâminas d’água) que são atraídos para suas hospedeiras através de mediações químicas com exsudatos produzidos pelas raízes de plantas (Amorim *et al.*, 2016; Schroeder *et al.*, 2013).

Desde a década de 30 que se tem informações sobre a ocorrência de diversos patógenos envolvidos na podridão de saia em alface. De fato, esta doença tem sua etiologia dentro de um complexo de espécies, nas quais, participam espécies do gênero *Pythium* (Townsend, 1934, Blok & Plaats-Niterink, 1978; Van Beneden *et al.*, 2009; Claerbout *et al.*, 2019).

A importância do estudo do papel destes patógenos como agentes etiológicos é imprescindível para o sucesso no controle de diversas doenças, entre elas, a podridão de saia. Neste sentido, estudos taxonômicos têm sido realizados ao longo dos anos com o objetivo de elucidar as relações entre as espécies deste gênero e suas hospedeiras (Van der Plaats-Niterink, 1981; Irwin, 1997; Claerbout *et al.*, 2019). Tradicionalmente, a taxonomia do gênero *Pythium* baseia-se em critérios morfológicos, como: conformação de esporângios; ornamentação superficial do oogônio; volume que o oósporo preenche o interior do oogônio; origem e modo de ligação do anterídio ao oogônio; e a presença de espessamentos de hifas (Van der Plaats-Niterink, 1981). No entanto, estas características foram se tornando insuficientes para separar, por vezes, espécies que indicavam ser diferentes entre si quando se consideravam outras características que não somente as morfológicas (Irwin, 1997).

### ***1.5.5 - O uso da biologia molecular na taxonomia do gênero *Pythium****

Com o advento da biologia molecular, os estudos das relações filogenéticas têm ajudado a elucidar de modo mais coerente a relação entre espécies do gênero *Pythium*. O uso de marcadores genéticos como a região interna não transcrita (ITS) do DNA ribossomal, mostra-se efetiva para caracterização de isolados por ter alta variabilidade entre espécies (Irwin, 1997). A análise de sequências destas regiões não codificadas tem sido amplamente usada para estudos de relações entre espécies do gênero *Pythium* (Matsumoto *et al.*, 2000).

Apesar da importância da região ITS na caracterização dentro do gênero *Pythium*, muitas vezes ela se mostra insuficiente para o entendimento da evolução de todo o genoma. Sendo assim, tem sido necessário a inserção de outros genes em análises para um entendimento mais robusto das relações filogenéticas de espécies de *Pythium*. Genes que codificam para proteínas estruturais ou metabólicas como a citocromo oxidase II, fator de translocação e alongação 1-alfa e o gene da Beta-tubulina têm sido considerados atualmente para ampliar a robustez e resoluções das análises filogenéticas (Bruns *et al.*, 1991; Al-Sheikh, 2010; Al-Sheikh & Abdelzaher, 2012; Tojo *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2006).

O gene da citocromo oxidase II é responsável por codificar uma enzima que catalisa o último passo no processo de transporte de elétrons na cadeia respiratória. Por ser de origem mitocondrial, além de diferir da região ITS, esta região é mais variável que o DNA nuclear. Neste sentido, esta região tem sido útil para analisar relações entre microrganismos semelhantes, sobretudo ao nível de subgêneros ou taxas mais inferiores. Estudos realizados na Califórnia, EUA analisaram 684 pares de base dos genes *cox I* e *cox II* com o objetivo de estudar relações filogenéticas entre 24 espécies de *Pythium*. O resultado observado foi que as espécies agruparam em 3 clados para o *cox II* e que de maneira abrangente, isto tinha refletido na morfologia dos zoosporângios e/ou dos espessamentos de hifas (Martin, 2000).

Além da região ITS e da citocromo oxidase II, outros estudos têm considerado o uso

da região da Beta-tubulina. Este gene codifica para proteínas denominadas de tubulina, constituintes dos microtúbulos, citoesqueleto e flagelos de células eucarióticas. Diversos trabalhos têm demonstrado a importância deste gene para uma maior resolução das inferências filogenéticas dentro do gênero *Pythium* (Thon & Royse, 1999). Villa *et al.* (2006) realizaram estudos filogenéticos de isolados de *Pythium* e *Phytophthora* utilizando as regiões ITS, Cox II e Beta-tubulina. Como resultado, os autores conseguiram diferenciar 4 clados que refletiam aspectos morfológicos dos oomicetos analisados. O primeiro clado foi composto por espécies de *Pythium* apresentando esporângios lobulados. O segundo clado foi também composto por espécies de *Pythium* porém com zoosporângios globosos. O terceiro clado abrangendo isolados de *Phytophthora* sendo que espécies papiladas, semipapiladas e não papiladas se agruparam em subclados distintos. Por fim, o quarto clado apresentando espécies de *Pythium* com esporângios subglobosos que se assemelhavam aos esporângios papilados observados em *Phytophthora*.

O círculo de hospedeiras e a resistência à determinados fungicidas de oomicetos fitopatogênicos como os do gênero *Pythium*, podem estar relacionadas à distinção de espécies dentro do gênero. Desta forma, um estudo detalhado utilizando caracterização molecular, pode levar a informações importantes sobre a biologia deste gênero de fitopatogênicos, as quais poderão subsidiar a adoção de diferentes medidas de controle.

## **1.6 - CONTROLE DA PODRIDÃO DE SAIA EM ALFACE**

*Rhizoctonia* spp. e *Pythium* spp. são organismos necrotróficos que podem infectar as plantas em qualquer estágio fenológico, em qualquer órgão, principalmente aqueles em contato com o solo. Assim, estes organismos provocam diversos sintomas na alface, tais como tombamento ou “*damping-off*”, queima de folhas próximas ou em contato com o solo, morte em reboleira, podridão de raízes e de colo com posterior necrose de hastes, brotos e murcha da planta. Dessa forma, estes fungos e estes oomicetos apresentam grande importância

econômica para a alface e várias outras culturas (Amorim *et al.*, 2016).

O controle de doenças causadas por fitopatógenos habitantes do solo, como *Rhizoctonia* spp. e *Pythium* spp., é baseado em medidas preventivas, que devem ser adotadas bem antes do plantio levando-se em consideração o conceito de manejo integrado. Utilização de sementes de boa qualidade tratadas com produtos químicos registrados, uso de mudas e substratos livres do patógeno, tratamento com água sanitária das bandejas utilizadas na produção das mudas, plantio em áreas livres do patógeno e solarização do solo são exemplos de medidas adotadas na prevenção da podridão de saia da alface (Lopes *et al.*, 2010; Blancard *et al.*, 2006). Em relação ao controle químico desta doença, no Brasil há uma escassez de trabalhos de pesquisas direcionados a este modo de controle. No Ministério da Agricultura e do Abastecimento há somente um fungicida registrado para controle de rizoctoniose na alface, o pencicurom (Moncerem 250 SC). Os produtores de alface fazem tratamento da muda antes do plantio e até mesmo pulverizações com este produto. Apesar de não estar registrado para a cultura, os produtores de alface também fazem uso do metalaxyl para controle de tombamento de *Pythium* na bandeja e do míldio (*Bremia lactucae*) em pulverizações foliares. Um dos problemas é que estes produtos têm sido utilizados intensivamente e o uso continuado de um mesmo princípio ativo para o controle de um determinado microrganismo pode levar à seleção de isolados resistentes, tendo os primeiros relatos sobre população resistente de oomicetos a metalaxyl detectados em meados da década de 70 (Reuveni *et al.*, 1980). Estudos em populações de *Pythium* demonstraram a divergência com relação à sensibilidade ao metalaxyl, apresentando uma variabilidade considerável entre espécies e entre isolados da mesma espécie (Lookbaugh *et al.*, 2015; Porter *et al.*, 2009). Tais diferenças observadas nestes isolados podem ser determinantes para o resultado final do controle com o metalaxyl no campo.

## **1.7 - JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E HIPÓTESES**

Dentre as culturas de importância agrícola destacam-se as hortaliças em termos de produção e comercialização. As hortaliças geram um alto volume de renda por metro quadrado, quando comparadas aos grãos. Além disso, as hortaliças são cultivadas principalmente por agricultores familiares e geram uma grande quantidade de empregos diretos e indiretos (INCAPER, 2015).

O Distrito Federal possui um cinturão verde que produz grande quantidade de hortaliças, sendo esta atividade uma das mais importantes do setor rural, gerando mais de 30 mil empregos em toda a cadeia produtiva. Sendo que, 8,7 mil hectares têm sido utilizados para o cultivo de hortaliças alcançando uma produção de mais de 303 mil toneladas de vegetais frescos e de qualidade. Além de abastecer o mercado do DF, a produção local de hortaliças, para algumas espécies, gera excedentes, que são exportados para outros estados da Região Centro Oeste e até mesmo para outras regiões do país (EMATER-DF, 2009; EMATER-DF, 2016).

Conforme o último levantamento realizado pela Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM, 2016), a alface é a folhosa mais consumida no Brasil e a terceira hortaliça mais produzida nacionalmente, com uma área de produção de aproximadamente 38.571 ha. Atualmente, a produção de alface no Brasil se concentra nas regiões Sul e Sudeste do país, com destaque para os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná. (ABCSEM, 2016).

No DF, a alface ocupa a maior área cultivada e o maior número de estabelecimentos produtores, apesar de não apresentar o maior volume de produção, posição ocupada pelo tomate. A alface é cultivada em praticamente todas as cidades satélites e núcleos rurais do DF. A área de produção de alface e a produção no DF são de 1261,05 ha e 26.238,58 ton., correspondendo a 10,55% da produção de hortaliças (EMATER-DF, 2014).

Não há dados sobre as perdas provocadas pela podridão de saia em lavouras de alface no Brasil e no DF. Entretanto, têm-se observado alta incidência desta doença, principalmente nos verões quentes e chuvosos.

Apesar da constante e intensiva ocorrência da podridão de saia da alface no DF, até o momento não se tem dados exatos sobre a incidência da doença nos plantios e nos diferentes núcleos rurais, bem como seu impacto na produção. Tampouco se conhece com precisão a etiologia da doença e a sua prevalência nas áreas de cultivos. É importante estabelecer o montante de perdas causadas por uma determinada doença de planta para que se possa avaliar a viabilidade econômica dos diferentes métodos de controle. Em adição, para que se possam adotar medidas adequadas de controle de fitopatógenos, é de fundamental importância que se identifique corretamente o agente causal da doença. Desta forma, se faz necessário quantificar a incidência da doença para que se possa evidenciar os níveis de perdas causadas por ela. Pensando em métodos de controle, é importante a identificação e quantificação da prevalência de AGs de *R. solani* e espécies de *Pythium* que possam estar associadas à ocorrência da podridão de saia da alface no DF.

### ***1.7.1 - Objetivos***

#### ***1.7.2 – Geral***

Estudar a etiologia da podridão de saia da alface no Distrito Federal, bem como estimar sua prevalência nos campos de cultivos.

#### ***1.7.3 - Específicos***

a) Determinar o tamanho ideal de amostras para a quantificação da podridão de saia em alface crespa;

b) Estimar a prevalência da podridão de saia em plantios comerciais de alface nos principais núcleos rurais produtores do Distrito Federal;

c) Identificar as espécies de patógenos causadores de podridão de saia de alface no Distrito Federal;

d) Avaliar a patogenicidade e agressividade dos agentes causadores da podridão de saia.

#### **1.7.4 – Hipóteses**

a) Não existe um valor mínimo de amostragem para quantificação da podridão de saia em alface nos campos do DF;

b) Há baixa incidência de podridão de saia em plantios comerciais de alface no Distrito federal;

c) A podridão de saia da alface no Distrito Federal não é de etiologia complexa;

d) Isolados de *Rhizoctonia* e *Pythium* são pouco agressivos em alface;

### **1.8 –REFERÊNCIAS**

ABCSEM. 2016. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. Projeto para levantamento dos dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil. Campinas-SP: ABCSEM. 16 p. Disponível em:<[http://www.abcsem.com.br/upload/arquivos/O\\_mercado\\_de\\_folhosas\\_\\_Numeros\\_e\\_Tendencias\\_-\\_Steven.pdf](http://www.abcsem.com.br/upload/arquivos/O_mercado_de_folhosas__Numeros_e_Tendencias_-_Steven.pdf)> Acesso em: 10 fev. 2019.

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & CAMARGO, L.E.A. 2016. Manual de Fitopatologia. v. 2. Agronômica Ceres. Piracicaba, p. 61-63. 810 p.

AGARWAL, D.K. *Rhizoctonia* DC: taxonomy, ecology and management. Taxonomy and ecology of Indian fungi. 2010. IK International Publishing House, New Delhi, p. 19-49.



- AGRIOS, G.N. 2005. Plant Pathology. Academic Press.
- AJAYI-OYETUNDE, O.O.; BRADLEY, C.A. 2018. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of *Rhizoctonia* seedling disease of soybean. Plant Pathology, v. 67, n. 1, p. 3-17.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. 1996. Phylum Oomycota. Introductory Mycology. New York: John Wiley & Sons, 4th ed. p. 683-737.
- ALMEIDA, O.C.; ROBBS, C.F.; AKIBA, F. & KIMURA, O. Enfermidade nova em pimentão causada por *Rhizoctonia solani* Kühn no Brasil. Fitopatologia Brasileira, v. 5, p. 7-10, 1980.
- AL-SHEIKH, H. 2010. Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat Field. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 17, p. 347 - 352
- AL-SHEIKH, H.; ABDELZAHER, H.M.A. 2012. Occurrence, Identification and pathogenicity of *Pythium aphanidermatum*, *P. diclinum*, *P. dissotocum* and *Pythium* "Group P" Isolated from Dawmat Al-Jandal Lake, Saudi Arabia. Research Journal of Environmental Sciences, v. 6: p.196-209.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S.F. 2018. CICLO DE RELAÇÕES PATÓGENO-HOSPEDEIRO. In: AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., & REZENDE, J. Manual de Fitopatologia. v. 1. Agronômica Ceres. Piracicaba, p. 61-63.
- ANDERSON N.A, 1984. Variation and heterokaryosis in *Rhizoctonia solani*. In: Jennings DH, the 367–82. Fungal Mycelium. Cambridge, UK: Cambridge University Press, Rayner ADM, eds. The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium. UK: Cambridge University Press. Cambridge. p. 367–82.

ANDERSON N.A.; STRETTON H.M.; GROTH J.V.; FLENTJE N.T. 1972. Genetics of heterokaryosis in *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* v. 62, p. 1057-65.

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

BASSETO, M.A.; VICENTINI, S.N.C.; GASPAROTTO, L., & CERESINI, P.C. 2019. Mancha areolada de *Thanatephorus* da seringueira na Amazônia: identificação filogenética e variação genética em populações do patógeno. *Summa Phytopathologica*, v. 45(3), p. 285-294.

BERIAM, L.O.S.; ALMEIDA, I.M.G. DE. 2017. DOENÇAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS In: COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R. Boletim Técnico: Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface. São Paulo: Instituto Biológico. p.1-126.

BLANCARD, D.; LOT, H.; MAISONNEUVE, B. 2006. A Color Atlas of Disases of Lettuce and Related Salada Crops, Observation, Biology and Control. Academic Press. San Diego.

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

BOLKAN, H.A.; RIBEIRO, W.R.C. 1985. Anastomosis group and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. *Plant Disease*, v. 69, p.599-601.

BOYSEN, M., BORJA, M., MORAL, C., SALAZAR, O. & RUBIO, V. 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of

asymmetric PCR products of the ITS regions. *Curr Genet.*, v. 29, p. 174-181.

BRASIER, C.M., RAYNER, A.D.M. Whiter terminology below the species level. *Evolutionary Biology of the Fungi*. Cambridge Univ. Press, 1987.

BRITTLEBANK, C. C. Tomato diseases. *Journal of the Department of Agriculture Victoria*, v.17, p.213-235.

BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* v. 22, p. 525–564.

BURTON, R.J., COLEY-SMITH, J.R., WAREING, P.W. & GLADDES, P. 1988. *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* associated with barley stunt disease in the United Kingdom. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 91, 409-417.

CAMPACI, C.A., FIGUEIREDO, M.B. Ocorrência de rizoctonioze em amendoim. 1964. *O Biológico (São Paulo)*, v. 30, p. 267-8.

CARISSE, O., OUMET, A., TOUSSAINT, V. & PHILION, V. 2000. Evaluation of the effect of seed treatments, bactericides, and cultivars on bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Disease*, v. 84(3), p. 295-299.

CARLING, D.E. 2000. Anastomosis group and subsets of anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. In: *International Symposium on Rhizoctonia 3*. Taichung. Abstract Taichung, ISR, p. 14.

CARLING, D.E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis interactions. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S., DIJST, G.) (eds.). *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 37-47.

CARLING, D.E., KUNINAGA, S., BRAINARD, K.A. 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology*, v. 92, n. 1, p. 43-50.

CARLING, D.E., LEINER, R.H. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathology*, v. 80, p. 930-934.

CARLING, D.E., SUMNER D.R. 1992. *Rhizoctonia*. In: Singleton, L.L., Mihail J.D., Rush, C.M. (eds.). *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. St. Paul: American Phytopathological Society, p.157-65.

CERESINI, P.C.; FENILLE, R.C. & SOUZA, N.L. 1996. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn AG4 HGI à vagens de amendoineiro (*Arachis hypogea*) no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v. 22, p. 145-55.

CERESINI, P.C.; SHEW, H.D.; VILGALYS, R.J.; CUBETA, M.A. 2002. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia*, v. 94, n. 3, p. 437-449.

CERESINI, P.C.; SOUZA, N.L. 1997. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e *R. solani* Kühn AG4 HGI e AG 2-2 IIIB ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v. 23, p. 14-24.

CHAGAS, C.M. 1970. Vira-cabeça em alface. *O Biológico*, v. 36, p. 256.

CHAVARRO MESA, E. 2015. A origem de populações emergentes do patógeno da queima-da-folha (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) da *Urochloa* spp. na Amazônia e seu potencial de adaptação a outros agroecossistemas brasileiros. (Tese de doutorado). 137 p.

CLAERBOUT, J.; DECOMBEL, A.; VOLCKAERT, A.; VENNEMAN, S.; VANDEVELDE, I.; BLEYAERT, P. & HÖFTE, M. 2019. Glasshouse-specific occurrence of basal rot pathogens and the seasonal shift of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups in lettuce. *European Journal of Plant Pathology*, v. 155(3), p. 841-858.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A. L. R. DOENÇAS CAUSADAS POR VÍRUS. In: COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R. 2017. Boletim Técnico: Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface. São Paulo: Instituto Biológico. p.1-126.

COSTA, A. S.; FORSTER R. 1938. A transmissão mecânica de vira-cabeça por fricção com suco. *Revista de Agricultura, Piracicaba*, v. 13, p. 249-262.

CURRAH R.S.; SIGLER L. & HAMBLETON S. 1987. New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Canadian Journal of Botany*, v. 65, p. 2473–2482.

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

DATE, H.; YAGI, S.; OKAMOTO, Y. & ONIKI, M. 1984. On the leaf blight of tomatoes by *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (*Rhizoctonia solani*). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v. 50, p. 339.

DAVIS, R.M.; SUBBARAO, K.V.; RAID, R.N. & KURTZ, E.A. 1997. Compendium of Lettuce Diseases. St. Paul, APS Press, p.01-08.

DE MELO, M.P.; CABRAL, C.S.; REIS, A.; MATOS, K.S.; MARTINS, P.P.; JÚNIOR, J. E. B.; & HALFELD-VIEIRA, B.A. 2018. *Rhizoctonia solani* AG 1-IB and AG 4 HG-I causing leaf blight and root rot in plants from the Lamiaceae family in Brazil. *Tropical*

Plant Pathology, v. 43(2), p. 152-159.

DINANT S, Lot H. 1992. *Lettuce mosaic virus*. Plant Pathology 41, 528-542.

EKEN, C.; DEMIRCI, E. 2004. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* isolates from bean in Erzurum, Turkey Journal of Plant Pathology, v. 86(1), p. 49-52.

ELANGO, F. 1986. The role of high temperature in the damping-off of true potato seedlings in the lowland tropics. Trop. Agric., v. 63, p. 66-67.

EMATER-DF. 2009. Plano executivo de desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva de hortaliças no Distrito Federal, período de 2009/2014. Brasília, Emater/DF, 52pp.

EMATER-DF. 2014. Informações Agropecuárias do Distrito Federal 2013. Brasília, EMATER, 19pp.

EMATER-DF. 2016. Relatório de Atividades de 2016. Brasília, Emater/DF, 57pp.

EXAME. 2016. Mercado de alface cresce continuamente no Brasil. In: <https://exame.abril.com.br/negocios/dino/mercado-de-alface-cresce-continuamente-no-brasil-shtml/>. Consultado em 13/08/2017).

FENILLE, R.C., CIAMPI, M.B., SOUZA, N.L., NAKATANI, A.K., KURAMAE, E.E. 2005. Binucleate *Rhizoctonia* sp. AG causing root rot in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in Brazil. Plant Pathology, v. 54, p. 325-330.

