

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* OBTIDOS
DE CAMPOS DE PRODUÇÃO COMERCIAL NO ESTADO DE SÃO PAULO E
AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFACE**

AMANDA GRETTER FRIAS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP -
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Agronomia
(Horticultura)

BOTUCATU – SP
Setembro/2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* OBTIDOS
DE CAMPOS DE PRODUÇÃO COMERCIAL NO ESTADO DE SÃO PAULO E
AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFACE**

AMANDA GRETTER FRIAS

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan

Co-Orientadora: Profa. Dra. Denise Nozaki

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU – SP
Setembro/2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO- BOTUCATU (SP)

F897c Frias, Amanda da Gretter, 1990-
 Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum f.sp. lactucae* obtidos de campos de produção comercial no Estado de São Paulo e avaliação de genótipos de alface / Amanda Gretter Frias. - Botucatu : [s.n.], 2014
 ix, 45 f. : ils. color., tabs.

 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2014
 Orientador: Marcelo Agenor Pavan
 Coorientador: Denise Nozaki Inclui
 bibliografia

 1. *Fusarium oxysporum*. 2. Alface. 3. Fungos do solo.
I. Pavan, Marcelo Agenor. II. Nozaki, Denise. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* OBTIDOS DE CAMPOS DE PRODUÇÃO COMERCIAL NO ESTADO DE SÃO PAULO E AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ALFACE

ALUNA: AMANDA GRETTTER FRIAS

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

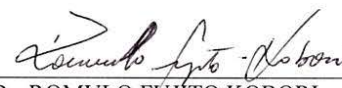
Aprovado pela Comissão Examinadora



Prof. Dr. MARCELO AGENOR PAVAN



Profª Dra RUMY GOTO



Prof. Dr. ROMULO FUJITO KOBORI

Data da Realização: 05 de setembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Célia Regina Gretter Frias e Mário Frias Junior, por terem me concedido a vida, por todo ensinamento, educação e compreensão. Por nunca medirem esforços para me ajudarem a me tornar uma pessoa melhor. Pelos momentos bons e ruins que estiveram ao meu lado, pelo incentivo de cada dia. Agradeço pelas inúmeras vezes que me enxergaram melhor do que sou, pela capacidade de me olharem devagar. Pelo apoio que sempre me deram e por acreditarem nos meus sonhos. Dedico este trabalho a vocês, meus pais por todo ensinamento, compreensão, preocupação, dedicação, amor, cumplicidade, companheirismo.

Aos meus queridos irmãos Gabriel Gretter Frias e Isadora Gretter Frias pelo amor, amizade, preocupação, por sempre me esperarem de abraços abertos e cheios de carinho. Por serem vocês, meus queridos e amados irmãos, por me ensinarem o amor sem medida.

Aos meus avós, José Gretter, Aldivina Garcia Gretter, Lucy de Mendonça Frias e Mário Frias Galego (*in Memoriam*), por todo amor e ensinamento transmitidos, por fazerem parte de alguma forma da concretização desse sonho.

Ao meu namorado, Lucas Asunção Zambolin, por toda compreensão ao longo de toda essa jornada, por sempre me incentivar e motivar. Pelo apoio, companheirismo e dedicação, por me ensinar a ver a vida de outra forma. Por seus conselhos, sua companhia. Por nossos momentos. Por ser quem é.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e por todas as graças concedidas,

À minha amiga:

As minhas queridas primas:

Edlayne Larissa Gretter Machado Pereira, pela amizade, apoio e companheirismo de sempre, pelas horas concedidas de conversas, conselhos e aprendizado. Por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos. Por me compreenderem.

E à Rafaela Gretter Machado, por acreditar sempre em meus meus sonhos e em mim. Por nossas conversas e nossos momentos de descontração. Por estar sempre disposta a me ajudar e ouvir.

Aos meus familiares, tios, tias:

Liamar Aparecida Gretter Machado, Francisco Benedito Machado, José Carlos Gretter, Rosângela Monteiro Gretter, Marcos de Mendonça Frias, Otília Tardin Frias, por toda contribuição ao longo destes anos, pela preocupação e motivação, vocês foram essenciais.