FERRAZ, L. C.C.B. NEMATOIDES. 2018. In: Amorin, L.; Bergamin Filho, A. & REZENDE, J. Manual de Fitopatologia. v. 1. Piracicaba: Agronômica Ceres., 61-63.

FERREIRA, A.B.H. 1985. Novo Dicionário da Língua Portuguesa. Segunda edição.

Nova fronteira, p. 82.

FILGUEIRA, F.A.R. 2008. Asteráceas. Alface e outras folhosas. In: Filgueira, F.A.R. (ed.). Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna para produção de hortaliças. 2ª ed. revista e ampliada. UFV. Viçosa. p. 300–306.

FILGUEIRA, F.A.R. 2013. Asteráceas. Alface e outras folhosas. In: Filgueira, F.A.R. (ed.). Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna para produção de hortaliças. 3ª ed. revista e ampliada. UFV. Viçosa. p. 300–306.

FREIRE, J.R.J. 1954. Uma bacteriose em alface (*Lactuca sativa* L.) causada por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. Rev. Agron. de Porto Alegre. v. 17, 40 p.

FRY, W.E. & GRÜNWALD, N.J. 2010. Introduction to Oomycetes. The Plant Health Instructor. Doi:10.1094/PHI-I-2010-1207-1. Disponível em: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroOomycetes.aspx>. Consultado em: maio de 2017.

GAINO, A.D.S., BASSETO, M.A.; GASPAROTTO, L.; POLTRONIERI, L.S. & CERESINI, P.C. 2010. Inferência filogenética revela a complexa etiologia das manchas areolada e foliar em seringueira e em outras espécies cultivadas na Amazônia. Acta Scientiarum. Agronomy, v. 32, n. 3, p. 385-395, 2010.

GASPAROTTO, L., TRINDADE, D.R., LIEBEREI, R. 1981. Avaliação da resistência de clones de seringueira a mancha aureolada (*Thanatephorus cucumeris*). Fitopatologia Brasileira, v. 6, supl., p. 555. (Abstract).

GODOY-LUTZ, G.; STEADMAN, J.R.; HIGGINS, POWERS, K. 2003. Genetic variation among isolates of the web blight pathogen of common bean based on PCR-RFLP of

the ITS-rDNA region. *Plant Disease*, v. 87, n. 7, p. 766-771.

GÓNZALEZ, D.; RODRIGUEZ-CARRES, M.; BOEKHOUT, T.; STALPERS, J.; KURAMAE, E. E.; NAKATANI, A.K. & CUBETA, M.A. 2016. Phylogenetic relationships of *Rhizoctonia* fungi within the Cantharellales. *Fungal Biology*, v. 120(4), p. 603-619.

GRAU, A.; REA, J. 1997. Yacon. *Smallanthus sonchifolius*. (Poepp & Endl.) H. Robinson. In: Hermann, M. and J. Heller (eds.). *Andean roots and tubers: ahupa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized crops*. IPK, Gatersleben/IPGRI, Rome, p. 199-256.

GROGAN, R.G., MISAGHI, I.J.; KIMBLE, K.A.; GREATHEAD, A.S.; RIRIE, D. & BARDIN, R. 1977. Varnish spot, destructive disease of lettuce in California caused by *Pseudomonas cichorii*. *Phytopathology*, v. 67(8), p. 957-960.

HENZ, G.P.; SUINAGA, F. 2009. Tipos de alfaces cultivadas no Brasil. (Comunicado Técnico Número 75). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. 7pp.

HOMMA, Y.; ISHII, M. 1984. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kuehn responsible for various symptoms of the root rot of Japanese radish. *Bull. Shikoku Agric. Exp. Stn.*, v. 42, p. 1-11.

HUNT, D.J.; HANDOO, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. *Root-knot Nematodes*, 1, 55-88.

HURD, B.; GRISHAM, M.P. 1983. *Rhizoctonia* spp. associated with brown patch of St. Augustinegrass. *Phytopathology*, v. 73, p. 1661-1665.

HYAKUMACHI, M. & UI, T. 1987. Non-self-anastomosing isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from fields of sugarbeet monoculture. *Transactions of the British Mycological*



Society v. 89, p. 155–159.

HYAKUMACHI, M., MUSHIKA, T., OGISO, Y., TODA, T., KAGEYAMA, K., TSUGE, T. 1998. Characterization of a new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG2-2 isolated from warm-season turfgrasses, and its genetic differentiation from other cultural types. *Plant Pathology*, v. 47, p. 1-9.

INCAPER. Olericultura. Em: <http://www.incaper.es.gov.br/pedeag/setores07.htm>. (Acessado em 29/06/2015).

INOKUTI, E.M.; REIS, A.; CERESINI, P.C.; CÂMARA, M. P.; & MICHEREFF, S.J. 2019. Diversity and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia* associated with potato stem canker and black scurf diseases in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 153(4), p. 1333-1339.

JAAFFAR, A.K.M.; PAULITZ, T.C.; SCHROEDER, K.L.; THOMASHOW, L.S. & Weller, D. M. 2016. Molecular characterization, morphological characteristics, virulence, and geographic distribution of *Rhizoctonia* spp. in Washington State. *Phytopathology*, v. 106(5), p. 459-473.

JADÃO, A.S.; PAVAN, M.A.; Da SILVA, N. & ZERBINI, F M. 2002. Transmissão via semente do *Lettuce mosaic virus* (LMV) patótipos II e IV em diferentes genótipos de alface. *Summa Phytopatologica*, v. 28(1), p. 58-61.

JESUS, A.L.; MARANO, A.V.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. & PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. 2013. Diversidade de organismos zoospóricos heterotróficos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: novas citações. *Hoehnea*, 40(1), 167-180.

JONES, R.K.; BELMAR, S.B. 1989. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* ssp. isolates from rice, soybean, and other crops grown in rotation with rice in Texas. *Plant Disease*, v. 73, p. 1004-1010.

JUNGLEN S. 2016. Evolutionary origin of pathogenic arthropod-borne viruses – A case study in the family Bunyaviridae. *Archives of Virology* v. 154, p.1719–1727.

KAGEYAMA K. 2014. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. *Journal of General Plant Pathology*, v. 80(4), p. 314-326.

KAJIWARA, T.; SUGATA, S. 1971. On the *damping-off* of *chrysanthemum* by *Rhizoctonia*. *Resp. Soc. Plant Prot. Kanto*, v. 18, p. 74.

KANDEL, R. 2015. Identification of QTLs for *Liriomyza trifolii* resistance and two agronomic traits in lettuce. Doctoral dissertation. University of Florida.

KATZ, S.H. & WEAVER, W.W. 2003. *Encyclopedia of food and culture: obesity to zoroastrianism* (Vol. 3). New York: Scribner.

KEIJER, J.; HOUTERMAN, P.M.; DULLEMANS, A.M.; KORSMAN, M.G. 1996. Heterogeneity in electrophoretic karyotype within and between anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. *Mycological Research*, v. 100, p. 789-797.

KIRK P.M.; CANNON P.F.; DAVID J.C. & STALPERS, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 11<sup>a</sup> ed. CABI Wallingford. Pp. 1-180. Publishing,

KODAMA, T.; HORIMOTO, K.; OGOSHI, A. 1982. On the brown spot of eggplants caused by *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (*Rhizoctonia solani*) AG-3. *Ann. Phytopathol.*, v. 48, p. 356.

KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M.A.; MOURA, M.F.; KUROZAWA, C. 2016. DOENÇAS DA ALFACE. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., & Camargo, L. E. A. Manual de Fitopatologia. v 2, 772 p.

KRAUSE-SAKATE, R.; LE GALL, O.; FAKHFAKH, H.; PEYPELUT, M.; MARRAKCHI, M.; VARVERI, C.; PAVAN, M.A.; SOUCHE, S.; LOT, H.F.M.; CANDRESSE, T. 2002. Molecular and biological characterization of Lettuce, *mosaic virus* isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology*, St Paul, v. 92, p. 563-572.

KRETZER, A.M.; BRUNS, T.D. 1999. Use of ATP6 in fungal phylogenetics; an example from the Boletales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 13, p. 438-492.

KUMAR, S.; SIVASITHAMPARAM, K.; SWEETINGHAM, M.W. 2002. Prolific production of sclerotia in soil by *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG) 11 pathogenic on lupin. *Annals of Applied Biology*, v. 141, p. 1-18.

KUNINAGA, S.; CARLING, D.E. 2000. Comparison of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-2 and AG-BI based on anastomosis reactions, rDNA sequence analysis and pathogenic potential. In: International Symposium on *Rhizoctonia*, 3, 2000, Taichung. Abstract. Taichung: International Symposium on *Rhizoctonia*, p.23, 2000.

KUNINAGA, S.; NATSUAKI, T.; TAKEUCHI, T.; YOKOSAWA, R. 1997. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Curr Genetic*, v. 32, p. 237-243.

KURAMAE, E.E., BUZETO, A.L, CIAMPI, M.B, SOUZA, N.L. 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in Lettuce, AG 4 HG-I in Tomato and Melon, and AG 4 HG-III in Broccoli and Spinach, in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 109, n. 4, p.

391-395.

KURAMAE, E.E.; NOZAKI, D.N., FENILLE, R.C., CERESINI, P.C., SOUZA, N.L. 2002. Elemento extracromossomal dsRNA em *Rhizoctonia* AG4 HGI e AG2-2 IIIB e *Rhizoctonia* spp. binucleada associados às culturas de feijão e amendoim. *Summa Phytopathologica*, v. 28, p. 52-57.

LIMA, M.; MICHEREFF FILHO, M.; BOITEUX, L. & SUINAGA, F. 2016. Doença vira-cabeça em alface: sintomatologia, transmissão, epidemiologia e medidas de controle. Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E).

LIU, Z.L.; DOMIER, L.L.; SINCLAIR, J.B. 1993. ISG specific ribosomal DNA polymorphism of the *Rhizoctonia solani* complex. *Mycologia*, v. 85, p. 795-800.

LOOKBAUGH, E.C.; IVORS, K.L. & SHEW, B.B. 2015. Mefenoxam sensitivity, aggressiveness, and identification of *Pythium* species causing root rot on floriculture crops in North Carolina. *Plant Disease*, v. 99(11), p. 1550-1558.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; REIS, A. 2010. Doenças da Alface. Brasília, Embrapa Hortaliças, 68pp.

MACNISH, G.C.; O'BRIEN, P.A. 2000. RAPD-PCR used to support concept of sub-populations with *Rhizoctonia solani* AG-8. In: International Symposium on *Rhizoctonia*, 3, 2000. Taichung: International Symposium on *Rhizoctonia*, p.41.

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

MARTIN, S.B.; LUCAS, L.T. 1984. Characterization and pathogenicity of

*Rhizoctonia* ssp. and binucleate *Rhizoctonia*-like fungi from turfgrasses in North Carolina. *Phytopathology*, v. 74, p. 170-5.

MATSUMOTO, T. 1932. Physiology and parasitology of the fungi generally referred to as *Hypochnus sasakii* Shirai. I. Differentiation of the strains by means of hyphal fusion and culture in differential media. *J. Soc. Tropical AgR.*, v. 4, p. 370-388.

MATSUMOTO, C.; KAGEYAMA, K.; SUGA, H.; HYAKUMACHI, M. 2000. Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. *Mycoscience* v. 40, p. 321–331.

McNABB, R.F.R.; TALBOT, P.H.B. 1973. Holobasidiomyceteidae. En G.C. Ainsworth *et al.* (eds.) *The Fungi: An advanced Treatise*. IV B. Academic Press, N.Y. p. 317-325.

MEYER, J.C.; VAN WYK, R.J.; PHILLIPS, A.J.L. 1990. *Rhizoctonia* leaf spot of tobacco in South Africa. *Plant Pathology*, v. 39, p. 206-207.

MEYER, M.C.; YORINORI, J.T. 1999. Incidência de doenças da soja em regiões tropicais. In: Congresso Brasileiro de Soja, Londrina. Anais. Londrina, Embrapa Soja, 1999, p. 457. (Embrapa Soja. Documentos, 124)

MORAES, G. J.; WANDERLEY, L. J.; COSTA, A. S. 1988. Surto de vira-cabeça na cultura de alface em Pernambuco. *Horticultura Brasileira*, v. 6. P.24-25, 1986. Resumo.

MORAES, S.R.G.; CAMPOS, V.P.; POZZA E.A.; FONTANETTI, A., CARVALHO, G.J.; MAXIMINIANO, C. 2006. Influência de leguminosas no controle de fitonematoides no cultivo orgânico de alface americana e de repolho. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 31n.2, p. 188-191.

MORDUE, J.E.M. 1974. *Thanatephorus cucumeris*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, n. 41.

MOU, B. 2008. Lettuce. In: Prohens, J.; Nuez, F. & Carena, M.J. (eds.). Handbook of Plant Breeding. Vegetables I. Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae. Springer. New York. p.75–116.

MUYOLO, N.G.; LIPPS, P.E., SCHMITTHENNER, A.F. 1993. Anastomosis grouping and variation in virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* associated with dry bean and soybean in Ohio and Zaire. *Phytopathology*, v. 83, n. 4, p. 438-444.

NAITO, S. & KANEMATSU, S. 1994. Characterization and pathogenicity of a new anastomosis subgroup AG-2-3 of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from leaves of soybean. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 60(6), 681-690.

NAITO, S.; MOCHIDA, H.; NAKAJIMA, T.; OHTO, Y. 1995. Infection with basidiospores of *Thanatephorus cucumeris* (AG2-3 of *Rhizoctonia solani*) and development of soybean foliar blight lesion. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, v. 61, p. 362-8.

NAKATANI, Andréia Kazumi. 2006. Diversidade genética de *Rhizoctonia* spp. e análise de sequência multilocus (Tese de doutorado). Faculdade de ciências Agrônômicas da Unesp – Campus de Botucatu. Botucatu-SP, Brasil.

NAKATOMI, Y.; KANEKO, H. 1971. Ecology and control of leaf blight of tulip. *Plant Prot.*, v. 25, p. 191-194.

NEATE, S.M.; WARCUP, J.H. 1985. Anastomosis grouping of some isolates of *Thanatephorus cucumeris* from agricultural soils in South Australia. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 85, p. 615-620.

NICOLETTI, R.; LAHOZ, E.; KANEMATSU, S.; NAITO, S. & CONTILLO, R. 1999. Characterization of *Rhizoctonia solani* isolates from tobacco fields related to anastomosis groups 2-1 and BI (AG 2-1 and AG BI). *Journal of Phytopathology*, v. 147 (2), p. 71-77.

OGOSHI, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Phytopathology*, v. 25, p. 125-143.

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

PAMPLONA, J.R. 2015. O Poder Medicinal dos Alimentos. Tatuí, SP: Casa publicadora Brasileira. 272 p.

PARMETER, J.R.; SHERWOOD, R.T. & PLATT, W.D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of 1270-8. *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59. 19 p.

PARMETER, J.R.; WHITNEY, H.S. 1970. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: PARMETER, J.R., JR. (Ed.) *Rhizoctonia solani*: biology and pathology. Berkeley: University of California Press, p. 7-19.

PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H.; VIEIRA, R. F.; LEHNER, M. S.; LIMA, R. C.; QUEIROZ, T. F. N. 2011. Susceptibility of leguminous green manure species to *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Summa Phytopathologica*, v. 37, n. 4, p. 218-220.

PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; SILVA, N. D.; ZERBINI, F.M. & LE GALL, O. 2008. Virus diseases of lettuce in Brazil. *Plant viruses*, 2(1), 35-41.

POLTRONIERI, L.S.; VERZIGNASSI, J.R. & BENCHIMOL, R.L. 2008. *Tectona*

*grandis*, nova hospedeira de *Rhizoctonia solani* no Pará. Summa Phytopathologica, v. 34(3), p. 291. (Abstract)

PORTER, L.D.; HAMM, P.B.; DAVID, N.L.; GIECK, S.L.; MILLER, J.S., GUNDERSEN, B. & INGLIS, D.A. 2009. Metalaxyl-M-resistant *Pythium* species in potato production areas of the Pacific Northwest of the USA. American Journal of Potato Research, v. 86(4), p. 315-326.

REUVENI, M.; EVAL, H. & COHEN, Y. 1980. Development of resistance to metalaxyl in *Pseudoperonospora cubensis*. Plant Disease, v. 64, p. 1108–1109.

REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. 2018. VÍRUS E VIROIDES In: AMORIN, L., BERGAMIN FILHO, A., & REZENDE, J. (2018). Manual de Fitopatologia. v. 1. Piracicaba: Agronômica Ceres., p. 161-162.

ROBBS, C.F. 1962. Uma doença bacteriana da alface (*Lactuca sativa* L.), nova para o Brasil. Olericultura, Brasília, v. 22 p. 150-15.

ROSA, D.D.; FENILLE, R.C.; SOUZA, N.L. & KURAMAE, E.E. 2005. Caracterização citomorfológica, molecular e patogênica de isolados de *Rhizoctonia solani* de batata. Summa Phytopathologica, v. 31, n. 2, p. 133-141.

RUBATZKY, V.E.; YAMAGUCHI, M. 1997. Vegetable classification. In: World Vegetables. Springer, Boston, MA, p. 29-33.

RYDER, E.J. 1999. Lettuce, Endive and Chicory. CABI Publishing. New York.

SALA, F.C. & COSTA, C.P. 2016. Melhoramento de alface. In: Nick, C. & Bórem, A. (Eds.). Melhoramento de Hortaliças. UFV. Viçosa, MG.



SALA, F.C. & COSTA, C.P. 2012. Retrospectiva e tendência da alfacultura brasileira. *Horticultura Brasileira* 30: 187–194.

SANDOVAL, R.F.C. & CUMAGUN, C.J.R. 2019. Phenotypic and Molecular analyses of *Rhizoctonia* spp. associated with rice and other hosts. *Microorganisms*, 7(3), 88.

SCHROEDER, K.L.; MARTIN, F.N.; De COKE, A. W.; LÉVESQUE, C.A.; SPIES, C.F.; OKUBARA, P.A. & PAULITZ, T.C. 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Disease*, 97(1), 4-20.

SHEHATA, M.A.; PFLEGER, F.L. & DAVIS, D.W. 1983. Response of susceptible and moderately resistant pea genotypes to interaction between *Rhizoctonia solani* and three other stem and root rot pathogens. *Plant Disease*, v. 67, p. 1146-1148.

SILBERSCHMIDT, K. M. 1937. A doença vira-cabeça do fumo. *O Biológico*, São Paulo, v. 3, n. 6, p. 183-184.

SILVEIRA, S.F.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; SUTTON, J.C. 2000. Characterization of *Rhizoctonia* species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally propagated Eucaliptus in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 106, p. 27-36.

SIVIERO, A.; de MACEDO, P. E.; MOREIRA, G.T., NECHET, K.L.; COELHO, R. M. & HALFELD-VIEIRA, B.A. 2019. First report of cassava leaf blight caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Australasian Plant Disease Notes*, 14(1), 25.

SNEH B, Burpee L, Ogoshi A, 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. St Paul, MN, USA: APS Press.

SNEH B, Burpee L, Ogoshi A, 1998. Identification of *Rhizoctonia* Species. St Paul,

MN, USA: APS Press.

SOUSA, N.D.M & ROCHA J.R.S. 2017. Oomicetos (Stramenipila) no Rio Poti, perímetro urbano de Teresina, Piauí. *Pesquisa Botânica* 70: 95-107.

STANGARLIN, O.; PAVAN, M.A. & DA SILVA, N. 2000. Occurrence of a new pathotype of *Lettuce mosaic virus* on lettuce in Brazil. *Plant Disease*, v. 84, n. 4, p. 490-490.

STAPP, C. 1935. Eine bakterielle Faule an *Lactuca sativa* var. *capitata* L. und *Cichorium endivia* L. *Zentral Blatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Abteilung 2*, v. 91, p. 232-243.

STONE, G.E. & SMITH, R.E. 1900. The rotting of greenhouse lettuce. *Mass. Agric. Exp. Stn. Bull.* 69.

SUSSEL, A.A.B.; FENILLE, R.C.; KURAMAE, E.E. & SOUZA, N.L. 2001. Caracterização de *Rhizoctonia solani*, agente etiológico do tombamento de mudas de café. *Summa Phytopathologica*, v. 27, n. 4, p. 348-352.

TAKASHI, N. & TADAO, U. 1978. Ecological and morphological characteristics of the sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kühn produced in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 10(6), 471-478.

TANAKA, M.A.S.; COQUEIRO, G.R. 1981. *Thanatephorus cucumeris* (Pellicularia filamentosa (Pat.) Rogers) em viveiros de seringueira em Felixlândia, MG. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p. 123-125.

THON, M.R. & ROYSE, D.J. 1999. Partial  $\beta$  tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. *Mycologia*, v. 91, p. 468-474.

TÖFOLI, J.G. & DOMINGUES, R.J. 2017. DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS. In: COLARICCIO, A. & CHAVES, A.L.R. Boletim Técnico: Aspectos Fitossanitários da Cultura da Alface. São Paulo: Instituto Biológico. p.1-126.

TOJO, M.; MATSURA, S.; TAKASE, M.; RADMER, L.E. 2013. Morphological and Molecular identification of *Pythium aphanidermatum* causing root rot of tomato in a hydroponic substrate culture in the South Western Region of Japan. Annual Report of Kansai Plant Protection Society, v. 55, p.57-58.

TOMASO-PETERSON, M.; TREVATHAN, E. 2004. *Rhizoctonia solani* AG-13 isolated from corn in Mississippi. Plant Disease, v. 88, n. 8, p. 908.

TOWNSEND, G.B. 1934. Bottom rot of lettuce. New York (Cornell) Agr. Expt. Sta. Mem. 158.

VAN BENEDEN, S., PANNECOUCQUE, J.; DEBODE, J.; De BACKER, G. & HÖFTE, M. 2009. Characterisation of fungal pathogens causing basal rot of lettuce in Belgian greenhouses. European Journal of Plant Pathology, v.124, p. 9–19.

VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology, Baarn, v. 21, p.1-242.

VILGALYS, R. & CUBETA, M.A. 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. Phytopathology, v. 32, p. 135-155.

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

VORONIN L.V. 2008. Zoospore fungi in freshwater ecosystems. Inland Water

Biology 1: 341-346.

WARCUP J.H.; TALBOT P.H.B. 1966. Perfect states of some *Rhizoctonia*. Transactions of the British Mycological Society 49, 427–35.

WATANABE, B.; MATSUDA, A. 1966. Studies on the grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn pathogenic to upland crops. Bull. App. Exp., v. 7, p. 1-131.

YANG, X.B., BERGGREN, G.T., SNOW, J.P. 1988. Seedling infection of soybean by *Rhizoctonia solani* AG-1, causal agent of aerial blight. Plant Disease, v. 72, p. 644.

YORINORI, J.T. 1998. Estratégias de controle das doenças da soja. Correio Agrícola, n. 2, p. 8-12, 1998.

# CAPÍTULO 2

---

**Determinação do tamanho ideal de amostras para a quantificação da podridão de saia em alface crespa no Distrito Federal - Brasil**

1 **2 – DETERMINAÇÃO DO TAMANHO IDEAL DE AMOSTRAS PARA A**  
2 **QUANTIFICAÇÃO DA PODRIDÃO DE SAIA EM ALFACE CRESPA NO DISTRITO**  
3 **FEDERAL – BRASIL.**

4

5 **Luiz Henrique R. Lopes<sup>1</sup>, Adalberto C. Café Filho<sup>1</sup>, Antônio W. Moita<sup>2</sup>; Ailton Reis<sup>2</sup>**

6 <sup>1</sup>Universidade de Brasília, Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Brasília, Brasil,  
7 luizhenriquelopes.fito@gmail.com; cafefilh@unb.br;

8 <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, Brasília, Brasil, antonio.moita@embrapa.br; ailton.reis@embrapa.br

9

10 **2.1 - RESUMO**

11 O Distrito Federal (DF) produz um grande volume de hortaliças, sendo esta atividade uma das  
12 mais importantes do setor rural. Mais de 30 mil empregos são gerados em toda a cadeia  
13 produtiva, utilizando mais de 8 mil hectares para o cultivo de diversas hortaliças, sobretudo de  
14 alface. Toda esta atividade abastece o mercado interno de folhosas do DF, sendo o excedente  
15 exportado para outros estados como os da Região Centro-Oeste. Apesar dos dados  
16 promissores, diversos fatores têm impedido um maior crescimento do comércio de folhosas  
17 no DF. Entre eles, a doença conhecida como podridão de saia. O objetivo deste trabalho foi  
18 determinar a quantidade ideal de amostras para a quantificação da podridão de saia em alface  
19 em levantamentos de campo. As amostragens foram realizadas em nove propriedades  
20 espalhadas em cinco regiões produtoras do Distrito Federal. Os resultados obtidos neste  
21 trabalho demonstram que, para futuros levantamentos em estudos epidemiológicos  
22 envolvendo esta doença, a quantidade ideal de amostras a serem coletadas para avaliação da  
23 incidência em campos de produção no Distrito Federal é de 378 parcelas para um erro de 5%,  
24 de 94 parcelas para um erro de 10% e de 24 parcelas para um erro de 20%, sendo considerado  
25 em todos os casos, o levantamento de 20 plantas por parcela. Houve correlação significativa  
26 ( $P \leq 0,05$ ) entre a intensidade de agregação de amostras e o tamanho da amostra coletada. No  
27 entanto, não houve correlações significativas entre: a incidência da doença com o tamanho da  
28 amostra, e entre a incidência da doença e os valores que expressaram a intensidade de  
29 agregação da doença. Os dados obtidos neste trabalho servem como base para futuros estudos  
30 envolvendo questões epidemiológicas e de manejo desta importante doença em plantios de  
31 alface.

32

33 **Palavras-chave:** Alface; *Lactuca sativa*; *Rhizoctonia solani*.

34 **Determination of ideal sample size to quantify lettuce bottom rot in Federal**  
35 **District – Brazil**

36  
37 **2.2 - ABSTRACT**

38 The Federal District (DF) produces a large volume of vegetables, which is one of the most  
39 important activity of the local rural sector. More than 30 thousand jobs are generated  
40 throughout the production chain, using more than 8 thousand hectares for the cultivation of  
41 various vegetables, especially lettuce. The lettuce harvest mainly supplies the domestic  
42 market, but the surplus is exported to other states in the Midwest Region. Despite the  
43 promising trade, several factors have prevented a greater growth of the lettuce business in DF.  
44 Among them, the disease known as bottom rot. The objective of this work was to determine  
45 the ideal sample size for the quantification of bottom rot in lettuce in field surveys. Sampling  
46 was carried out in five growing regions in the Federal District. The results obtained in this  
47 work demonstrate that, for future surveys in epidemiological studies involving this disease,  
48 the ideal amount of samples to be collected to evaluate the incidence in growing fields is 378  
49 plots considering an error of 5%, of 94 plots for a 10% error and 24 plots for a 20% error,  
50 taking in account in all cases the survey of 20 plants per plot. There was a significant  
51 correlation ( $P \leq 0.05$ ) between the intensity of sample aggregation and the size of the sample  
52 collected. However, there were no significant correlations between: the mean incidence of the  
53 disease with the sample size, and between the mean incidences and the values that expressed  
54 the intensity of disease aggregation. The data obtained in this work serve as a basis for future  
55 studies in the Federal District, involving epidemiological and management issues of this  
56 important disease that affects lettuce crops.

57  
58 **Keywords:** Bottom rot; Lettuce; *Lactuca sativa*; *Rhizoctonia solani*.

59

## 60 2.3 - INTRODUÇÃO

61 O cinturão verde do Distrito Federal (DF) exerce importante papel no abastecimento  
62 de hortaliças no mercado local dos estados brasileiros que compõem a região Centro Oeste.  
63 Dentro do DF, o cultivo de alface (*Lactuca sativa* L.) possui a maior área plantada e o maior  
64 número de propriedades produtoras, apesar de não apresentar o maior volume de produção,  
65 posição esta ocupada pelo tomate (EMATER-DF, 2014; EMATER-DF, 2016). O mercado do  
66 Distrito Federal segue a tendência nacional da produção e consumo, em sua maioria, de alface  
67 crespa (Sala & Costa, 2012). A alface é cultivada em praticamente todas as cidades satélites e  
68 núcleos rurais do DF. A área de produção de alface e a produção no DF são, respectivamente,  
69 de 1.261,05 ha e 26.238,58 ton., correspondendo a 10,55% da produção de hortaliças  
70 (EMATER-DF, 2014). Apesar dos bons índices de produção e das boas previsões para o  
71 mercado dessa folhosa no DF, alguns problemas podem impedir o crescimento da produção  
72 de alface. Entre eles, a ocorrência de doenças causadas por fitopatógenos de solo, como a  
73 podridão de saia.

74 A podridão de saia em alface teve seu agente causal descrito inicialmente como  
75 *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorfo *Tanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] ao ser detectada  
76 em casas de vegetação no estado de Massachusetts – Estados Unidos no início do século XX  
77 (Stone *et al.*, 1990). Estudos posteriores demonstraram que esta doença é causada por um  
78 complexo de espécies, podendo envolver a presença de *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia* spp. e  
79 frequentemente *Pythium* spp. (Townsend, 1934, Blok & Plaats-Niterink, 1978). Os sintomas  
80 característicos desta doença são manchas que tem coloração variando em tons de marrom,  
81 principalmente na parte interior da nervura principal, no meio da folha. Com a evolução da  
82 doença, os vasos da folha são colapsados e o limbo foliar torna-se necrosado, com aspecto de  
83 queimado (Raid, 1997; Davis *et al.*, 1997; Blancard *et al.*, 2006; Takashi & Ui, 1978).



84 Na experimentação agrícola, a qualidade dos resultados que são obtidos depende da  
85 precisão com que os experimentos são realizados. Neste sentido, o erro experimental  
86 correspondente às variações entre repetições do mesmo tratamento deve ser minimizado para  
87 que o efeito dos tratamentos seja estimado com confiabilidade (Catapatti, *et al.*, 2008). Além  
88 disso, a precisão experimental geralmente tem melhores resultados quando se alcança o  
89 adequado dimensionamento do número de repetições e escolha do desenho experimental  
90 (Storck *et al.*, 2006; Catapatti *et al.*, 2008). No entanto, em muitos casos experimentais, as  
91 variáveis devem ser obtidas por amostragem de parcelas uma vez que geralmente é inviável  
92 amostrar toda a população, considerando demanda de mão de obra, tempo e recursos  
93 financeiros (Cargnelutti Filho *et al.*, 2009). O tamanho da amostra, por sua vez, pode sofrer  
94 diversas influências. Em casos de pragas e doenças, é afetado por sua distribuição espacial no  
95 campo (Lúcio *et al.*, 2009; Michereff *et al.*, 2011). Desta forma, a distribuição da doença no  
96 campo influencia na escolha do método para calcular o tamanho ideal de amostras para  
97 quantificações de doença. Por exemplo, para doenças distribuídas aleatoriamente, a  
98 distribuição de Poisson é usada para o cálculo amostral, ao passo que no caso de distribuições  
99 agregadas, o parâmetro K da distribuição binomial negativa é o mais informativo (Michereff  
100 *et al.*, 2008; Michereff *et al.*, 2011).

101 A determinação do tamanho ideal de amostras para quantificação de doenças e suas  
102 amostragens têm sido estudadas em alguns patossistemas, entre eles a mancha aquosa em  
103 melão, causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Silva *et al.*, 2003), podridão-mole em  
104 alface e couve chinesa causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Jones  
105 (Silva *et al.*, 2008), queima das folhas em inhame, causada por *Curvularia eragrostidis* P.  
106 Henn. Meyer (Michereff *et al.*, 2008) e mancha de cercospora em pimentão, causada por  
107 *Cercospora capsici* (Michereff *et al.*, 2011).

108 Apesar da importância da podridão de saia em plantios de alface em todo o mundo,  
109 poucos estudos foram realizados até o momento envolvendo esta doença, principalmente em  
110 condições de clima tropical como o do Brasil. Não há dados sobre as perdas provocadas por  
111 esta doença em lavouras de alface no Brasil e no DF, apesar de serem frequentes os relatos de  
112 elevada incidência da podridão de saia, sobretudo em verões quentes e chuvosos.

113 Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o tamanho ideal de amostras a  
114 serem coletadas em campos de produção para a quantificação da podridão de saia em alface  
115 crespa em cultivos comerciais conduzidos no Distrito Federal.

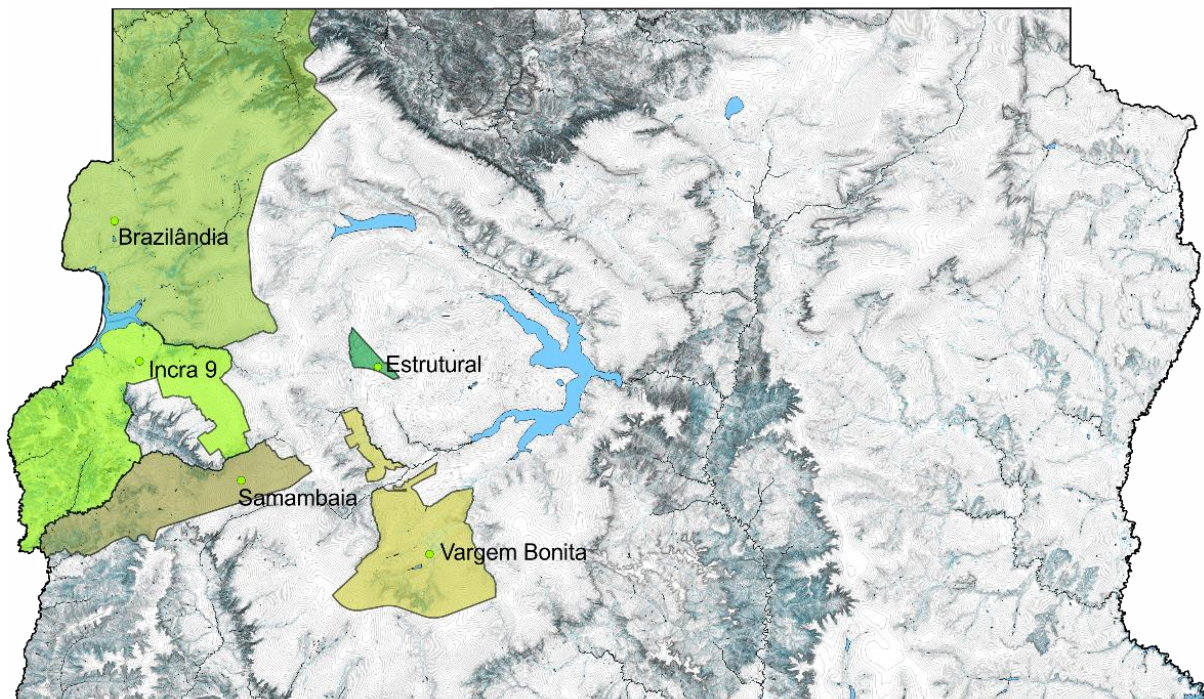
116

## 117 **2.4 – MATERIAIS E MÉTODOS**

118 Entre maio de 2017 a fevereiro de 2018 foram conduzidas amostragens da incidência  
119 da podridão de saia em alface crespa em 9 campos de produção espalhados em 5 grandes  
120 regiões produtoras de alface no Distrito Federal (Brazlândia, Estrutural, Vargem Bonita, Inca  
121 9 e Veredas) (Figura 2). As áreas foram escolhidas ao acaso em plantios comerciais e as  
122 plantas encontravam-se próximas ao estágio fenológico de colheita, aproximadamente 20 a 30  
123 dias após o transplântio. Todos os cultivos amostrados foram de condução em canteiros, com  
124 espaçamento de 25 cm entre linhas e 25 cm entre plantas. Em cada área foram demarcadas, ao  
125 acaso, 20 parcelas, onde cada parcela possuía 20 plantas. A incidência da podridão de saia foi  
126 estimada em cada parcela pela porcentagem de plantas com sintomas da doença em relação ao  
127 total de 20 plantas avaliadas/parcela, selecionadas ao acaso.

128 Os dados de incidência da podridão de saia, obtidos nas amostragens-piloto, foram  
129 utilizados na determinação dos tamanhos ideais das amostras baseado no arranjo espacial das  
130 plantas doentes e na confiabilidade pré-estabelecida (nível de erro aceitável), conforme  
131 metodologia descrita por Campbell & Madden (1990). O arranjo espacial foi determinado para  
132 cada área avaliada pelo índice de agregação de Lloyd (LIP), através da equação:  $LIP = \{ [ X$

133  $(S^2 / X ) 1\}}/X$  . Onde: X corresponde à incidência média da doença em 20 parcelas com 20  
134 plantas avaliadas/parcela e S2 à variância amostral. Valores de LIP menores, iguais ou  
135 maiores que 1,0 apontam para arranjos espaciais regular, aleatório ou agregado,  
136 respectivamente. A significância ( $P \leq 0,05$ ) dos valores observados foi determinada pelo teste  
137 de qui-quadrado, com (n-1) graus de liberdade.



138  
139 **Figura 2:** As 5 grandes regiões produtoras de alface do Distrito federal (Brazilândia, Incra 9, Estrutural, Vargem  
140 Bonita e Samambaia-Veredas) utilizadas neste estudo.

141 O tamanho das amostras (n) foi estabelecido para cada área avaliada pela equação:  
142  $n = (k + \bar{x}) / (\bar{x} \cdot k \cdot CV_{\bar{x}}^2)$ , onde k é o parâmetro que se associa à distribuição binomial  
143 negativa, descritiva do arranjo agregado de plantas doentes, sendo estimado como:  $k =$   
144  $\bar{x}^2 / (S^2 - \bar{x})$ , ao passo que  $CV_{\bar{x}}$  representa o coeficiente de variação da média, sendo os erros  
145 aceitáveis considerados de 5, 10 e 20% (= 0,05; 0,10; 0,20) (Campbell & Madden, 1990). A  
146 influência do número de plantas na área, dos níveis de incidência da podridão de saia e da  
147 intensidade de agregação (LIP) de plantas sintomáticas nos tamanhos das amostras, foi  
148 verificada através da análise de correlação de Pearson, ao nível de 5% de probabilidade.

149

## 150 **2.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

151 Após o levantamento da incidência da podridão de saia obtidos ao longo do  
152 experimento realizado nas cinco grandes áreas produtoras do Distrito Federal, os valores  
153 obtidos para o índice de Lloyd, em sua maioria, foram significativamente maiores que 1  
154 (considerando  $P \leq 0,05$ ) (Tabela 1). Demonstrando desta forma que o padrão de distribuição  
155 espacial da podridão de saia em alface crespa em campos de produção no Distrito Federal, se  
156 dá predominantemente de maneira agregada. Campbell & Maden (1990) relatam que  
157 patógenos de solo, em geral, possuem este tipo de distribuição, o que na prática, reflete em  
158 um campo com plantas sintomáticas em “reboleiras”.

159 As doenças e os patógenos de plantas estão associados a diferentes arranjos espaciais,  
160 que variam de um alto grau de agregação para aleatoriedade, e desta a regularidade. Sendo  
161 que este último caso, encontrado neste trabalho em propriedades na área de Samambaia, é  
162 considerada uma situação incomum em fitopatossistemas (Campbell & Madden, 1990).

163 Os valores de LIP, que correspondem neste estudo, a intensidade de agregação da  
164 podridão de saia em alface, se correlacionaram significativamente com o tamanho da amostra  
165 em alface, indicando que a metodologia proposta para determinação da quantidade ideal de  
166 amostras foi coerente ao ser considerado o arranjo do tipo agregado de plantas com sintomas  
167 de podridão de saia. Além disso, assim como os resultados obtidos por Kranz (1988) e  
168 Campbell & Madden (1990), os valores de correlações obtidos neste trabalho demonstraram  
169 que quanto maior a agregação de plantas doentes, maior deve ser o incremento do tamanho  
170 das amostras, considerando os erros aceitáveis de 5%, 10% e 20% (Tabela 1). A relação  
171 diretamente proporcional entre a intensidade de agregação de plantas doentes (LIP) e o  
172 tamanho das amostras coletadas em campo foi observada também em estudos realizados  
173 envolvendo o patossistema *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) em

174 plantios de alface do estado de Pernambuco – Brasil (Silva *et al.*, 2008). Considerando os  
 175 erros aceitáveis, a quantidade média de parcelas a serem amostradas para quantificação da  
 176 doença por hectare é de 378 parcelas para um erro de 5%, de 94 parcelas para um erro de 10%  
 177 e de 24 parcelas para um erro de 20%. (considerando em todos os casos, o levantamento de 20  
 178 plantas por parcela).

179 **Tabela 1:** Localidade das áreas amostradas indicando o total de plantas avaliadas por área, média e variância da  
 180 incidência, o padrão predominante de agregação da doença (LIP) e a quantidade ideal de plantas para  
 181 amostragens da incidência de podridão de saia em campos de produção de alface no Distrito Federal,  
 182 considerando erros aceitáveis de 5%, 10% e 20%.