Ao meu primo Artur Francisco Pereira:

Pela disponibilidade em me dar caronas, por estar sempre pronto a me ajudar a retornar para casa.

Aos meus sogros:

Rosimeire Aparecida Asunção Zambolin e José Antônio Zambolin, pela amizade, por toda ajuda e compreensão.

Késsia Pantoja, pela amizade, apoio e companheirismo de sempre. Pelos momentos alegres e de descontração. Sua amizade foi essencial nesses anos em Botucatu. Pelos momentos tristes que dividimos. Pelos momentos em que perdi a paciência, e você veio com palavras amenas e me acalmou. Por estar sempre ao meu lado nessa jornada e pela ajuda nessa vitória.

Obrigada a todos por contribuírem para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

Também agradeço

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas – Campus de Botucatu, assim como ao Departamento de Horticultura, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

Ao meu Orientador e Professor Dr. Marcelo Agenor Pavan pela orientação, conselhos e apoio ao longo deste trabalho, sendo estes requisitos essenciais para minha formação profissional.

Ao Dr. Nobuyoshi Narita, meu primeiro orientador na vida acadêmica, pela orientação e apoio, pelos ensinamentos primordiais e pela grande contribuição no meu desenvolvimento profissional.

À Prof^a. Dr^a. Renate Krause Sakate pela ajuda e contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Dr Norberto da Silva, pelo fornecimento das mudas de alface, por todos conhecimentos transmitidos e todo apoio.

À Sakata Seed Sudamerica pelo apoio prestado e sementes fornecidas.

Aos colegas, Adelana Santos, Kamila Mônaco, Priscila Caetano, Camila Belini, Almecina Balbino, William Takata, pelos momentos de companheirismo e descontração.

Ao laboratorista José Marcelo Soman, por todo ensinamento e ajuda no desenvolvimento deste trabalho e ao funcionário Paulinho do Departamento de Proteção Vegetal.

Agradeço desta forma a todos que contribuíram para conclusão deste trabalho, muito obrigada!

“Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida.
Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e
amizade.”

Cora Coralina

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
1.RESUMO.....	1
2.SUMMARY.....	2
3. INTRODUÇÃO	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
4.1.Cultura da alface.....	7
4.2. Sistema de Produção da Alface	9
4.3. Doenças da Cultura da Alface	9
4.4. Gênero <i>Fusarium</i>	10
4.5. Murcha de Fusário	12
4.6. Resistência genética.....	17
5. MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1.Levantamento.....	23
5.1.1. Local da realização do trabalho	23
5.1.2. Coleta de isolados de plantas sintomáticas para caracterização dos isolados	23
5.2. Caracterização dos Isolados.....	24
5.2.1. Isolamento do Patógeno.....	24
5.2.2. Identificação dos Isolados	24
5.2.3. Determinação da Raça de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i>	25
5.3. Triagem de genótipos de alface às raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i>	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1. Identificação e caracterização de isolados.....	30
6.2.Avaliação de genótipo de alface a infecção de Folac raça 3.....	33
6. CONCLUSÕES.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Plantas apresentando sintomas característicos da infecção do Folac.....	24
Figura 2 Sintomas de escurecimento vascular em plantas de alface	25
Figura 3 Mudanças saudáveis utilizadas para realização de triagem de genótipos de alface.....	27
Figura 4 Plantas transplantadas e inoculadas com patógeno.....	29
Figura 5 A e B Fonte de inóculo do isolado mais agressivo raça 3.....	31
Figura 6 Aspecto da colônia formada pelo patógeno Folac	31
Figura 7 estruturas do patógeno visualizadas em microscópio óptico	32
Figura 8 Sintomas reproduzidos após a inoculação do patógeno Folac raça 3	33