Alface Crespa		Incidência			Arranjo	Binomial	Nº Parcelas/ha Erro Aceitável (%)		
Local	Nº Plantas	Média	Variância	LIP	Espacial	Negativa (k)	5	10	20
Brazlândia	12780	1,90	19,70	5,906034483	AGREGADO	0,20383061	2172	543	136
Vargem Bonita	4345	87,24	118,52	1,004110175	AGREGADO	243,2986662	6	2	0
Samambaia	9552	6,25	60,20	2,381052632	AGREGADO	0,724085366	616	154	39
Incra 9	32880	37,00	599,31	1,410745321	AGREGADO	2,434598639	175	44	11
Incra 9	32736	61,77	497,58	1,114203519	AGREGADO	8,756297605	52	13	3
Incra 9	23000	57,20	329,33	1,083174401	AGREGADO	12,02292994	40	10	3
Samambaia	21636	99,03	29,03	0,992862524	REGULAR	-140,1055448	1	0	0
Samambaia	14060	99,00	30,00	0,992959902	REGULAR	-142,0434783	1	0	0
Estrutural	14544	28,39	675,65	1,803221849	AGREGADO	1,244986053	335	84	21
<b>Média</b>		<b>53,09</b>					<b>378</b>	<b>94</b>	<b>24</b>

183  
 184 Amostrar toda uma população durante um experimento em muitos casos é inviável,  
 185 levando-se em consideração as limitações de mão de obra técnica, os recursos financeiros e a  
 186 disponibilidade de tempo para execução do trabalho (Holderness, 2002; Cargnelutti Filho *et*  
 187 *al.*, 2009). Quanto maior a precisão que se pretende obter, maior será o número de parcelas a  
 188 serem avaliadas. Sendo assim, a precisão da estimativa e da dimensão da amostra devem ser  
 189 escolhidas por cada pesquisador, pois o tamanho ideal da amostra dependerá do erro mínimo  
 190 aceitável em todas as situações, bem como das questões de trabalho e recursos financeiros  
 191 disponíveis (Michereff *et al.*, 2011; Toebe *et al.*, 2011; Stürmer *et al.*, 2013). Portanto,

192 recomenda-se trabalhar com um erro de 20%, que é considerado aceitável em levantamentos  
193 fitopatológicos regionais (Silva *et al.*, 2008; Sari *et al.*, 2016).

194 Não foram encontradas correlações significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tamanhos das  
195 amostras para cada erro considerado aceitável e a incidência média da doença. Esta ausência  
196 de correlação foi constatada também por Andrade e colaboradores (2000) e Tavares e  
197 colaboradores (2000). Além disso, assim como constatado por Madden *et al.* (1995) e  
198 Michereff (1998), não houve também correlações significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre a média das  
199 incidências e o grau de agregação de plantas doentes (LIP). No entanto, podem ocorrer  
200 mudanças nos padrões do arranjo espacial com o decorrer do tempo ou no desenvolver da  
201 cultura da alface, levando em consideração que estas mudanças podem estar relacionadas com  
202 o decréscimo ou aumento da quantidade de inóculo, alterações na susceptibilidade da  
203 hospedeira ou por mudanças na supressividade dos fatores ambientais na evolução da doença  
204 (Campbell *et al.*, 1984).

205 Uma das características básicas a serem levadas em consideração para planos de  
206 amostragem envolvendo qualquer patógeno é o fato de que os dados obtidos dos locais  
207 analisados sejam representativos do que poderia ocorrer em outros campos de produção  
208 (Campbell & Madden, 1990). Neste sentido, considerando que foram realizadas amostragens  
209 em diferentes épocas do ano e em diferentes propriedades do Distrito Federal, os resultados  
210 obtidos neste estudo servem como base para futuros levantamentos epidemiológicos da  
211 podridão de saia em alface crespa em plantios localizados nesta unidade da federação ou em  
212 outras regiões com condições climáticas semelhantes.

213

## 214 **2.4 – AGRADECIMENTOS**

215 Ao CNPq, Capes e FAP-DF pelos auxílios financeiros prestados para o  
216 desenvolvimento desta pesquisa;

217 Ao Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças (CNPB) – EMBRAPA Hortaliças  
218 pela estrutura física de trabalho cedida e aos Engenheiros Agrônomos Claudinei Vieira,  
219 Sérgio Rufino Maciel e Maíra Teixeira Andrade da EMATER-DF, por prestarem auxílios  
220 durante as visitas técnicas em campos de produção de alface no Distrito Federal.

221

## 222 **2.4 – REFERÊNCIAS**

223 ANDRADE, DEGT.; MICHEREFF, SJ. 2000. Incidência da murcha-de-fusário do  
224 tomateiro no Agreste de Pernambuco e determinação do tamanho da amostra para  
225 quantificação da doença. Fitopatologia Brasileira, v.25. p.36-41.

226 BLANCARD, D; LOT, H; MAISONNEUVE, B. 2006. A Colar Atlas of Disases of  
227 Lettuce and Related Salada Crops, Observation, Biology and Control. San Diego, Academic  
228 Press, 375pp.

229 BLOK, I.; PLAATS-NITERIK, AJ. Van Der,. 1978. *Pythium uncinulatum* sp. nov.  
230 and *P. tracheiphilum* pathogenic to lettuce. Neth. J. PI. Path. 84: 135-147.

231 CAMPBELL, CL; JACOBI, WR; POWELL, NT; MAIN, CE. 1984. Analysis of  
232 disease progression and the randomness of occurrence of infected plants during tobacco black  
233 shank epidemics. Phytopathology, 74(2), 230-235.

234 CAMPBELL, CL.; MADDEN, LV. 1990. Introduction to Plant Disease  
235 Epidemiology. New York: John Wiley, 1990. 532p

236 CARGNELUTTI FILHO, A; EVANGELISTA, DHR; GONÇALVES, ECP;  
237 STORCK, L. 2009. Tamanho de amostra de caracteres de genótipos de soja. Ciência Rural,  
238 39(4), 983-991.

239 CATAPATTI, TR; GONÇALVES, MC; SILVA NETO, MR; SOBROZA, R. 2008.  
240 Tamanho de amostra e número de repetições para avaliação de caracteres agronômicos em  
241 milho-pipoca. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(3), 855-862.

242 DAVIS, RM; SUBBARAO, KV; RAID, RN; KURTZ, EA. 1997. *Compendium of*  
243 *Lettuce Diseases*. St. Paul, APS Press, p.01-08.

244 HOLDERNESS, M. 2002. *Surveys and sampling*. In: Waller, JM; Lenné, JM; Waller,  
245 S.J. (Ed.) *Plant Pathologist's Pocketbook*. Wallingford: CAB International, p.19-24.3. ed.

246 KRANZ, J. 1988. *Measuring plant disease*. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. (Ed.).  
247 *Experimental techniques in plant disease epidemiology*. Heidelberg: Springer-Verlag. p.35-  
248 50.

249 LÍCIO, ADC; VIEIRA NETO, J; CHIARADIA, L. A; STORCK, L. 2009.  
250 *Distribuição espacial e tamanho de amostra para o ácaro-do bronzeado da erva-mate*. *Revista*  
251 *Árvore*, 33(1), 145-150.

252 MADDEN, LV; NAULT, LR; MURRAL, DJ; APELT, M.R. 1995. *Spatial pattern*  
253 *analysis of the incidence of aster yellows disease in lettuce*. *Population Ecology*, 37(2), 279-  
254 289.

255 MICHEREFF, SJ. 1998. *Queima das folhas do inhame: quantificação, levantamento*  
256 *da intensidade e dinâmica espaço-temporal*. Universidade Federal de Viçosa. (Ph.D thesis).

257 MICHEREFF, SJ; MARTINS, RB; NORONHA, M; MACHADO, LP. 2011. *Sample*  
258 *size for quantification of cercospora leaf spot in sweet pepper*. *Journal of Plant Pathology*, v  
259 .93, p. 183-186.



260 MICHEREFF, SJ; NORONHA, MA; MAFFIA, LA. 2008. Tamanho de amostras para  
261 avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. *Summa Phytopathologica* v. 34, n.  
262 2, p. 189-191.

263 RAID, RN. Soft rot of lettuce. 1997. In: Davis, RM.; Subbarao, KV.; Raid, RN.;  
264 Kurtz, E.A. (Ed.). *Compendium of Lettuce Diseases*. St. Paul: APS Press. p.30-31.

265 REN, J; PETZOLDT, R; DICKSON, M.H. 2001. Genetics and population  
266 improvement of resistance to bacterial soft rot Chinese cabbage. *Euphytica*, v.117, n.3, p.197-  
267 207.

268 SARI, G; LÚCIO, ADC; COSTA, IFDD; RIBEIRO, ALDP. 2016. Sample size for  
269 assess the leaf blast severity in experiments with irrigated rice. *Revista Caatinga*, 29(4), 822-  
270 831.

271 SILVA, AMF; MICHEREFF, SJ; MARIANO, RDL. R; SILVA, AJD. 2008. Tamanho  
272 de amostras para quantificação da podridão-mole da alface e da couve-chinesa. *Summa*  
273 *Phytopathologica*, 34(1), 90-92.

274 SILVA, EI; MARIANO, RL; MICHEREFF, SJ; SALES, RJ; OLIVEIRA, IS. 2003.  
275 Levantamento da incidência da mancha-aquosa do melão no Rio Grande do Norte e  
276 determinação do tamanho das amostras para quantificação da doença. *Summa*  
277 *Phytopathologica*, 29(2), 173. (resumo).

278 STONE, GE.; SMITH, RE. 1900. The rotting of greenhouse lettuce. *Mass. Agric. Exp.*  
279 *Stn. Bull.* 69.

280 STORCK, L; GARCIA, DC; LOPES, SJ; ESTEFANEL, V. 2000. *Experimentação*  
281 *Vegetal*. Santa Maria: UFSM.

282           TAKASHI, N; TADAO, U. 1978. Ecological and morphological characteristics of the  
283 sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kühn produced in soil. Soil Biology and Biochemistry, 10(6),  
284 471-478.

285           TAVARES, LA; MICHEREFF, SJ.; Souza, RM.; Mariano, RLR. 2000. Plano de  
286 amostragem para quantificação da murcha bacteriana do tomateiro no campo. Summa  
287 Phytopathologica. v.26, n.3, p.306-310.

288           TOWNSEND, GB. 1934. Bottom rot of lettuce. New York (Cornell) Agr. Expt. Sta.  
289 Mem. 158.

# CAPÍTULO 3

---

**Etiologia e Prevalência da podridão de saia em alface no Distrito Federal**

### 3 – ETIOLOGIA E PREVALÊNCIA DA PODRIDÃO DE SAIA EM ALFACE NO DISTRITO FEDERAL

#### 3.1 - RESUMO

A podridão de saia frequentemente tem acometido plantios de alface no Distrito Federal (DF). Para o manejo de doenças, é imprescindível o conhecimento de aspectos epidemiológicos como: intensidade e frequência da doença e etiologia do agente causal. O objetivo deste trabalho foi estudar a prevalência da podridão de saia no DF e caracterizar a nível molecular isolados associados a esta doença. Foram amostradas cinco grandes áreas produtoras de alface no DF. A incidência em cada área foi calculada pela porcentagem de plantas com sintomas da podridão de saia em relação ao total de plantas sadias. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o DF, na totalidade das áreas avaliadas, possui grande prevalência desta doença em campo (47,8%) sendo que a grande área Incra 9 foi a que teve maior prevalência (81,4%). Foram obtidos isolados dos gêneros *Rhizoctonia* (analisados com base na região ITS) e *Pythium* (analisados com base na região COX II). Dentro do gênero *Rhizoctonia* foram detectados 4 grupos de anastomose (AGs): AG1-IB, AG4-HGI, AG4-HGIII e AG-A. E dentre os isolados de *Pythium* foram detectadas quatro espécies: *P. sylvaticum*, *P. tracheiphilum*, *P. nodosum* e *P. ultimum*. Todos os representantes dos AGs de *Rhizoctonia* e das espécies de *Pythium* encontrados nesta pesquisa e testados *in vitro* foram patogênicos em folhas de alface. Dentro do conhecimento adquirido ao longo deste trabalho, esta é a primeira vez que os grupos AG4-HGI, AG4-HGIII e AG-A estão sendo relatados a nível nacional causando podridão da saia em alface, bem como os grupos AG-A e AG4-HGIII à nível mundial causando esta doença em alface. As espécies *P. tracheiphilum*, *P. sylvaticum* e *P. nodosum* não haviam sido detectadas no Brasil e este estudo constitui os respectivos primeiros relatos. Estas informações podem servir como base para um melhor planejamento das

estratégias de controle e/ou estudos epidemiológicos envolvendo esta importante doença que vem acometendo todos os campos de cultivo de alface no Distrito Federal.

**Palavras-chave:** Podridão da saia; alface; *Pythium*; *Rhizoctonia solani*, *Lactuca sativa*.

## **Etiology and prevalence of bottom rot of lettuce in the Federal District**

### **3.2 - ABSTRACT**

Bottom rot has frequently affected lettuce crops in the Brazilian Federal District (DF). For the management of diseases, knowledge of epidemiological aspects such as: intensity and frequency of the disease and etiology of the causal agent is essential. The aim of this work was to study the prevalence of bottom rot in the DF and to characterize at the molecular level isolates associated with this disease. Five large lettuce producing areas in the DF were sampled. The incidence in each area was calculated by the percentage of plants with symptoms of bottom rot in relation to the total of healthy plants. The results demonstrated that all the assessed areas in DF presented a high disease prevalence in the field (47.8%) and that the large area Incra 9 was the one with the highest prevalence (81.4%). Isolates of the genera *Rhizoctonia* (analyzed with basis on the ITS region) and *Pythium* (analyzed with basis on the COX II region) were obtained. Within the *Rhizoctonia* genus, 4 anastomosis groups (AGs) were detected: AG1-IB, AG4-HGI, AG4-HGIII and AG-A. Among the *Pythium* isolates, four species were detected: *P. sylvaticum*, *P. tracheiphilum*, *P. nodosum* and *P. ultimum*. All representative *Rhizoctonia* AGs and *Pythium* species tested *in vitro* found in this research were pathogenic in lettuce leaves. To the author's knowledge, this is the first time that the groups AG4-HGI, AG4-HGIII and AG-A are reported at the national level causing bottom rot in lettuce. Furthermore, this is the first worldwide report of groups AG-A and AG4 -HGIII causing this disease in lettuce. The species *P. tracheiphilum*, *P. sylvaticum* and *P. nodosum* had not been detected to date in Brazil, and this study constitutes each respective first reports. This information serves as a basis for better planning of control strategies and/or epidemiological studies involving this important disease that affects all lettuce fields in the Federal District.

**Keywords:** Bottom rot; Lettuce; *Pythium*; *Rhizoctonia solani*, *Lactuca sativa*.

### 3.3 - INTRODUÇÃO

O Distrito Federal – Brasil abriga um importante cinturão verde responsável por produzir hortaliças de qualidade que abastecem tanto o mercado interno quanto o de outros estados brasileiros, gerando diversos empregos ao longo de toda a cadeia produtiva (EMATER-DF 2009; EMATER-DF, 2016). Dentre as hortaliças cultivadas no DF, a alface possui uma área de produção de 1.261,05 ha e produção de 26.238,58 ton, o que corresponde a 10,55% da produção de hortaliças (EMATER-DF, 2014).

As doenças causadas por fitopatógenos provocam grandes prejuízos na produção de alface. Mais de 75 doenças são conhecidas nesta cultura, causadas por diversos agentes etiológicos que podem ser de origem bacteriana, viral, nematológica ou fúngica (Blancard *et al.*, 2006), sendo a podridão de saia uma das mais comuns em plantios de alface (Wareing *et al.*, 1986; Grosch *et al.*, 2004). A etiologia desta doença é complexa, envolvendo diversos patógenos, sobretudo *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomofa *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] e *Pythium* spp. (Claerbout *et al.*, 2019). Os sintomas característicos são lesões que tem colorações que variam em tons de marrom, sobretudo na porção central do limbo foliar (nervura central). Com a evolução da doença, os vasos das folhas são colonizados e colapsados, acentuando as lesões necróticas no limbo, promovendo uma aparência de folha queimada. Prejudicando diretamente o produto comercial, com grandes prejuízos econômicos (Takashi & Ui, 1978; Davis *et al.*, 1987; Blancard *et al.*, 2006;). Apesar de relatos frequentes de produtores e extensionistas da ocorrência da podridão de saia no DF, um levantamento de prevalência da doença em plantios de alface, ou um estudo sistemático de associação dos agentes causais descritos para essa doença, ainda não foram realizados.

De maneira geral, o controle de doenças veiculadas pelo solo, como a podridão de saia, baseia-se em medidas preventivas, considerando-se sempre um manejo integrado (Krause-Sakate *et al.*, 2010). No entanto, alguns aspectos epidemiológicos fundamentais

devem ser levados em consideração para traçar um plano de controle adequado, como: a incidência da doença no campo e a correta caracterização dos agentes causais. Estudos de quantificação são essenciais para comparar tratamentos, descrever padrões de epidemias no tempo e no espaço, determinar relações entre níveis de doença e perdas de rendimento, entender a prevalência em uma área, assim como para promover manejo adequado visando a prevenção ou redução das perdas de produção no campo. Neste sentido, os estudos envolvendo quantificação de doenças são tão importantes quanto a própria diagnose, uma vez que não teria tanta serventia o conhecimento da etiologia de uma doença caso não fosse possível estimar a quantidade de doença que pode levar a perdas significativas na produção (Amorim & Bergamim Filho, 2018)

Antigamente, os fitopatógenos de origem fúngica eram identificados somente com base nos caracteres morfológicos (geralmente estruturas reprodutivas), o que levava a alguns erros por estas características serem variáveis e plásticas, na maioria dos casos. Por exemplo, características morfológicas dos fungos fitopatogênicos variam de acordo com suas hospedeiras e com as condições ambientais em que se encontram. Ademais, a formação de corpos de frutificação raramente é observada em muitos desses fungos, dificultando seu estudo preciso, resultando em uma proliferação desordenada de gêneros assexuais polifiléticos (Hyde *et al.*, 2014).

Atualmente o conceito de grupos de anastomose (AG) é utilizado para classificar os isolados de *Rhizoctonia*. São conhecidos 14 grupos de anastomose (AGs). Esta classificação consiste em juntar ou separar isolados geneticamente semelhantes com base no contato entre suas hifas. Quando ocorre a fusão destas, com troca citoplasmática e de núcleos, os isolados testados são agrupados no mesmo AG. Ao passo que, isolados que não apresentam fusão de hifas nestas condições, são considerados membros de distintos AGs (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018).



Entretanto, o uso de AGs leva a resultados frequentemente difíceis de serem interpretados no processo de fusão de hifas, dificultando o processo de identificação. Fatores nutricionais ou de condições ambientais podem estar associados a estes erros. Além disso, este método de classificação não especifica detalhes de variantes genéticas ou a relação entre e dentro de cada um dos AGs (Parmeter *et al.*, 1969; Hyakumachi & Ui, 1987; Sneh *et al.*, 1991; Carling, 1996).

Quanto ao gênero *Pythium*, a taxonomia tradicional para classificação das espécies, leva em conta critérios morfológicos como: forma de esporângios; ornamentação superficial do oogônio; o espaço interno do oogônio preenchido pelo óosporo; origem e modo de ligação do anterídio ao oogônio; e a presença de espessamento de hifas (Van der Plaats-Niterink, 1981).

Apesar da importância dos estudos de morfologia para identificação de espécies dos gêneros *Rhizoctonia* e *Pythium*, atualmente também são considerados outros fatores como prioritários para correta caracterização desses patógenos. Nos últimos 25 anos, estudos taxonômicos passaram a ter maior precisão por conta do surgimento da biologia molecular, em especial os estudos envolvendo o DNA, que contém uma imensa fonte de informações de alta confiabilidade que revolucionou a micologia (Nilsson *et al.*, 2004).

Considerando a importância dos estudos de quantificação da doença em campo e de uma melhor precisão na caracterização dos agentes causais de uma doença, esta pesquisa teve como objetivos calcular a prevalência da podridão de saia, investigar aspectos envolvidos na patogenicidade e caracterizar a nível de DNA os agentes causais envolvidos nesta doença em campos de produção de alface crespa no Distrito Federal – Brasil.

### **3.4 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.4.1 - PREVALÊNCIA DA DOENÇA**

Entre maio de 2017 a maio de 2019 foram conduzidas amostragens da incidência da podridão de saia em alface crespa em 5 grandes regiões produtoras de alface no Distrito Federal: Brazlândia, Estrutural, Vargem Bonita, Ceilândia (Incra 9) e Samambaia (Veredas). No total, foram realizadas 91 visitas técnicas em 44 propriedades, sendo: 7 pertencentes à região de Samambaia, quatorze à Vargem Bonita, seis à Brazlândia, nove à Estrutural e oito ao Incra 9.

Os cultivos de alface tinham como características a condução em canteiros, com espaçamento de 25 cm entre linhas e 25 cm entre plantas. Com base em estudos prévios, os levantamentos basearam-se na quantidade de 24 parcelas/ha, que considera um erro de 20% (vide Capítulo 2). Parcelas de 20 plantas foram demarcadas ao acaso e as avaliações foram sempre efetuadas em plantas que se encontravam próximas ao ponto de colheita. A incidência da podridão de saia foi estimada pela porcentagem de plantas com sintomas em relação ao total de plantas avaliadas. Foram estimadas a prevalência da doença de modo generalizado, ao nível do DF; em cada uma das cinco grandes áreas avaliadas e na totalidade das épocas de chuva e épocas de seca, considerando todas as grandes áreas visitadas durante o experimento. A comparação da prevalência da doença entre as grandes áreas foi feita realizada com base nos testes de Kruskal-Wallis e no teste de Nemenyi ( $P \leq 0,05$ ).

Foi produzido memorial fotográfico da área com maior incidência da doença assim como levantamento e mapeamento dos índices acumulados de chuvas no Distrito Federal. Para isto, foram obtidos os dados de 54 estações pluviométricas pertencentes à Agência Nacional de Águas – ANA (Ministério do Desenvolvimento), levando-se em consideração o período que foram realizadas as amostragens de campo neste estudo. O manuseio dos dados

para plotagem da figura que representa a chuva acumulada no DF foi realizado com o auxílio do software SURFER® (Golden Software, Inc.).

### **3.4.2 - OBTENÇÃO DOS ISOLADOS**

As folhas sintomáticas da saia da alface, obtidas em campo, foram utilizadas para isolamento dos agentes causais da doença. O isolamento foi realizado no laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA Hortaliças. As folhas foram lavadas com água corrente e posteriormente desinfestadas com álcool 70%. Em seguida foi realizado o isolamento indireto dos agentes causais. Para cada porção destacada da folha, duas placas de Petri foram utilizadas, uma contendo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) + Tetraciclina (30mg/L) para isolar *Rhizoctonia* e outra contendo meio seletivo (PARP+benomyl) composto por suco V8 (900mL de água destilada, 100mL de suco V8, 3g de CaCO<sub>3</sub> e 18g de ágar) + um mix dos fungicidas Pimaricina, PCNB e benomil e dos antibióticos ampicilina e rifampicina para isolar oomicetos (Masago *et al.*, 1977)

O mix de fungicidas e antibióticos era composto de: Benomyl (40 mg\L) (E. I. duPont De Nemours, Inc. Wilmington, DE), Ampicilina (100mg\L) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), Rifampicina (10 mg\L) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e Pentacloronitrobenzeno PCNB (30 mg\L) (Uniroyal Chemical Co. Naugatuck, CT) (Masago *et al.*, 1977).

Vinte e quatro horas depois do isolamento, as placas foram avaliadas e culturas puras foram obtidas utilizando-se pontas de hifas. Foram obtidos o total de 59 isolados com morfologia comum ao gênero *Rhizoctonia*, e 14 isolados com morfologia comum ao gênero *Pythium*. Todos os isolados de *Rhizoctonia* foram preservados utilizando criopreservação a -80 °C em glicerol 35% e também conforme metodologia de Castellani (1939). Os isolados de *Pythium* foram preservados pelo método Castellani e em óleo mineral (Erwin & Ribeiro, 1996).

### **3.4.3 - EXTRAÇÃO DE DNA**

Após o cultivo dos isolados foi realizado a extração de DNA. Uma porção de micélio aéreo foi retirada de cada placa e o DNA genômico foi extraído segundo metodologia de Boiteux *et al.* (1999). As concentrações de DNA foram estimadas visualmente através de eletroforese utilizando gel de agarose a 1,5% comparando a intensidade das bandas com o marcador de DNA 1kb (Axygen).

### **3.4.4 - AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS REGIÃO GENÔMICAS**

Os primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990) foram utilizados para amplificar os fragmentos do rDNA-ITS do DNA genômico dos isolados de *Rhizoctonia* e os primers PF34 (5'-GGCAAATGGGTTTTCAAGATCC-3') e PF35 (5'-CCATGATTAATACCACAAATTTCACTAC – 3') (Hudspeth *et al.*, 2000) foram utilizados para amplificar o fragmento de DNA da região COX II. As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 50 µL, contendo: 39,25 µL de água Milli-Q, 5 µL de PCR buffer 10x, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de dNTP (Invitrogen™), 1 µL de cada primer, 0,25 µL Taq polimerase (Invitrogen™) e 1 µL de DNA genômico. As reações foram realizadas em um termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (BIORAD). As amplificações para a região ITS de *Rhizoctonia* foram feitas mediante auxílio de um termociclador Veriti 96-well ThermalCycler, Applied Biosystems com um ciclo de pré-PCR a 94°C por 5 min, seguido de desnaturação inicial a 94° por 1 min, anelamento a 55°C para ITS e extensão a 72°C por 2 min, em um total de 40 ciclos, com extensão final a 72°C por 7 min após o último ciclo (Villa *et al.*, 2006). Para COX II o ciclo consistiu em 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 52°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, e por fim, um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram separados em eletroforese utilizando gel de agarose a 1,5% em 1.0x Tris-Acetato ácido EDTA (TAE)

utilizando gel red foram revelados e fotografados no fotodocumentador L-Pix Touch Locus® (Locus do Brasil). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit Wizard kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) conforme protocolo indicado pelo fabricante. Os sequenciamentos foram realizados pela empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul).

### 3.4.5 - ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Todas as análises iniciais como, montagem das sequências e alinhamentos, foram realizadas no software Geneious prime 2020 (Drumon *et al.*, 2011). As sequências de ITS e COX II inicialmente foram analisadas e quando necessário, foram utilizados ajustes manuais no alinhamento. O método de análise de inferência Bayesiana (IB), foi utilizado para calcular a distância das árvores (Archibald *et al.*, 2003). O programa MEGA 6.0 foi utilizado para realizar a seleção do modelo mais adequado segundo critério Bayesian Information Criterium (BIC).

As sequências do estudo foram comparadas com sequências de referências obtidas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) para o gênero *Pythium* e para o gênero *Rhizoctonia*. Fazer tabela das referencias (Tabela 2).

**Tabela 2:** Acessos do GenBank utilizados para as análises filogenéticas deste estudo.

Patógeno	Acessos do Genbank para a região ITS	Patógeno	Acessos do Genbank para a região COX II
<i>Ceratobasidium ramicola</i>	AJ427404.1	<i>Achlya ambisexualis</i>	AF086687.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	DQ279055.1	<i>Globisporangium acanthophoron</i>	KJ595376.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	EF679778.1	<i>Globisporangium intermedium</i>	AB507410.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	HF948018.1	<i>Globisporangium marsipium</i>	KJ595401.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	HM623628.1	<i>Globisporangium orthogonon</i>	KJ595379.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	HM623632.1	<i>Globisporangium paroecandrum</i>	DQ071391.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	HQ270170.1	<i>Globisporangium spinosum</i>	KJ595366.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	JQ688058.1	<i>Globisporangium splendens</i>	AB512921.1
<i>Rhizoctonia</i> sp.	JQ859870.1	<i>Globisporangium ultimum</i> var. <i>sporangiferum</i>	KJ595357.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ668953.1	<i>Globisporangium ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	KJ595382.1

<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ668981.1	<i>Lagenidium caudatum</i>	AF290309.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	KR259886.1	<i>Phytophthora undulata</i>	KJ595348.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	MH231252.1	<i>Phytophythium boreale</i>	EF408876.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	MK828396.1	<i>Phytophythium carbonicum</i>	AB690678.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	MN120901.1	<i>Phytophythium chamaehyphon</i>	AB257280.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	MN120902.1	<i>Phytophythium citrinum</i>	AB690679.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	MN120903.1	<i>Phytophythium delawarensense</i>	KJ595430.1
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	AB122137.1	<i>Phytophythium helicoides</i>	DQ071377.1
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	AB122139.1	<i>Phytophythium litorale</i>	KJ595418.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	AB196640.1	<i>Phytophythium megacarpum</i>	AB690665.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	AB196653.1	<i>Phytophythium mercuriale</i>	AB690666.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	AB286934.1	<i>Phytophythium montanum</i>	KJ595410.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	AF354092.1	<i>Phytophythium oedochilum</i>	AB108011.1
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	AF354116.1	<i>Phytophythium ostracodes</i>	AB690668.1
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	AJ238166.1	<i>Phytophythium vexans</i>	GU133518.1
<i>Athelia rolfsii</i>	AY684917.1	<i>Pythium abappressorium</i>	KJ595409.1
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	DQ102449.1	<i>Pythium acanthicum</i>	KJ595380.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492100.2	<i>Pythium acrogynum</i>	AB362324.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	KC782936.1	<i>Pythium adhaerens</i>	KJ595386.1
<i>Ceratobasidium</i> sp.	KC782941.1	<i>Pythium afertile</i>	KJ595440.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF712285.1	<i>Pythium amasculinum</i>	KJ595390.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF907717.1	<i>Pythium anandrum</i>	AB362328.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF907732.1	<i>Pythium angustatum</i>	KJ595387.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF907733.1	<i>Pythium aphanidermatum</i>	KJ595344.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AB054850.1	<i>Pythium apiculatum</i>	KJ595422.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AB054863.1	<i>Pythium apleroticum</i>	KJ595400.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AB054866.1	<i>Pythium aquatile</i>	KJ595355.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AB054872.1	<i>Pythium arrhenomanes</i>	AKXY02053172.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AB054878.1	<i>Pythium attrantheridium</i>	AB512889.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AB547379.1	<i>Pythium buismaniae</i>	KJ595368.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AB828197.1	<i>Pythium camurandrum</i>	KJ595433.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AB911322.1	<i>Pythium canariense</i>	JX397983.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AF153780.1	<i>Pythium capillosum</i>	KJ595360.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AF308622.1	<i>Pythium carolinianum</i>	KJ595427.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AF308624.1	<i>Pythium catenulatum</i>	KJ595404.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AF308627.2	<i>Pythium cederbergense</i>	JQ412805.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AF308628.2	<i>Pythium chondricola</i>	KJ595354.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AF308630.1	<i>Pythium coloratum</i>	KJ595346.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AF308631.2	<i>Pythium conidiophorum</i>	KJ595361.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AF478449.1	<i>Pythium contiguanum</i>	KJ595358.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AF478452.1	<i>Pythium cryptoirregulare</i>	GU071763.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AF479016.1	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	AB690680.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AY387556.1	<i>Pythium cylindrosporium</i>	GU071762.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	AY387557.1	<i>Pythium cystogenes</i>	KJ595396.1

<i>Rhizoctonia solani</i>	DQ355141.1	<i>Pythium debaryanum</i>	KJ595399.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	DQ355142.1	<i>Pythium deliense</i>	KJ595372.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	DQ356410.1	<i>Pythium diclinum</i>	KJ595394.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	DQ356411.1	<i>Pythium dimorphum</i>	AB362331.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	DQ356413.1	<i>Pythium dissimile</i>	KJ595347.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	EU730796.1	<i>Pythium dissotocum</i>	KJ595351.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	EU730800.1	<i>Pythium echinulatum</i>	AB362327.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	EU730801.1	<i>Pythium emineosum</i>	KJ595432.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	EU730865.1	<i>Pythium erinaceum</i>	AB362326.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ480880.1	<i>Pythium flevoense</i>	KJ595363.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ480889.1	<i>Pythium glomeratum</i>	KJ595424.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ480891.1	<i>Pythium graminicola</i>	AF196593.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ480911.1	<i>Pythium grandisporangium</i>	KJ595367.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ480923.1	<i>Pythium helicandrum</i>	AB362329.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ480927.1	<i>Pythium heterothallicum</i>	AB512919.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ480931.1	<i>Pythium hydnosporum</i>	KJ595364.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492074.2	<i>Pythium hypogynum</i>	AB362325.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492085.2	<i>Pythium inflatum</i>	KJ595352.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492099.3	<i>Pythium insidiosum</i>	KJ595391.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492100.2	<i>Pythium irregulare</i>	GU071760.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492101.3	<i>Pythium iwayamai</i>	JX397979.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492105.2	<i>Pythium kashmirensis</i>	KJ595429.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492108.2	<i>Pythium kunmingense</i>	KJ595389.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492109.3	<i>Pythium longandrum</i>	KJ595413.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492126.3	<i>Pythium longisporangium</i>	KJ595426.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	FJ492158.3	<i>Pythium lucens</i>	KJ595415.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	HM044763.1	<i>Pythium lutarium</i>	KJ595359.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	HQ898670.1	<i>Pythium lycopersicum</i>	KJ595343.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	HQ898735.1	<i>Pythium macrosporum</i>	AB512916.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	HQ898763.1	<i>Pythium marinum</i>	KJ595398.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ311915.1	<i>Pythium mastophorum</i>	KJ595378.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ343829.2	<i>Pythium megalacanthum</i>	KJ595435.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ343830.1	<i>Pythium middletonii</i>	AB362318.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ616854.1	<i>Pythium minus</i>	AB362320.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ616859.1	<i>Pythium monospermum</i>	KJ595350.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ616863.1	<i>Pythium multisporum</i>	AB362319.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ669932.1	<i>Pythium myriotylum</i>	KJ595365.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ669933.2	<i>Pythium nagaii</i>	KJ595402.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ676917.1	<i>Pythium nodosum</i>	KJ595407.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ676920.1	<i>Pythium nunn</i>	AF196609.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ812797.1	<i>Pythium okanoganense</i>	KJ595373.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JQ812805.1	<i>Pythium oligandrum</i>	KJ595381.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JX843818.1	<i>Pythium oopapillum</i>	KJ595431.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	JX914627.1	<i>Pythium ornacarpum</i>	KJ595411.1

<i>Rhizoctonia solani</i>	KC413984.1	<i>Pythium ornamentatum</i>	KJ595428.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KC997789.1	<i>Pythium pachycaule</i>	KJ595362.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KC997792.1	<i>Pythium paddicum</i>	JX397982.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF542846.1	<i>Pythium parvum</i>	AB362322.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF542851.1	<i>Pythium periplocum</i>	KJ595369.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF542859.1	<i>Pythium perplexum</i>	KJ595395.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF542861.1	<i>Pythium phragmitis</i>	AJ890351.2
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF542868.1	<i>Pythium pleroticum</i>	AB362321.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF746162.1	<i>Pythium plurisporium</i>	KJ595405.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF746163.1	<i>Pythium polare</i>	KJ595417.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF870907.1	<i>Pythium polymastum</i>	KJ595403.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF870910.1	<i>Pythium porphyrae</i>	KJ595377.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF870931.1	<i>Pythium prolatum</i>	AB362330.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF870936.1	<i>Pythium pyrlobum</i>	KJ595349.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF870940.1	<i>Pythium radiosum</i>	KJ595356.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF907724.1	<i>Pythium recalcitrans</i>	KJ595423.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF907726.1	<i>Pythium rhizo-oryzae</i>	KJ595420.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF907730.1	<i>Pythium rhizosaccharum</i>	AB362323.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF907731.1	<i>Pythium rostratifingens</i>	KJ595416.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF907734.1	<i>Pythium rostratum</i>	KJ595388.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF907735.1	<i>Pythium salinum</i>	KJ595414.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF907736.1	<i>Pythium salpingophorum</i>	KJ595384.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF914419.1	<i>Pythium schmitthenneri</i>	JF895530.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ577141.1	<i>Pythium scleroteichum</i>	KJ595370.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ669101.1	<i>Pythium segnitium</i>	KJ595412.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ716787.1	<i>Pythium selbyi</i>	JF895532.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ777580.1	<i>Pythium senticosum</i>	AB362317.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ777637.1	<i>Pythium solare</i>	KJ595421.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ777643.1	<i>Pythium sp. CAL-2011f</i>	KJ595406.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ866417.1	<i>Pythium sp. rooibos 2</i>	JQ412783.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ866420.1	<i>Pythium sp. rooibos 2</i>	JQ412813.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KJ866432.1	<i>Pythium spiculum</i>	KJ595425.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KM013471.1	<i>Pythium stipitatum</i>	KJ595437.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KM488563.1	<i>Pythium sukuense</i>	KJ595408.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KM488565.1	<i>Pythium sulcatum</i>	KJ595393.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KM659188.1	<i>Pythium sylvaticum</i>	KJ595383.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KP411232.1	<i>Pythium takayamanum</i>	AB362315.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KP723333.1	<i>Pythium tardicrescens</i>	KJ595439.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KP736174.1	<i>Pythium torulosum</i>	KJ595374.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KP736178.1	<i>Pythium tracheiphilum</i>	KJ595375.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KP736189.1	<i>Pythium uncinulatum</i>	KJ595385.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KP736197.1	<i>Pythium vanterpoolii</i>	KJ595371.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KR736348.1	<i>Pythium viniferum</i>	KJ595419.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KT124637.1	<i>Pythium violae</i>	KJ595345.1



<i>Rhizoctonia solani</i>	KU216129.1	<i>Pythium volutum</i>	KJ595397.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KU321570.1	<i>Pythium vanterpoolii</i>	AB160858.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX118330.1	<i>Pythium catenulatum</i>	AF196588.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX118333.1	<i>Pythium sulcatum</i>	AF196620.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX118338.1	<i>Pythium sylvaticum</i>	AF196621.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX118344.1	<i>Pythium insidiosum</i>	AF196628.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX118358.1	<i>Pythium torulosum</i>	AF196628.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX118360.1	<i>Pythium deliense</i>	DQ071374.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX118397.1	<i>Pythium sulcatum</i>	DQ071396.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX129967.1	<i>Pythium sylvaticum</i>	EU257622.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX130717.1	<i>Pythium myriotylum</i>	EU265666.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX377959.1	<i>Pythium sylvaticum</i>	GU222164.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX810068.1	<i>Pythium tracheiphilum</i>	KJ595375.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX810069.1	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MH760281.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX852461.1	<i>Pythium aphanidermatum</i>	MK333229.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	KX925433.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	KY189902.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	KY570520.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	LC017861.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	LC325492.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MF085065.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MF085066.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MF193941.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MF447834.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MG264304.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MG384802.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MG548648.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MG735262.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MG770087.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MG844367.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MG844372.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MG844378.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MG844381.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MH483962.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MH483967.1	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	MK583646.1	-	-

### **3.4.6 - TESTES DE PATOGENICIDADE, PERÍODO DE INCUBAÇÃO, INCIDÊNCIA E AGRESSIVIDADE.**

Neste estudo, o termo patogenicidade, foi definido como a capacidade de um microrganismo causar doença. Sendo, portanto, um aspecto qualitativo. Ao passo que,

agressividade, foi definido como um componente quantitativo da patogenicidade, ou seja, a quantidade de doença induzida por um organismo patogênico em um hospedeiro suscetível e em um ambiente favorável (Andrivon, 1993).

Os testes patogenicidade e agressividade para *Rhizoctonia* foram realizados com base em 18 isolados representativos dentre os AGs identificados filogeneticamente neste estudo. Todos os 14 isolados de *Pythium* obtidos no início deste trabalho, foram avaliados quanto à patogenicidade e agressividade. Ambos os patógenos foram avaliados com base na metodologia descrita por Thornton *et al.* (1999) através da inoculação em folhas destacadas de alface. As folhas de alface crespa (cultivar 'Vanda') foram destacadas de plantas adultas e foram lavadas em água corrente. Posteriormente foram desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% por 10 min e lavadas em seguida com água destilada. Após a secagem, cada folha foi inoculada com dois discos de micélio (4 mm de diâmetro), em posições equidistantes. Os discos de micélio foram retirados de colônias com sete dias de crescimento em meio BDA a 25°C no escuro. As folhas testemunhas foram inoculadas com discos de BDA com tetraciclina não colonizados pelos isolados utilizados no estudo. As folhas foram colocadas em caixas gerbox forradas com papel toalha umedecido com água destilada e cobertas com a tampa, para manter a umidade relativa do ar elevada e a turgescência das folhas. Os gerbox's foram mantidos a temperatura ambiente durante 6 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por isolado e uma folha por repetição.

Foi avaliado o período de incubação até o surgimento dos primeiros sintomas para cada isolado testado com intervalos de 24 horas durante 5 dias. A patogenicidade dos isolados foi avaliada pela presença de sintomas de necrose de coloração em tons de marrons a negros nos tecidos inoculados. A agressividade foi avaliada pela mensuração do tamanho da lesão em cm<sup>2</sup> e posterior correspondência em porcentagem da área afetada em relação a área total da

folha de cada repetição de todos os isolados testados com o auxílio do Software Axionvison LE<sup>®</sup>. Os dados de tamanho de lesão representadas em porcentagem, foram utilizados para comparar a agressividade dos isolados de *Rhizoctonia*, bem como os de *Pythium* pela análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste da diferença mínima significativa (LSD) de Fisher ao nível de 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ), com o programa Sisvar v. 5.6 (Build 86) (Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil) (Ferreira, 2011).

Adicionalmente, foram realizados cortes histológicos da nervura central do limbo foliar sintomático para podridão de saia a fim de se obter registros fotográficos da ação patogênica de isolados de *Pythium*. Os cortes das seções foram feitos de modo transversal e longitudinal, à mão livre, conforme Quintas (1963) e submetidos à dupla coloração com azul de bromofenol e fucsina básica, baseado em metodologia descrita por Kraus *et al.* (1998).