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Reações das cultivares de alface às raças de Folac.....	26
Tabela 2 Relação de genótipos de alface, testados	28
Tabela 3 Resultados obtidos das reações dos isolados de Folac inoculados em cultivares diferenciadoras de raças.....	32
Tabela 4 Comportamento e genótipos de alface a infecção de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> raça 3	34

1. RESUMO

A murcha de fusário, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* é uma das doenças mais severas que atacam a cultura da alface em todo o mundo. Em 2011, foram encontrados em uma plantação de alface nos municípios de Capão Bonito e Campinas no estado de São Paulo, sintomas característicos do ataque do patógeno. Plantas sintomáticas foram coletadas para identificação do patógeno. Os exames em microscópio óptico revelaram a presença de macroconídios falcados de coloração hialina, microconídios hialinos unicelulares e testes de patogenicidade revelaram a presença de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. Efetuou-se o re-isolamento do patógeno, completando-se assim o Postulado de Koch. No total, foram encontrados 4 isolados patogênicos atacando plantas de alface. A partir dos isolados identificados, foram caracterizadas as variações patogênicas através de diferenciadoras de raça. Para esta finalidade foram utilizadas Patriot (suscetível às raças 1, 2 e 3), Costa Rica (resistente à raça 1; suscetível às raças 2 e 3), Summer Green (suscetível às raças 1 e 3; resistente à raça 2) e Banchu Red Fire (suscetível às raças 1 e 3, resistente à raça 2). Os resultados obtidos identificaram a ocorrência da raça 3 de Folac. Este é o primeiro relato de ocorrência desta raça no Brasil. A partir do isolado selecionado como sendo o mais agressivo, e caracterizado como pertencente a raça 3, realizou-se a triagem de genótipos de alface, afim de identificar fontes de resistência para uso em programas de melhoramento. No total de 63 genótipos testados apenas Onondaga, Itha ca, Sudenvil e JP-11 apresentaram-se como resistente a raça 3 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*; *Lactuca sativa*; caracterização de raças; resistência.

CHARACTERIZATION OF *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* OBTAINED OF COMMERCIAL FIELD PRODUCTION IN THE STATE OF SÃO PAULO AND EVALUATION OF LETTUCE GENOTYPES. Botucatu, 2014.

Dissertação (Mestrado em Agronomia / Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: AMANDA GRETTER FRIAS

Adviser: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

Co-Adviser: PROF^a. DR,^a. DENISE NOZAKI

2. SUMMARY

The fusarium wilt, caused by the soil fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. soil *lactucae* is one of the most severe diseases that attack lettuce crop worldwide. In 2011, were found in a planting lettuce in Capão Bonito and Campinas in São Paulo, symptoms characteristic of this pathogen. Symptomatic plants were collected for pathogen identification. The optical microscope examinations revealed the presence of hyaline staining falcate macroconidia, microconidia unicellular hyaline and pathogenicity tests revealed the presence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. We performed the re-isolation of the pathogen, there by supplementing the Koch's postulate. For this purpose were used: Patriot (susceptible to races 1, 2 and 3), Costa Rica (susceptible to races 2 and 3, resistant to race 1); Summer Green (susceptible to races 1 and 3; resistant to race 2) and Banchu Red Fire (susceptible to races 1 and 3, resistant to race 2). The results show the occurrence of race 3 of Folac. This is the first report of the case in Brazil. From the isolated selected as being the

most aggressive, and characterized as belonging to race 3 was held screening of lettuce genotypes in order to identify sources of resistance for use in breeding programs. From of 63 genotypes tested only Onondaga, Ithaca, Sudenvil and JP-11 were identified as resistant to race 3 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*; *Lactuca sativa*; characterization of the races; resistance.

3. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais consumida em diversos países do mundo. Vários problemas podem prejudicar sua produção, sendo eles: temperatura, umidade, pragas e doenças. Dentre os patógenos que atacam a cultura destaca-se *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *lactucae* (Folac) que é o agente causador da murcha de fusário na alface (MATUO e MOTOHASHI, 1967).

No segundo semestre de 2011, foram observados em plantas de alface lisa (*Lactuca sativa* L.), coletadas no município de Capão Bonito e região de Campinas no estado de São Paulo, sintomas de Folac. As plantas sintomáticas foram coletadas e examinadas para identificação do patógeno, confirmando a ocorrência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. Este fungo pode atacar as mudas em viveiro, causando murcha e morte. Os sintomas observados são: coloração marrom avermelhado, estendendo-se através dos vasos da raiz principal e espalhando-se pelo córtex das raízes. As plantas adultas afetadas mostram sintomas radiculares e vasculares similares, aos observados nas mudas. Um corte longitudinal mostra vasos de coloração escura. A folha da alface fica de um lado da planta amarela ou metade das folhas apresentam esta coloração e necrosam na periferia do limbo, consequentemente o crescimento das plantas é reduzido. Pouco se conhece sobre a epidemiologia do fungo. Estes sintomas são muito semelhantes com outras formas especializadas de *Fusarium*, que são parasitas vasculares de diversas plantas cultivadas. O patógeno é capaz de manter-se no solo graças a restos vegetais e aos seus clamidósporos de paredes grossas e resistentes. É dotado de hábitos de vida saprofítica, que permitem colonizar e sobreviver em diversos compostos orgânicos.

Após a germinação das hifas, do micélio e dos clamidósporos, pode penetrar na alface, por feridas naturais, como aqueles que estão presentes ao nível do ponto de emissão das raízes secundárias, ou através de várias alterações causadas por implementos contaminados, sementes infectadas, mudas com a presença do patógeno, deixando as plantas doentes. Uma vez na planta, alcança os vasos e os invade com seu micélio. Este fungo produz

clamidósporos e microconídios nos vasos e tecidos colonizados. A propagação pode ocorrer por equipamentos agrícolas contaminados, por restos vegetais, por solos infectados, mudas e sementes contaminadas. A poeira do solo contendo clamidósporos propaga-se facilmente pelas correntes de ar, bem como por pingos d'água. O fungo prefere temperaturas elevadas, seu ótimo térmico se situa ao redor dos 28°C. Nenhum produto ou método de controle curativo é capaz de controlar essa doença durante o cultivo. É bastante comum enterrar os resíduos vegetais no solo após a colheita, fato que aumenta a proliferação do patógeno, visto que os tecidos vegetais enterrados são colonizados abundantemente por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucue* que produzem numerosos clamidósporos.

Sendo assim a eliminação das plantas contaminadas ajudam a reduzir a quantidade de inóculo deixado nas parcelas. É preciso evitar produzir alface em terras já afetadas e realizar a rotação de culturas, que é uma medida para prevenir a aparição desta doença. Portanto, para que a rotação de cultura seja eficaz, a mesma deve ser suficientemente longa. A eficiência de desinfecção do solo não é muito efetiva, pois todos os fusários colonizam rapidamente os solos. As ferramentas usadas para o trabalho devem ser cuidadosamente desinfetadas antes de serem usadas em outras parcelas saudáveis. O método mais eficaz para controlar essa fusariose, consiste em utilizar cultivares resistentes. Infelizmente, para nosso conhecimento, nenhuma cultivar testada, tem se mostrado totalmente resistente a este patógeno.

Os isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* são agrupados em três raças (1,2,3) de acordo com sua reação sobre cultivares de alface (FUJINAGA et al., 2003). No Japão foi relatada a presença das três raças (FUJINAGA et al., 2001. 2003; YAMAUCHI et al., 2004). Em países como Itália, Portugal, Taiwan, Irã e Estados Unidos foi relatada a presença da raça 1 (PASQUALI et al., 2005). Recentemente também foi relatada a raça 3 em Taiwan (CHANG et al., 2011; citados por CABRAL, 2011).

De acordo com relatos de Garibaldi et al., 2004, a detecção da raça 1 em vários países distantes num período relativamente curto de tempo, sugere que a dispersão mundial deste patógeno foi feita através de sementes infestadas.