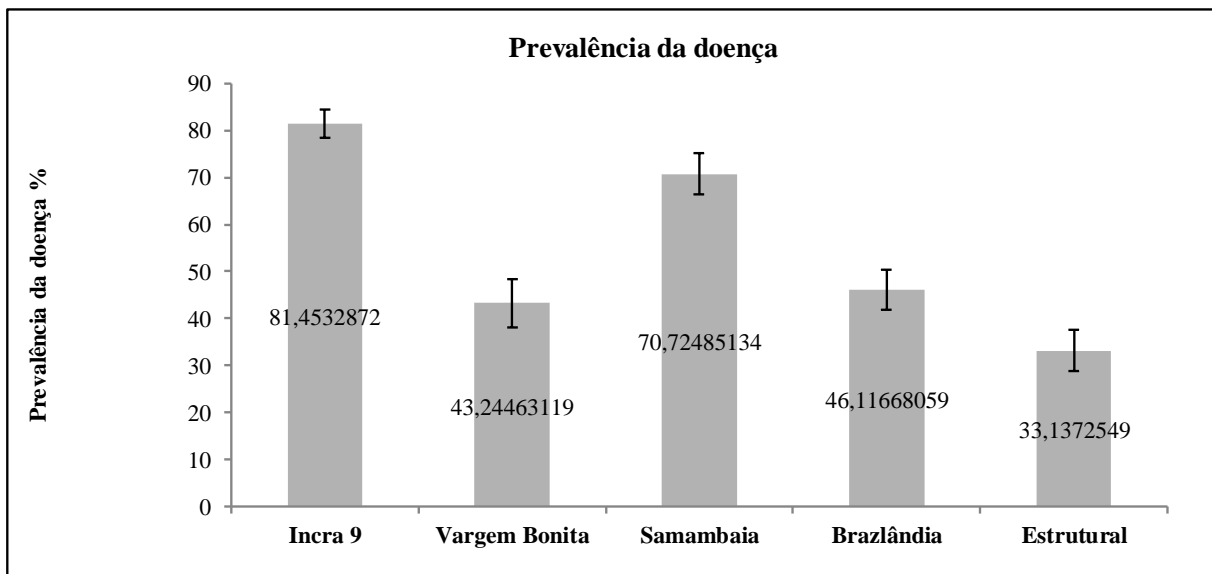
### **3.5 – RESULTADOS**

#### **3.5.1 - PREVALÊNCIA DA DOENÇA**

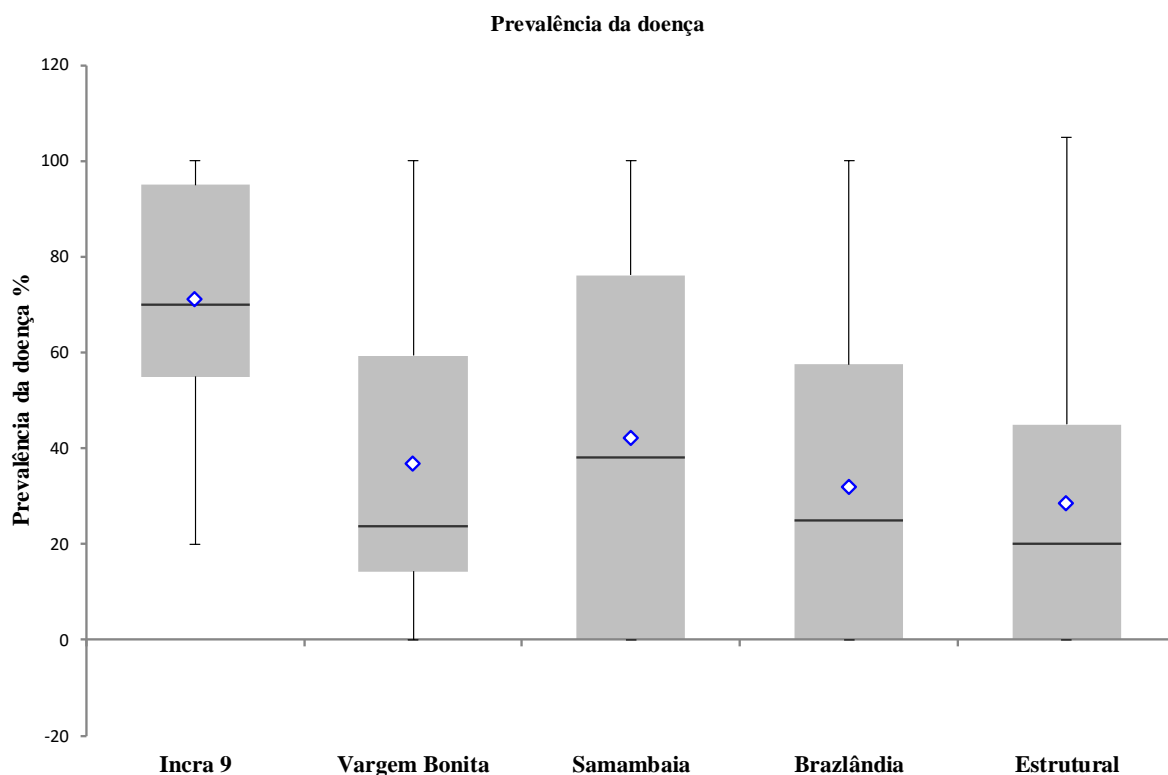
Considerando o total de plantas avaliadas ao final do período do estudo nas cinco grandes áreas produtoras de alface crespa do DF, a prevalência da podridão de saia, na sua totalidade, foi de 47,8%. A prevalência absoluta, que expressa o total da incidência por área em porcentagem, foi de aproximadamente 33,1% para a grande área Estrutural, 46,1% para a grande área Brazlândia, 43,2% para a grande área Vargem Bonita, 70,7% para a grande área Samambaia (Veredas) e de 81,4% para a grande área Incra 9 (Figura 3). Além disso, a média da prevalência de podridão de saia em alface, considerando a totalidade das regiões avaliadas e o regime de chuvas no DF, foi de 21,0 % para a época de seca e de 56,4 % para a época de chuva.

Claramente houve diferença significativa da prevalência entre as áreas avaliadas conforme BoxPlot do teste de Kruskal-Wallis (Figura 4). No entanto, só foi possível saber

quais áreas diferiram entre si após o teste de Nemenyi, o qual revelou que o percentual de prevalência da podridão de saia na grande área Incra 9 diferiu significativamente ( $P \leq 0,05$ ) de todas demais áreas avaliadas neste estudo. Além disso, Vargem Bonita comparada com Samambaia e Vargem Bonita comparada com Estrutural, diferiram também significativamente ( $P \leq 0,05$ ) entre si (Tabela 3).



**Figura 3:** Prevalência da podridão de saia em alface em núcleos rurais no Distrito Federal nos anos de 2017-2019



**Figura 4:** Boxplot do teste de Kruskal-Wallis para a prevalência da podridão de saia em alface em núcleos rurais do Distrito Federal, nos anos 2018-2019.

**Tabela 3:** Teste de Nemenyi para a Prevalência da podridão de saia no Distrito Federal.

Teste de Nemenyi	Inkra 9	Vargem Bonita	Samambaia	Brazlândia
Vargem Bonita	4,532454E-04			
Samambaia	3,040290E-17	2E-06		
Brazlândia	9,799723E-07	1,469020E-01	8,832000E-02	
Estrutural	9,847886E-12	0.000964	0.402764	3,304850E-01

$P > 0,05$  (em vermelho) indica que, o valor em percentual da prevalência da doença nas propriedades (Tabela 3) não difere estatisticamente entre si pelo teste de Nemenyi. Valores em amarelo expressam diferenças significativas no percentual de prevalência da podridão de saia entre as áreas relacionadas.

O memorial das áreas visitadas na grande área Inkra 9, revelou diversos fatores inadequados ao manejo da cultura da alface, como: o descuido com as bandejas de mudas que por várias vezes encontravam-se em contato com o solo (Figura 5.A); a irrigação inadequada com excesso de disponibilidade de água para a cultura (Figura 5.B e 5.C); canteiros com

alturas inadequadas ao cultivo; plantios escalonados; restos de cultura em campo (Figura 5.D e 5.E) e presença massiva de plantas invasoras (Figura 5.F).

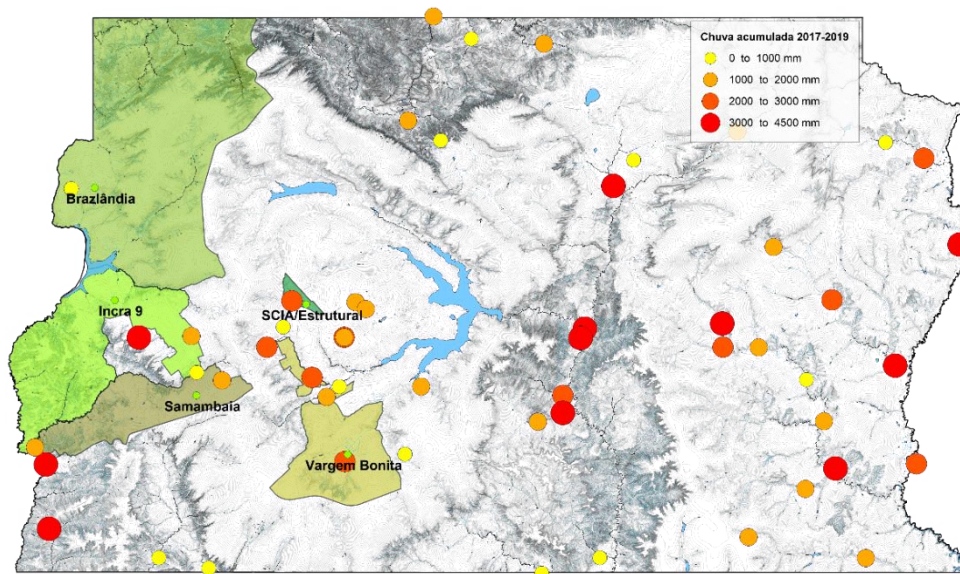
O mapeamento das chuvas acumuladas durante o período de avaliação realizados à campo (2017 a 2019) indicou que a grande área Incra 9 teve o maior índice pluviométrico (superior a 3500 mm) quando comparado às demais regiões. As grandes áreas Samambaia, Vargem Bonita e Estrutural tiveram índices mínimos de 3000 mm. Ao passo que, a grande área Brazlândia, obteve índice pluviométrico máximo de 1000 mm (Figura 6).





**Figura 5:** Registro do manejo inadequado nas áreas do Inkra 9: **A)** Mudas em ambiente aberto, em contato direto com o solo; **B e C)** Ruas totalmente encharcadas por irrigação inadequada; **D e E)** Restos de cultura no plantio com presença da podridão de saia; **F)** Presença massiva de plantas invasoras no plantio. Fotos: Luiz Lopes.



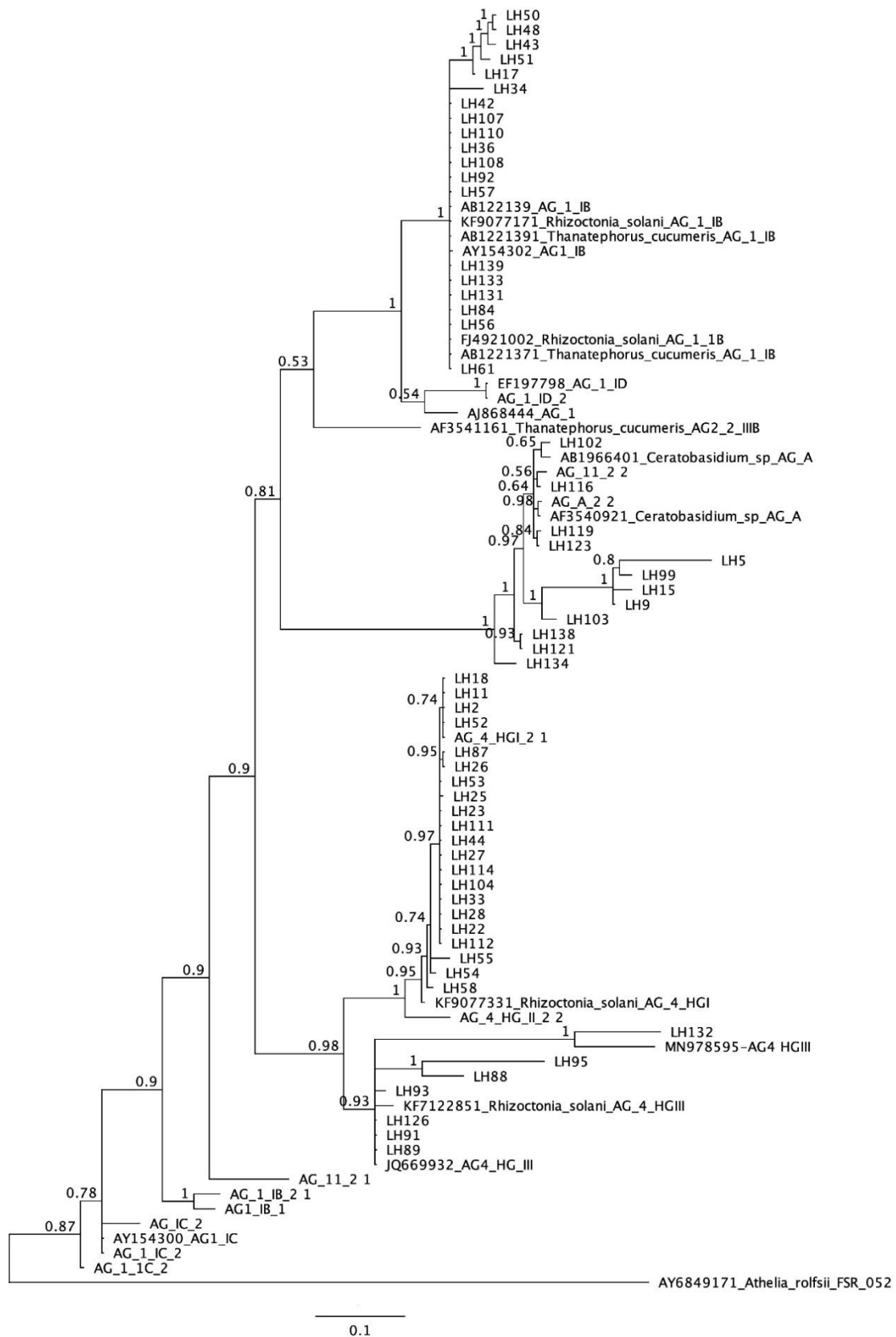


**Figura 6:** Índice de chuva acumulada no território do Distrito Federal durante os anos de 2017 a 2019. Os dados foram obtidos a partir de 54 estações pluviométricas. Todos os registros utilizados para plotagem desta figura pertencem à Agência Nacional de Águas – ANA (Ministério do Desenvolvimento Regional).

### 3.5.2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES CAUSAIS

A análise filogenética com o uso da região ITS foi capaz de distinguir quatro AGs comuns à espécie *Rhizoctonia solani*, sendo eles: AG4-HGI, AG4-HGIII e AG1-IB. Além destes foi detectada a presença do grupo AG-A, pertencente à espécies de *Rhizoctonia* binucleadas. Considerando cada AG encontrado neste trabalho, o total de isolados para cada grupo foi de: **21 para o AG4-HGI** (LH 87, LH 26, LH 23, LH 58, LH 25, LH 44, LH 53, LH 111, LH 114, LH 104, LH 33, LH 28, LH 22, LH 112, LH 18, LH 11, LH 2, LH 52, LH 27, LH 54 e LH 55), **19 para o AG1-IB** (LH 42, LH 107, LH 108, LH 92, LH 57, LH 110, LH 36, LH 139, LH 133, LH 131, LH 84, LH 56, LH 61, LH 34, LH 50, LH 48, LH 43, LH 51 e LH 17) **12 para AG-A** (LH 138, LH 121, LH 102, LH 103, LH 134, LH 116, LH 123, LH 119, LH 99, LH 9, LH 5 e LH 15 ) e **7 para AG4-HGIII** (LH 132, LH 95, LH 88, LH 126, LH 91, LH 89 e LH 93) (Figura 7).



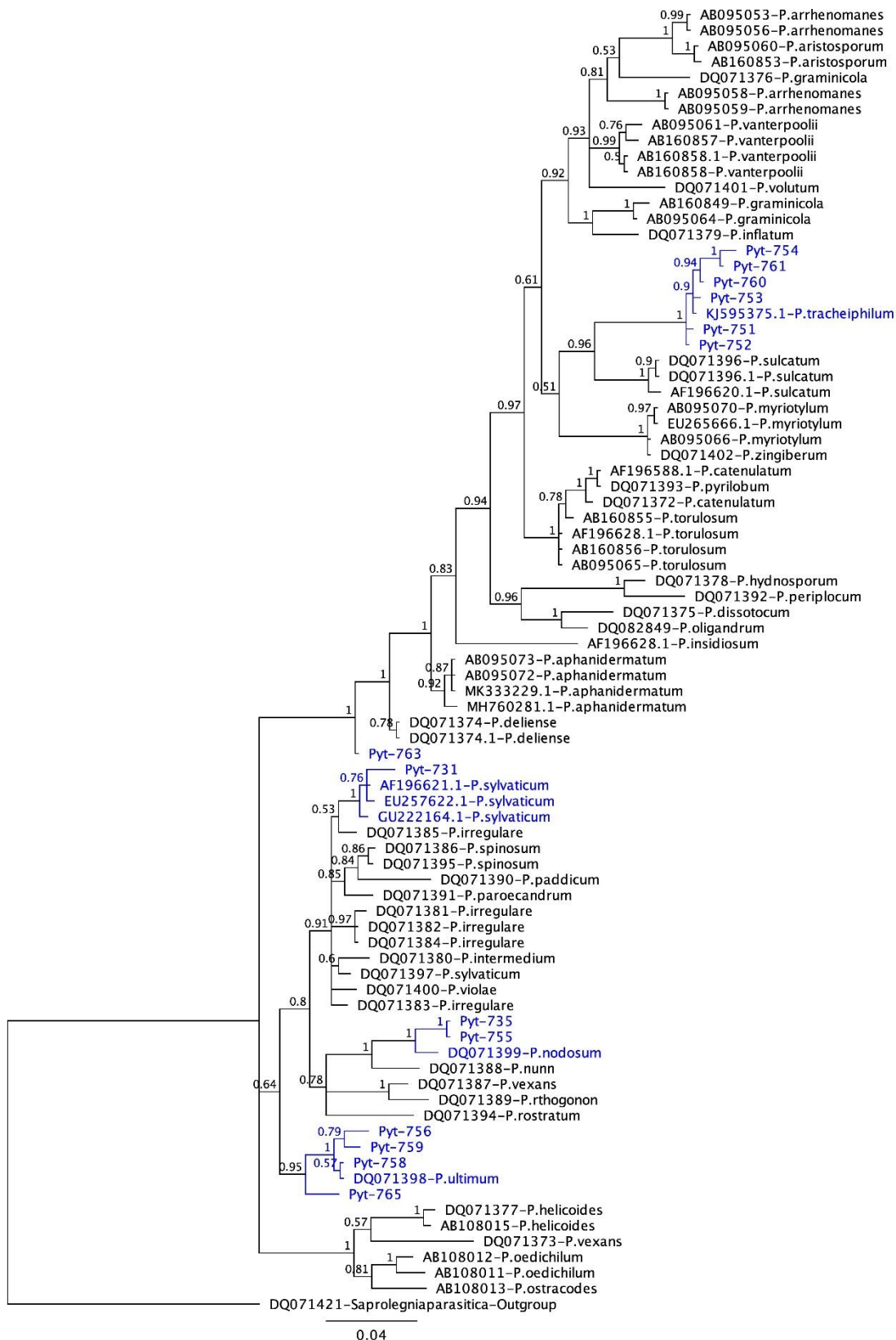


**Figura 7:** Árvore filogenética gerada por análise Bayesiana obtida dos alinhamentos das sequências de ITS dos 59 isolados de *Rhizoctonia* com referências dos AGs pertencentes à *R. solani* e espécies binucleadas de *Rhizoctonia*.

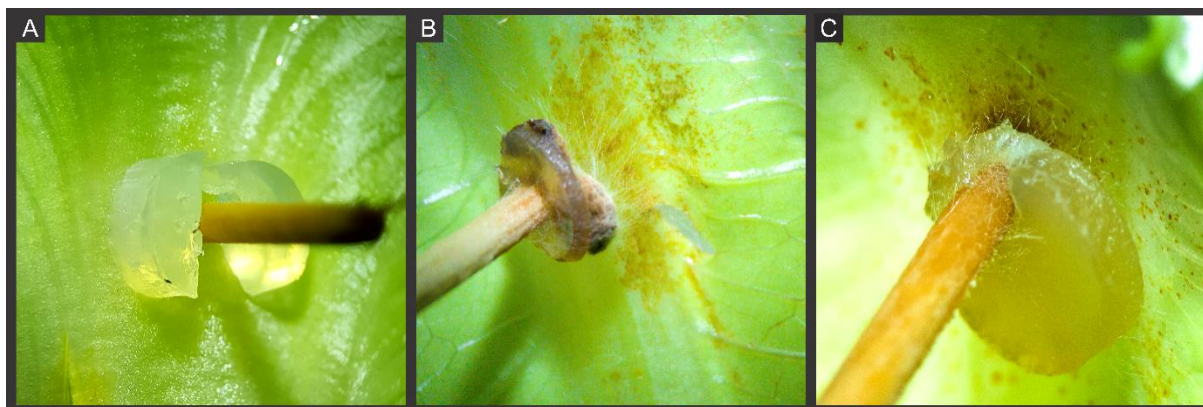
A análise filogenética com o uso da região COX II foi capaz de distinguir quatro espécies distintas do gênero *Pythium* causando podridão de saia no DF, são elas: *P. sylvaticum*, *P. nodosum*, *P. ultimum* e *P. tracheiphilum*. Os isolados Pyt 751, Pyt 752, Pyt 753, Pyt 754, Pyt 760 e Pyt 761 agruparam junto ao isolado de referência *P. tracheiphilum*. O isolado Pyt 731 agrupou junto ao isolado de referência *P. sylvaticum*. Os isolados Pyt 735 e Pyt 755 agruparam com o isolado de referência *P. nodosum*. Os isolados Pyt 756, Pyt 758, Pyt 759 e Pyt 765 agruparam junto ao isolado de referência *P. ultimum*. Por fim, o isolado Pyt 763 não agrupou com nenhuma referência utilizada neste estudo (Figura 8)

### **3.5.3 - TESTES DE PATOGENICIDADE, PERÍODO DE INCUBAÇÃO, INCIDÊNCIA E AGRESSIVIDADE in Planta**

Todos os isolados de *Rhizoctonia* utilizados neste experimento foram patogênicos em folhas destacadas de alface e apresentaram similaridade quanto à morfologia do referido gênero após o reisolamento obtido de tecido foliar afetado. Além disso, eles apresentaram grande variação quanto aos períodos de incubação, desde 24 horas à 120 horas. O isolado LH 43 apresentou o menor período de incubação mais lento dentre os testados, apresentando sintomas primários da doença (manchas pontuadas com coloração marrom) em apenas 24 horas pós inoculação dos discos de micélio (Figura 9.B). Os isolados LH 95, LH 103, LH 48 e LH 50 apresentaram os sintomas iniciais com 48 horas. Com 72 horas, os isolados LH 99, LH 126, LH 108, LH 17, LH 133, LH 53, LH 52, LH 18 e LH 114 apresentaram os sintomas nas folhas. Ao passo que, os isolados LH 23, LH 33 e os isolados LH 27 e LH 54 foram os que mais demoraram a apresentar sintomas aparentes nas folhas, em um período de 96 horas e 120 horas respectivamente (Tabela 4).