Desta forma, Cabral 2011, constatou a presença da doença em diversos estados produtores do Brasil, apesar de a mesma ter sido relatada pela primeira vez no país recentemente. Este fato é preocupante e alerta para a necessidade de um melhor controle fitossanitário de sementes importadas pelo Brasil, assim o uso destas sementes contaminadas podem causar grandes prejuízos aos produtores brasileiros, pois estas poderão

introduzir o patógeno em outras regiões do país e tornar a produção insatisfatória e antieconômica.

De acordo com trabalhos realizados Fuginaga et al (2001;2003), os quais foram encontradas as raças 1, 2 e 3 é possível observar e determinar as preferências climáticas das raças. Raça 1 e 2 de Folac tem preferência por temperaturas mais amenas, inversamente ocorre com a raça 3 de Folac, que mostrou que ocorre em temperaturas mais elevadas, ocorrendo em regiões com clima quente e úmido. Raça 3 Folac é amplamente patogênica às cultivares de alface cultivadas

O trabalho teve por objetivo caracterizar os isolados patogênicos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*, identificando as possíveis raças de ocorrência, bem como realizar a triagem de genótipos de alface visando a seleção de cultivares resistentes às raças de Folac., para posterior desenvolvimento de cultivares resistentes a estas raças identificadas.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Cultura da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.), pertencente à família *Asteraceae*, é uma planta originária de espécies silvestres ainda encontradas em regiões de clima temperado, no sul da Europa e na Ásia Ocidental. A planta é herbácea, delicada, com caule diminuto, ao qual se prendem as folhas. Estas são amplas e crescem em roseta, em volta do caule, podendo ser lisas ou crespas, formando ou não uma “cabeça”, com coloração em vários tons de verde ou roxa, conforme a cultivar (FILGUEIRA, 2002).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma espécie mundialmente conhecida e considerada a mais importante hortaliça folhosa. É consumida na dieta brasileira, principalmente na forma de saladas cruas, sendo considerada uma planta de propriedades tranquilizantes, com alto conteúdo de vitaminas A, B e C, além de cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K) e outros minerais (FERNANDES e MARTINS, 1999).

Dentre as hortaliças folhosas, a alface é uma das mais consumidas e cultivadas no país. Devido à alta perecibilidade e pouca resistência ao transporte, geralmente é cultivada próximo dos centros urbanos. Além das doenças, uma das limitações ao cultivo dessa hortaliça em regiões tropicais são as elevadas temperaturas. Caracteriza-se como uma espécie de clima temperado, sendo a temperatura o fator ambiental que mais influencia a formação de folhas e de cabeças de qualidade (LOPES., 2002)

A alface é considerada como uma das principais espécies, tanto do ponto de vista econômico, ocupando a sexta posição dentro das hortaliças, como de consumo, pois, em termos de volume de comercialização, ocupa a oitava posição (NADAL et al., 1986, citados por GOTO, 1998).

A evolução de cultivares e sistemas de manejo, tratos culturais, irrigação, espaçamentos, técnicas de colheita e de conservação pós-colheita e mudanças nos hábitos de alimentação impulsionaram o cultivo e tornaram à alface a hortaliça folhosa mais importante no país (RESENDE et al., 2007).

A área plantada com a cultura da alface é de 35.000 ha. Seu cultivo é feito de maneira intensiva e geralmente praticada pela agricultura familiar, sendo responsável pela geração de cinco empregos diretos por hectare. Até meados da década de 1980, o padrão da alface consumida no país era alface lisa, tipo 'White Boston', que atualmente corresponde a 10% do mercado. Posteriormente, houve uma mudança na preferência da alface lisa para o segmento crespo, tipo 'Grand Rapids', que atualmente representa 70%. A alface americana vem apresentando grande crescimento no Brasil, ocupando atualmente, mais de 15% do mercado (COSTA & SALA, 2005).

A alface americana, também denominada “Crisphead Lettuce” ou “Iceberg”, vem adquirindo importância no Brasil, em virtude da expansão das redes de “fast-food” (ALVARENGA et al., 2000; MADEIRA et al., 2000).