**Figura 8:** Árvore filogenética gerada por análise Bayesiana obtida dos alinhamentos de seqüências da região COX II dos 14 isolados de *Pythium* com referências tipo de espécies deste gênero.



**Figura 9:** Sintomas primários da podridão de saia em alface observados após 24 horas da inoculação. **A)** Testemunha; **B)** Sintomas iniciais da podridão de saia causadas por *Rhizoctonia* (isolado LH 43) caracterizados por pequenas manchas marrons; **C)** Sintomas iniciais similares ao causado pelo isolado de *Rhizoctonia* LH 43 causados pelo isolado de *Pythium* Pyt 754. Fotos: Luiz Lopes.

**Tabela 4:** Resultado do teste de patogenicidade, período de incubação, incidência e agressividade dos isolados de *Rhizoctonia* representativos dos AGs relatados neste trabalho.

Isolado	Patogenicidade	Período de incubação (horas)	Isolado	Incidência (médias em %)	Resultado do Teste	Isolado	Agressividade (médias em % da área foliar lesionada)	Resultado do Teste
LH 43	Sim	24 h	LH 52	50,0	a	LH 23	48,0	a
LH 95	Sim	48 h	LH 23	50,0	a	LH 54	56,4	a b
LH 103	Sim	48 h	LH 54	50,0	a	LH 52	65,0	a b c
LH 48	Sim	48 h	LH 108	66,7	a b	LH108	67,7	a b c
LH 50	Sim	48 h	LH 27	83,3	a b	LH 126	78,5	a b c
LH 99	Sim	72 h	LH 43	83,3	a b	LH 27	79,5	a b c
LH 126	Sim	72 h	LH 53	83,3	a b	LH 48	83,5	a b c
LH 108	Sim	72 h	LH 48	83,3	a b	LH 43	86,2	b c
LH 17	Sim	72 h	LH 103	83,3	a b	LH 17	86,3	b c
LH 133	Sim	72 h	LH 114	83,3	a b	LH 103	86,8	b c
LH 53	Sim	72 h	LH 126	83,3	a b	LH 53	97,2	c
LH 52	Sim	72 h	LH 17	83,3	a b	LH 99	100,0	c
LH 18	Sim	72 h	LH 99	100,0	b	LH 95	100,0	c
LH 114	Sim	72 h	LH 95	100,0	b	LH 114	100,0	c
LH 23	Sim	96 h	LH 33	100,0	b	LH 33	100,0	c
LH 33	Sim	96 h	LH 18	100,0	b	LH 133	100,0	c
LH 27	Sim	120 h	LH 50	100,0	b	LH 50	100,0	c
LH 54	Sim	120 h	LH 133	100,0	b	LH 18	100,0	c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de LSD de Fisher a 5% de significância (P=0,05). CV = 31,98 % para incidência e CV = 25,47 % para agressividade.

A incidência *in planta* dos isolados de *Rhizoctonia* variou de 50% a 100%, apresentando diferenças estatísticas significativas entre os isolados avaliados em dois grupos de médias. O primeiro grupo de isolados LH 52, LH 23, LH 54, LH 108, LH 27, LH 43, LH53, LH 48, LH 103, LH 114, LH 126 e LH 17, não apresentaram diferença estatística entre si, variando a média da incidência 50,0% a 83,3%. O segundo grupo de isolados (LH 99, LH 95, LH33, LH18, LH 50 e LH 133) apresentou maior incidência quando comparado com o primeiro grupo e diferiram estatisticamente destes, variando de 83,3% a 100% (Tabela 4).

Quanto à agressividade os isolados testados foram separados estatisticamente em três grupos. Sendo que, em todos, houve um comprometimento maior que 50% da área foliar por conta do desenvolvimento da doença. Os isolados LH 53, LH 99, LH 95, LH 114, LH 33, LH 133, LH 50 e LH 18 foram os mais agressivos, causando lesões que cobriram toda a área foliar ao final do experimento (Tabela 4).

Quanto aos isolados de *Pythium* utilizados neste teste, todos foram patogênicos em folhas de alface e todos apresentaram similaridade morfológica com *Pythium* spp. após o processo de reisolamento obtido de folhas infectadas. Os isolados testados apresentaram diferentes períodos de incubação que variaram de 24 a 96 horas. Os isolados Pyt 763, Pyt 735 e Pyt 756 foram os mais precoces em apresentarem sintomas primários da doença no período de 24 horas pós inoculação dos discos de micélio do fungo nas folhas de alface (Figura 9.C). Os isolados Pyt 761, Pyt 731, Pyt 760, Pyt 759 e Pyt 751 apresentaram os sintomas iniciais com 48 horas. Com 72 horas, os isolados Pyt 752, Pyt 755 e Pyt 758 apresentaram sintomas nas folhas. Ao passo que, todos os demais isolados, foram capazes de causar doença em um período de 96 h após a inoculação (Tabela 5).

**Tabela 5:** Resultado do teste de patogenicidade, período de incubação, incidência e agressividade dos isolados de *Pythium* utilizados neste trabalho.

Isolado	Patogenicidade	Período de incubação (horas)	Isolado	Incidência (médias em %)	Resultado do Teste	Isolado	Agressividade (médias em % da área foliar lesionada)	Resultado do Teste
Pyt 763	Sim	24 h	Pyt 755	50,0	a	Pyt 760	4,9	a
Pyt 735	Sim	24 h	Pyt 756	50,0	a	Pyt 763	9,9	a b
Pyt 756	Sim	24 h	Pyt 752	50,0	a	Pyt 751	16,5	a b c
Pyt 761	Sim	48 h	Pyt 765	50,0	a	Pyt 765	16,8	a b c
Pyt 731	Sim	48 h	Pyt 758	50,0	a	Pyt 756	20,9	a b c
Pyt 760	Sim	48 h	Pyt 763	50,0	a	Pyt 755	21,1	a b c
Pyt 759	Sim	48 h	Pyt 761	66,7	a b	Pyt 735	31,0	a b c
Pyt 751	Sim	48 h	Pyt 753	66,7	a b	Pyt 758	39,7	b c d
Pyt 752	Sim	72 h	Pyt 760	66,7	a b	Pyt 761	41,0	b c d
Pyt 755	Sim	72 h	Pyt 759	83,3	b c	Pyt 754	49,3	c d e
Pyt 758	Sim	72 h	Pyt 751	83,3	b c	Pyt 731	72,2	d e f
Pyt 753	Sim	96 h	Pyt 735	100,0	c	Pyt 752	72,7	d e f
Pyt 754	Sim	96 h	Pyt 754	100,0	c	Pyt 759	81,4	e f
Pyt 765	Sim	96 h	Pyt 731	100,0	c	Pyt 753	100,0	f

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de LSD de Fisher a 5% de significância (P=0,05). CV = 24,99% para incidência e CV = 41,33%

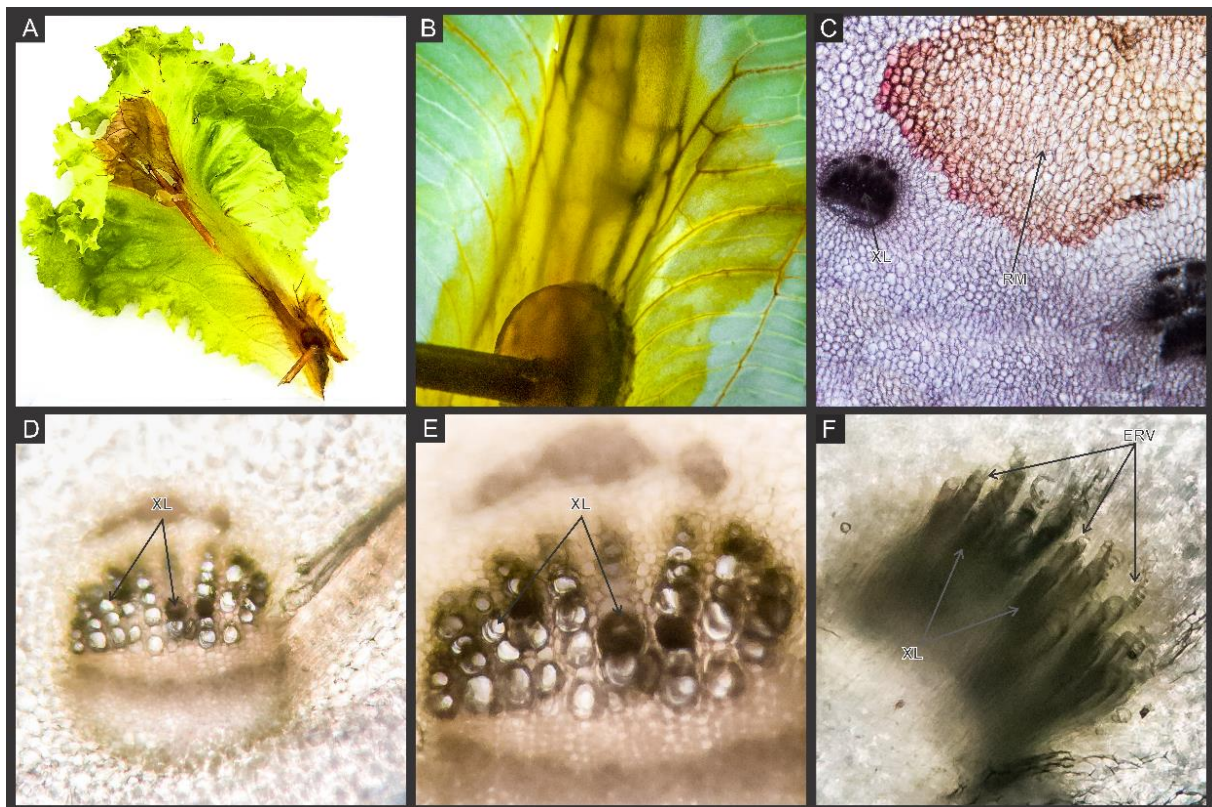
A incidência in planta de podridão em folhas causadas por isolados de *Pythium* variou de 50% a 100%, apresentando diferenças estatísticas significativas entre os isolados avaliados em três grupos de médias. O primeiro grupo de isolados Pyt 755, Pyt 756, Pyt 752, Pyt 765, Pyt 758, Pyt 763, Pyt 761, Pyt 753, Pyt 760 não apresentaram diferença estatística entre si, variando a média de 50,0% a 66,7%. O segundo grupo de isolados Pyt 759 e Pyt 751, apresentou 83,3% de incidência nas folhas de alface. Ao passo que o terceiro grupo, composto pelos isolados Pyt 735, Pyt 754 e Pyt 731 apresentou incidência de 100% nas folhas testadas.

Quanto à agressividade, os isolados testados diferiram estatisticamente em seis grupos. Sendo que, de maneira geral, os isolados comprometeram desde 4,9% até 100% do limbo foliar (Tabela 5).

Curiosamente, durante o teste de patogenicidade envolvendo *Pythium*, foram observadas a capacidade dos isolados Pyt 754 e Pyt 751 em colonizarem os vasos do limbo foliar, causando podridões vasculares (Figura 10.A e 10.B). Secções transversais obtidas da



nervura central do limbo apodrecido pelo patógeno, permitiram visualizar a região medular necrosada bem como os vasos do xilema (Figura 10.C). Sendo que, as células parenquimáticas do entorno destas estruturas, apresentavam-se aparentemente preservadas (Figura 10.C). Secções de transição entre o tecido sadio e o tecido lesionado, apresentaram vasos de xilema saudios (com interior translúcido) ao lado de vasos de xilema afetados por *Pythium* (vasos com o interior escurecidos) (Figuras 10.D e 10.E). Cortes nas secções longitudinais da nervura principal de limbo lesionado, permitiram observação da podridão os vasos do xilema e de maneira específica, das estruturas helicoidais de revestimento vascular interno (parede secundária) destes vasos (figura 10.F).



**Figura 10:** **A)** Folha com sintomas da podridão de saia causados por *Pythium tracheiphilum*; **B)** nervura central do limbo indicando lesão vascular. **C)** secção transversal do limbo com lesão na região medular (RM) e comprometimento dos vasos de xilema (XL) **D e E)** secção de transição entre tecido sadio e tecido lesionado indicando vasos de xilema saudios (translúcidos) e vasos necrosados (escurecidos) por *P. tracheiphilum* **F)** secção longitudinal indicando apodrecimento vascular do xilema bem como das estruturas de revestimento interno dos vasos (ERV).

### 3.6 – DISCUSSÃO

Os dados da prevalência da podridão de saia em alface revelados neste estudo lançam um alerta sobre os prejuízos que esta doença tem causado aos produtores de alface do DF, considerando que quase metade do total de plantas avaliadas nas 44 propriedades apresentavam a doença em campo. Com base nas pesquisas publicadas até o momento, este trabalho é pioneiro na elucidação da etiologia e da prevalência desta doença em campos de produção de alface no Distrito Federal. Estudos como este, do ponto de vista epidemiológico, são imprescindíveis para orientar medidas de manejo a fim de reduzir e/ou prevenir doenças em plantios (Amorim & Bergamim Filho, 2018). O fato da podridão de saia (considerando a associação com espécies de *Rhizoctonia*) prevalecer em épocas de chuva quando comparados com as épocas de seca ao longo deste estudo, vai ao encontro dos resultados apresentados por Gondal *et al.* (2019) que relacionaram uma maior ocorrência de *Rhizoctonia solani* em campos de produção de tomate no Paquistão ao alto índice pluviométrico apresentado durante os seus levantamentos.

Com exceção da grande área Brazlândia que, por obter poucas estações pluviométricas instaladas pode ter levado a uma subestimativa do total de chuvas presentes naquela região durante o experimento, as grandes áreas que tiveram maior prevalência da podridão de saia no DF, também tiveram maior índice de chuva acumulada (conforme levantamento de dados da Agência Nacional de Águas – ANA – Figura 6). Este pode ser um dos motivos pelo qual estas áreas apresentaram maior prevalência da doença em campo, conforme relação direta entre ocorrência da doença e alta umidade, supracitadas no parágrafo anterior.

A presença de restos de cultura no campo é um dos fatores que favorecem a disseminação e perpetuação de patógenos de solo sobretudo por estes terem alta capacidade de sobreviver e competir saprofiticamente, além de possuírem ampla gama de hospedeiros (Agarwal, 2010). Dessa forma, além do alto índice pluviométrico e irrigação inadequada, a



presença de restos de cultura, bandejas em contato direto com o solo e a ocorrência massiva de plantas invasoras, ajudam a elucidar a alta prevalência desta doença na região do Incra 9.

Os resultados apresentados na Tabela 1 do Capítulo 2 desta tese tem relação com o fato da grande área Incra 9 apresentar maior prevalência da doença quando comparada com as demais regiões avaliadas. Áreas com grande prevalência de uma doença causada por patógenos de solo, tendem a apresentar mudança no padrão do grau de distribuição da doença. Um padrão de distribuição regular, neste caso, é expresso por um LIP próximo de 1. Isto indica maior regularidade de ocorrências da doença na área, contrário ao estado de agregação, comum para casos de doenças com agentes causais veiculados pelo solo. Neste sentido, a amostragem das parcelas em áreas com relativa regularidade, mantém menor erro, tendendo a um resultado de maior incidência da doença na área. A mudança no padrão de distribuição da doença também pode estar relacionada à diversos motivos, entre eles: o decréscimo ou aumento da quantidade de inóculo, alterações na susceptibilidade da hospedeira ou por mudanças na supressividade dos fatores ambientais a doença (Campbell *et al.*, 1984). Segundo Trujilo & Snyder (1963), a capacidade dos fungos produzirem propágulos capazes de sobreviver no solo e em restos de cultura, aliada a um manejo inadequado destes restos, podem contribuir para alterações no padrão espacial de plantas doentes.

Dados sobre arranjo espacial de uma doença podem ser utilizados como auxílio na mensuração quantitativa da doença no campo, como por exemplo a prevalência. Isto permite maior discernimento sobre a dinâmica espaço-temporal das interações entre hospedeiro, patógeno e ambiente, dentro de um patossistema (Thal & Campbell, 1986; Gottwald *et al.*, 1992). Peruch *et al.*, (2006), realizaram levantamentos quantitativos da prevalência de alternariose em brássicas nos estados de Santa Catarina e Pernambuco e constataram a prevalência de 100% nos cultivos de brócolis avaliados em Pernambuco, bem como em couve-flor, em ambos os estados. Elevadas prevalências na maioria das avaliações indicam a

importância de tais doenças para tais culturas, e são fortes indicadores da importância nas alterações de adaptabilidade dos patógenos aos ambientes e às hospedeiras.

As análises filogenéticas dos isolados obtidos neste estudo, demonstraram que a podridão de saia em alface no DF é bastante complexa, sendo causada por pelo menos quatro AGs de *Rhizoctonia* e quatro espécies de *Pythium*, sendo eles: AG1-IB, AG4-HGI, AG4-HGIII, AG-A e *P. tracheiphilum*, *P. sylvaticum*, *P. nodosum*, *P. ultimum*, respectivamente (Figura 7 e Figura 8). Esta é a primeira vez que estes AGs são relatados causando podridão de saia em alface no Brasil, exceto o AG1-IB, anteriormente relatado por Kuramae *et al.* (2002) em campos de produção de alface em Botucatu-SP-Brasil. Dentro do conhecimento adquirido ao longo desta pesquisa, os grupos AG-A e AG4-HGIII estão sendo relatados pela primeira vez a nível mundial causando podridão de saia em alface. Recentemente, os AGs AG-A, AG4-HGI e AG4-HGIII foram detectados por Blanco *et al.* (2018) após pesquisarem a diversidade e patogenicidade de espécies de *Rhizoctonia* a partir de amostras de solo de diferentes áreas de vegetação do cerrado brasileiro, tanto nativas quanto oriundas de campos agrícolas.

Diferentes AGs de *Rhizoctonia* foram distinguidos como agentes causais da podridão da saia em alface pelo mundo. Na Bélgica os grupos encontrados foram AG1-IB, AG4-HGI, AG10, AG2-1, AG2-1 Nt e AG3, sendo AG1-IB e AG4-HGI os mais frequentes, coincidindo com o que foi observado nesta pesquisa (Van Beneden *et al.*, 2009). Claerbout *et al.* (2019) detectaram alta prevalência deste último grupo em alface sob cultivo protegido na Bélgica, durante épocas quentes. Este fato pode ajudar a elucidar o motivo da alta ocorrência do AG4-HGI em campos de cultivo de alface no DF, sobretudo por conta do clima tropical a qual este território está sujeito.

Os grupos AG1, AG2 e AG4 foram encontrados em alface na Holanda, Reino Unido e EUA (Kooistra 1983; Wareing *et al.* 1986). Outro grupo observado nos Estados Unidos foi

o AG5 (Herr 1992). O AG1-IB, além de ser conhecido no Brasil, foi também relatado na Alemanha e nos Estados Unidos (Kuramae *et al.*, 2003). Na Alemanha os grupos AG2-1 e AG1-IC foram também detectados, apesar de apresentarem baixa prevalência durante as avaliações (Grosch *et al.*, 2004).

Dentre os AGs detectados nesta pesquisa, um é pertencente a espécies de *Rhizoctonia* binucleadas, o AG-A. Este grupo não tinha sido observado até o momento atacando alface. Ele é conhecido por causar sintomas como a podridão de raiz e “*damping-off*”. Além disso, ele possui uma ampla gama de hospedeiras, tais como: morango, beterraba, ervilha, girassol, tomate, melão, batata, espinafre e amendoim (Mazzola, 1997; Sneh *et al.*, 1998; Yang & Li, 2012).

A complexidade da podridão de saia da alface no que diz respeito à diversidade de patógenos envolvidos, já tinha sido relatada desde a década de 30 (Townsend, 1934), sendo o gênero *Pythium* um dos envolvidos e que merece relativo destaque. Com a exceção de *P. ultimum* que já tinha sido detectado no Brasil atacando amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e beterraba (*Beta vulgaris* L.) (Ponte, 1996; Kimati *et al.*, 1997), este trabalho relata a ocorrência de três espécies que nunca tinham sido detectadas no Brasil, são elas: *P. tracheiphilum*, *P. sylvaticum* e *P. nodosum*. No final da década de 70, *P. tracheiphilum* e *P. sylvaticum*, foram relatadas como agentes causais de podridão de saia em alface em outros países (Blok & Van der Plaats-Niterik, 1978). Muito recentemente, *P. tracheiphilum* (espécie do gênero de maior ocorrência nesta pesquisa) foi relatada causando podridão de saia em alface cultivada em casas de vegetação na Bélgica (Claerbout *et al.*, 2019) e podridão de raiz (causando murchas) em campos de produção comercial em Quebec, Canadá (Van der Heyden *et al.*, 2019).

A ocorrência de *P. sylvaticum* causando podridão de saia em alface no Brasil, é congruente com os resultados apresentados por Gilardi *et al.* (2017), que relataram esta

espécie em alfaces na Itália. Assim como os resultados de Farr & Rossman (2017) os quais registraram a presença desta espécie atacando alface no Arizona, EUA, Canadá e África do Sul. A espécie *P. nodosum*, relatada pela primeira vez em 1998 em solos na França (Paul *et al.*, 1998), tem somente a soja (*Glicine max*) relatada na literatura como planta hospedeira (Farr & Rossman, 2017). Sendo assim este trabalho registra pela primeira vez a alface como hospedeira deste oomiceto a nível mundial.

De maneira geral, a semelhança na sintomatologia da podridão de saia da alface para os diferentes agentes causais identificados neste trabalho (Figura 9), revela uma das dificuldades encontradas para o controle desta doença em campo. Este é um dos motivos pelo qual se faz necessário o conhecimento exato da etiologia de uma doença em planta, a fim de se obter informações para um manejo adequado (Riley *et al.*, 2002). Ressalte-se que os *Pythium* (Reino Chromista), não são fungos verdadeiros, possuem zoósporos flagelados e não são suscetíveis aos mesmos princípios ativos e demais medidas de controle empregadas para o controle de *Rhizoctonia* (Reino Fungi).

Dentre os isolados de *Rhizoctonia* mais agressivos, dois (LH 133 e LH 50) pertencem ao grupo AG1-IB e três (LH 114, LH 33 e LH 18) pertencem ao grupo AG1-HGI. Estes grupos são conhecidos por apresentarem maior crescimento micelial em temperatura ótima de 28°C quando comparado com outros grupos causadores de podridão de saia em alface como: AG-BI e AG2-1 (Claerbout *et al.*, 2019). O fato do HG1-IB estar relacionado com alta agressividade em alface já tinha sido registrado anteriormente por Herr (1992) em estudos realizados em campos de produção de alface no estado de Ohio, EUA. Além disso, Claerbout *et al.* (2019) constataram que os grupos AG1-IB e AG4-HGI foram mais agressivos em testes de patogenicidade em alface quando comparados com os grupos AG-BI, e AG2-1.

Os oomicetos do gênero *Pythium* possuem diversos mecanismos para colonização de suas hospedeiras. Algumas espécies são capazes de infectar diretamente por hifas que são

produzidas diretamente de oósporos. Em outras condições ambientais, produzem zoósporos cujos tubos germinativos atravessam as células dos tecidos vegetais e degradam a parede celular através de enzimas e toxinas até matar a hospedeira (Schroeder *et al.*, 2013). No entanto, a espécie *P. tracheiphilum* coloniza suas hospedeiras de maneira incomum comparado às demais espécies deste gênero. Sabe-se que ela é capaz de causar podridões vasculares em suas hospedeiras, em particular no xilema, onde passam a maior parte de seu ciclo de vida (Jacquet, 1979). Neste sentido, todos os sintomas de podridão vascular, em particular por esta espécie, foram observados de maneira similar neste estudo em folhas de alface, conforme Figura 10. Kiehr *et al.* (2015) obtiveram resultados semelhantes ao avaliarem plantios de alface localizados em Bahia Blanca – Argentina. As plantas apresentavam como principais sintomas: clorose, nanismo, murcha e podridão vascular nas raízes e nas folhas. Através dos postulados de Kock, os autores comprovaram que a espécie *P. tracheiphilum* era o agente causal da doença.

Observa-se que, durante a coleta de dados neste trabalho junto aos produtores rurais e demais envolvidos na cadeia produtiva da alface, a pouca disponibilidade de área no DF e a alta demanda por alface no mercado regional e nacional, tem forçado os produtores, em muitos casos, a reduzir o período de duração da rotação de cultura ou simplesmente, a não realizá-la. A maioria das espécies de *Pythium* pode sobreviver sob grande variação climática e por um período prolongado (Schoroeder *et al.*, 2012). E, como consequência do tempo curto nas rotações de cultura, o inóculo inicial contido no solo, aumenta a cada ciclo de cultivo, contribuindo para redução da produção (Bennett *et al.*, 2012).

Baseados nos resultados apresentados no presente trabalho, conclui-se que o DF possui alta prevalência de podridão de saia nos campos de produção de alface e que a doença é causada por dois grupos de patógenos que são totalmente distintos, sobretudo em aspectos epidemiológicos. Sendo assim, estas informações podem servir como base para um melhor

planejamento das estratégias de manejo desta importante doença que acomete os cultivos de alface no Distrito Federal e em outras regiões nacionais e do estrangeiro.

### 3.7 – REFERÊNCIAS

AGARWAL, D.K. 2010. *Rhizoctonia* DC: taxonomy, ecology and management. Taxonomy and ecology of Indian fungi. New Delhi: IK International Publishing House, p. 19-49.

AJAYI-OYETUNDE, O.O.; BRADLEY, C.A. 2018. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of *rhizoctonia* seedling disease of soybean. Plant Pathology, v. 67, n. 1, p. 3-17,

AMORIN, L. & BERGAMIM FILHO. FENOLOGIA, PATOMETRIA E QUANTIFICAÇÃO DE DANOS. In: AMORIN, L., BERGAMIN FILHO, A., & REZENDE, J. (2018). Manual de Fitopatologia. v. 1. Piracicaba: Agronômica Ceres., p. 61-63.

ANDRIVON, D. 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. Phytopathology 83: 889-890.

ARCHIBALD, J.K.; MORT, M.E. & CRAWFORD, D.J. 2003. Bayesian inference of phylogeny: a non-technical primer. Taxon 52: 187–191.

BENNETT, A.J.; BENDING, G.D.; CHANDLER, D.; HILTON, S. & MILLS, P. 2012. Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations. Biological Reviews 87:52-71.

BLANCARD, D.; LOT, H. & MAISONNEUVE, B. 2006. A Colar Atlas of Disases of Lettuce and Related Salada Crops, Observation, Biology and Control. San Diego, Academic Press, p. 375.

BLANCO, A.J.V.; COSTA, M.O.; SILVA, R.D.N.; ALBUQUERQUE, F.S.D.; MELO, A.T.D.O.; LOPES, F.A.C.; STEINDORFF, A.S.; BARBOSA, E.T. & LOBO JUNIOR, M. 2018. Diversity and Pathogenicity of *Rhizoctonia* Species from the Brazilian Cerrado. *Plant disease*, 102(4), p. 773-781.

BLOK, I. & VAN DER PLAATS-NITERINKV, A.J. 1978. *Pythium uncinulatum* sp. nov. and *P. tracheiphilum* pathogenic to lettuce. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 84, p. 135–136.

BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N. & SIMON, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of American Society for Horticultural Science* 124, p. 32-38.

CAMPBELL, C.L.; JACOBI, W.R.; POWELL, N.T. & MAIN, C.E. 1984. Analysis of disease progression and the randomness of occurrence of infected plants during tobacco black shank epidemics. *Phytopathology*, 74(2), p. 230-235.

CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley. p. 532

CARLING, D.E. 1996. Grouping in *Rhizoctoni solani* by hyphal anastomosis interactions. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. & DIJST, G. (eds.). *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 37-47.

CASTELLANI, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, p. 270–276.

CLAERBOUT, J.; DECOMBEL, A.; VOLCKAERT, A.; VENNEMAN, S.; VANDEVELDE, I.; BLEYAERT, P.; NEUKERMANS, J.; VIAENE, N. & HÖFTE, M. 2019. Glasshouse-specific occurrence of basal rot pathogens and the seasonal shift of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups in lettuce. *European Journal of Plant Pathology*, 155(3), p. 841-858.

DEL PONTE, E. M.; GODOY, C.V.; LI, X. & YANG, X.B. 2006. Predicting severity of Asian soybean rust epidemics with empirical rainfall models. *Phytopathology*, 96(7), p. 797-803.

EMATER-DF. 2009. Plano executivo de desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva de hortaliças no Distrito Federal, período de 2009/2014. Brasília, Emater/DF, p. 52.

EMATER-DF. 2014. Informações agropecuárias do distrito federal 2013. Brasília, EMATER, p. 19.

EMATER-DF. 2016. Relatório de Atividades de 2016. Brasília, Emater/DF, p. 57.

ERWIN, D.C. & RIBEIRO, O.K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota.

FARR, D.F.; & ROSSMAN, A.Y. 2017. *Fungal Databases*, Syst. Mycol. Microbiol. Lab. ARS, USDA.

FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. *Ciênc. agrotec.* vol.35, n.6, p.1039-1042.



GILARDI, G.; MATIC, S.; GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. 2018. First report of root rot caused by *Pythium sylvaticum* on lettuce in Italy.

GONDAL, A.S.; RAUF, A. & NAZ, F. 2019. Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* associated with tomato foot rot in Pothohar Region of Pakistan. Scientific reports, 9(1), p. 1-12.

GOTTWALD, T.R.; RICHIE, S.M.; CAMPBELL, C.L. 1992. LCOR2—spatial correlation analysis software for the personal computer. Plant Disease, 76(2), p. 213.

GROSCH, R.; SCHNEIDER, J.H.M.; KOFOET, A. 2004. Characterisation of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups causing bottom rot in field-grown lettuce in Germany. European journal of plant pathology, v. 110, n. 1, p. 53-62.

HERR L.J. 1992. Characteristics of *Rhizoctonia* isolates associated with bottom rot of lettuce in organic soils in Ohio. Phytopathology 82: 1046–1050

HUDSPETH, D.S.; NADLER, S.A. & HUDSPETH, M.E. 2000. A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. Mycologia, 92(4), p. 674-684.

HYAKUMACHI, M. & UI T. 1987. Non-self-anastomosing isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from fields of sugarbeet monoculture. Transactions of the British Mycological Society 89, p. 155–9.

HYDE, K.D.; NILSSON, R.H.; ALIAS, S.A.; ARIYAWANSA, H.A.; BLAIR, J.E.; CAI, L.; COCK, A.; WA, M.; DISSANAYAKE, A.J.; GLOCKLING, S.L.; GOONASEKARA I.D.; GORCZAK, M.; HAHN, M.; JAYAWARDENA, R.S.; VAN KAN JAL.; LAURENCE M.H.; LÉVESQUE, C.A.; LI, X.; LIU, J.K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; MANAMGODA, D.S.; MARTIN, F.N.;

MCKENZIE, E.H.C.; MCTAGGART, A.R.; MORTIMER, P.E.; NAIR, P.V.R.; PAWŁOWSKA, J.; RINTOUL, T.L.; SHIVAS, R.G.; SPIES, C.F.; SUMMERELL, B.A.; TAYLOR, P.W.J.; TERHEM, R.B.; UDAYANGA, D.; VAGHEFI, N.; WALTHER, G.; WILK, M.; WRZOSEK, M.; XU, J.C.; YAN, J. & ZHOU, N. 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera. *Fungal Diversity*, Kunming, v. 67, n. 1, p. 21-125.

JACQUET, M. 1979. *Pythium tracheiphilum* Matta, agent du flétrissement de la laitue (*Lactuca sativa* L.): Étude biologique et épidémiologique (Doctoral dissertation).

KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, L. E. A.; CAMARGO, J. A. M. R. (Ed.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronomia Ceres, 1997. v. 2, 774 p.

KRAUS, J.E.; SOUSA, H.C.; REZENDE, M.H.; CASTRO, N.M.; VECCHI, C. & LUQUE, R. 1998. Astra blue and basic fucsin double staining of plant materials. *Biotechnic & Histochemistry* 73:235-243.

KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M.A.; MOURA, M.F.; KUROZAWA, C. 2016. DOENÇAS DA ALFACE. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. 2016. Manual de fitopatologia. v. 2, 772 p.

KURAMAE, E.E.; BUZETO, A.L.; CIAMPI, M.B. & SOUZA, N.L. 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in lettuce, AG 4 HG-I in tomato and melon, and AG 4 HG-III in broccoli and spinach, in Brazil. *European journal of plant pathology*, 109(4), p. 391-395.

MASAGO, H.; YOSHIKAWA, M.; FUKADA, M. & NAKANISHI, N. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. from soils and plants. *Phytopathology* 67(3): 425-428.

MAZZOLA, M. 1997. Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from apple roots and orchard soils. *Phytopathology*, 87(6), p. 582-587.

MORAL, J.; MORGAN, D.; TRAPERO, A. & MICHAILIDES, T.J. 2019. Ecology and epidemiology of diseases of nut crops and olives caused by Botryosphaeriaceae fungi in California and Spain. *Plant disease*, 103(8), p. 1809-1827.

NILSON, R.H.; HYDE, K.D.; PAWLOWSKA, J.; RYBERG M.; TEDERSOO, L.; AAS, A.B.; ALIAS, S.A.; ALVES, A.; ANDERSON, C.L.; ANTONELLI, A.; ARNOLD, A.E.; BAHNMANN, B.; BAHRAM, M.; BENGTSSON-PALME, J.; BERLIN, A.; BRANCO, S.; CHOMNUNTI, P.; DISSANAYAKE, A.; DRENKHAN, R.; FRIBERG, H.; FROSLEV, T.G.; HALWACHS, B.; HARTMANN, M.; HENRICOT, B.; JAYAWARDENA, R.; JUMPPONEN, A.; KAUSERUD, H.; KOSKELA, S.; KULIK, T.; LIIMATAINEN, K.; LINDAHL, B.D.; LINDNER, D.; LIU, J.K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S.; MANAMGODA, D.; MARTINSSON, S.; NEVES, M.A.; NISKANEN, T.; NYLINDER, S.; PEREIRA, O.L.; PINHO, D.B.; POTTER, T.M.; QUELOZ, V.; RIIT, T.; SÁNCHEZ-GARCÍA, M.; SOUSA, F.D.; STEFANCZYK, E.; TADYCH, M.; TAKAMATSU, S.; TIAN, Q.; UDAYANGA, D.; UNTERSEHER, M.; WANG, Z.; WIKKEE, S.YAN, J.; LARSSON, E.; LARSSON, K.H.; KÕLJALG, U. & ABARENKOV, K. 2014. Improving ITS sequence data for identification of plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity*, v. 67, n. 1, p. 11-19. doi:10.1007/s13225-014-0291-8

PANDEY, S.; SRIVASTAVA, S.N.; LAL, R.J. & TRIPATHI, R. 1999. Role of inoculum density and incubation period on saprophytic behaviour of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia bataticola*. *Indian Phytopathology*, 52(1), p. 56-58.

PARMETER, J.R. & WHITNEY, H.S. 1970. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: PARMETER, J.R., Jr. (Ed.) *Rhizoctonia solani*: biology and pathology. Berkeley: University of California Press, p. 7-19.

PLOETZ, R.C. 2007. Diseases of tropical perennial crops: challenging problems in diverse environments. *Plant Disease*, 91(6), p. 644-663.

PONTE, J.J. 1996. Clínica de doenças de plantas. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. p. 872.

QUINTAS, A.T. 1963. Novo material de apoio para cortes histológicos. *Rev Fac Agron UFRGS* 6: 51-55.

RILEY, M.B.; WILLIAMSON, M.R.; & MALOY, O. 2002. Plant disease diagnosis. *The Plant Health Instructor*. p. 10.

SCHROEDER, K.L.; MARTIN, F.N., DE COCK, A.W.; LÉVESQUE, C.A.; SPIES, C.F.; OKUBARA, P.A. & PAULITZ, T.C. 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Disease*, 97(1), p. 4-20.

SNEH, B.; BURPEE, L. & OGOSHI, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. St Paul, MN, USA: APS Press.

SNEH, B.; BURPEE, L. & OGOSHI, A. 1998. Identification of *Rhizoctonia* Species. St Paul, MN, USA: APS Press.

TAKASHI, N. & TADAO, U. 1978. Ecological and morphological characteristics of the sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kühn produced in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 10(6), p. 471-478.

THAL, W.M. & CAMPBELL, C.L. 1986. Spatial pattern analysis of disease severity data for alfalfa leaf spot caused primarily by *Leptosphaerulina briosiana*. *Phytopathology*, 76(2), p. 190-194.

THON, M.R. & ROYSE, D.J. 1999. Partial beta-tubulin gene sequences for evolutionary studies in the basidiomycotina. *Mycologia* 91: 468-474.

THORNTON, C.R.; O'NEILL, T.M.; HILTON, G. & GILLIGAN, C.A. 1999. Detection and recovery of *Rhizoctonia solani* in naturally infested glasshouse soils using a combined baiting, double monoclonal antibody ELISA. *Plant Pathology*, London, v. 48, n. 5, p. 627-634.

TOWNSEND, G.B. 1934. Bottom rot of lettuce. New York (Cornell) Agr. Expt. Sta. Mem. p. 158.

TRUJILLO, E.E. & SNYDER, W.C. 1963. UNEVEN DISTRIBUTION OF *FUSARIUM OXYSPORUM* F CUBENSE IN HONDURAS SOILS. *Phytopathology*, 53(2), p. 167.

VAN BENEDEN, S.; PANNECOUCQUE, J.; DEBODE, J.; DE BACKER, G. & HÖFTE, M. 2009. Characterisation of fungal pathogens causing basal rot of lettuce in Belgian greenhouses. *European Journal of Plant Pathology*, 124, p. 9–19.

VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*, Baarn, v. 21, p.1-242.

VILLA, N.O. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and b-tubulin gene sequences. *Mycologia*, v.98, n. 3, p. 410 – 422.

WAREING, P.W.; WANG, Z.N.; COLEY-SMITH, J.R. & JEVES, T.M. 1986. Fungal pathogens in rotted basal leaves of lettuce in Humberside and Lancashire with particular reference to *Rhizoctonia solani*. *Plant pathology*, 35(3), p. 390-395.

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

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

YANG, G. & LI, C. 2012. General description of *Rhizoctonia* species complex. INTECH Open Access Publisher.

#### 4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A metodologia proposta para determinação do tamanho ideal de amostras a serem realizadas no campo para a podridão de saia foi eficiente e poderá ser utilizada em estudos epidemiológicos posteriores nos campos de produção de alface do Distrito Federal, bem como também em outras regiões que possuam as características climáticas semelhantes ao DF;

De maneira geral, a podridão de saia é bastante presente no DF, sobretudo em épocas chuvosas. Isto é representado pelo fato de quase metade do total plantas avaliadas durante desenvolvimento deste trabalho, apresentarem sintomas típicos da doença. Dentre as grandes áreas avaliadas, a região Incra 9 foi a que teve maior prevalência da doença. Apesar da alta ocorrência desta doença em campos de plantios de alface no DF, pouco se conhece sobre os valores reais de perda econômica que esta doença causa. Espera-se, portanto, que este estudo pioneiro, sirva como de base para pesquisas posteriores envolvendo quantificações reais dos danos econômicos que esta doença causa no agronegócio do DF;

Este estudo comprova que a etiologia da podridão de saia é bastante complexa, envolvendo espécies distintas do gênero *Pythium* e diversos grupos de anastomose de *Rhizoctonia solani* bem como um AG de *Rhizoctonia* binucleada. Todos os isolados testados foram patogênicos em folhas de alface e tiveram diferentes níveis de agressividade. Dentro do conhecimento adquirido neste trabalho, esta é a primeira vez que a podridão de saia em alface está associada aos AGs AG4-HGI, AG4-HGIII, AG-A a nível nacional. Além disso, não se tem conhecimento sobre AG-A e AG4-HGIII causando esta doença em alface no mundo. As espécies *P. tracheiphilum*, *P. sylvaticum* e *P. nodosum* nunca foram detectadas no Brasil, em nenhuma cultura. Estes resultados são muito importantes para o controle da doença, visto que os *Pythium* (Reino Chromista) não são fungos verdadeiros e não são suscetíveis aos mesmos

princípios ativos e demais medidas de controle empregadas para o controle de *Rhizoctonia* (Reino Fungi). Além disso, os dados de agressividade poderão ser usados como screening para futuros estudos envolvendo melhoramento vegetal.