O solo ideal para o cultivo dessa hortaliça é o de textura média, rico em matéria orgânica e com boa disponibilidade de nutrientes. Para obter maior produtividade, é necessário o uso de insumos que melhorem as condições físicas, químicas e biológicas do solo. As maiores produções podem ser obtidas a partir da melhoria das características químicas e físico-química do solo, que podem ser obtidas com o acréscimo de doses crescentes de compostos orgânicos (SOUZA et al., 2005).

Atualmente, são cultivados diversos tipos que podem variar quanto ao formato, coloração, crocância, textura e aspecto da folha. Como alimento, a alface pode ser considerada fonte de fibras, vitaminas A e C, niacina, betacarotenos, folatos, cálcio, fósforo, magnésio e ferro, além de baixo valor calórico e propriedades calmantes (FERNANDES et al., 2002).

As temperaturas ideais para produção de folhas e cabeças de qualidade se situam em torno de 12 a 22°C (SILVA et al., 1999), sendo que temperaturas superiores a 22°C favorecem o florescimento precoce, antecipando a colheita (MOTA et al., 2003).

Filgueira (2002), agrupou as cultivares comercialmente utilizadas, considerando-se as características das folhas, bem como o fato de estas reunirem ou não, formando uma cabeça repolhuda, subdividindo-as em seis grupos: Repolhuda-Manteiga, Repolhuda-Crespa (Americana), Solta-Lisa, Solta-Crespa, Mimosa e Romana. O tipo Americana apresenta as folhas caracteristicamente crespas, bem consistentes, com nervuras

destacadas, formando uma cabeça compacta. É uma alface altamente resistente ao transporte e recomendada para o preparo de sanduíches, uma vez que resiste melhor ao contato com alimentos quentes.

4.2. Sistema de produção da cultura

Atualmente, existem pelo menos quatro sistemas produtivos de alface no Brasil: o cultivo convencional e o sistema orgânico em campo aberto; o cultivo protegido no sistema hidropônico e no solo (FILGUEIRA, 2003; RESENDE et al., 2007).

4.3. Doenças da cultura da alface

Segundo Filgueira (2002), a grande suscetibilidade da alface às doenças torna-se um fator de limitação na produção dessa hortaliça. São conhecidos aproximadamente 75 diferentes tipos de doenças, devendo ser evitado, o quanto possível, o uso de produtos tóxicos no controle fitossanitário, pois estes podem deixar resíduos ao consumidor.

Por tratar-se de uma hortaliça de inverno, o seu cultivo em outras épocas do ano, pode favorecer, em algumas regiões, a incidência de doenças e desequilíbrios nutricionais, principalmente, se as condições climáticas se caracterizarem por elevados índices pluviométricos e altas temperaturas. Por isso, a época de plantio mais recomendada é o final da estação chuvosa, sendo que nas regiões mais frias o cultivo pode ser realizado durante todo o ano, principalmente sob condição de cultivo protegido (YURI et al., 2004).

Doenças são um fator limitante para a produção de alface, quando as cultivares resistentes são indisponíveis. A natureza e a frequência dessas doenças dependem das condições locais. Mais de 75 doenças da alface já foram relatadas no mundo. São doenças transmissíveis causadas por fitopatógenos, tais como bactérias, fungos, nematoides e vírus. Além das transmissíveis, a planta de alface pode apresentar doenças não transmissíveis, geralmente não associadas ao clima, nutrição da planta, déficit hídrico e fitotoxicidade por agroquímicos (DAVIS, et al., 1997; LOPES et al., 2010).

As doenças, causadas por fungos habitantes do solo, são muito limitantes para o cultivo da alface. Essa limitação muitas vezes ocorre devido ao uso de áreas, através de cultivos sucessivos, sem rotação com outras culturas. *Pythium* spp. Paulitz & M. Mazzola, *Sclerotinia minor* Jagger, *S. Sclerotiorum* (Lib) de Bary, *Rhizoctonia solani* Khun e

Thilaviopsis basiloca (Berk & Broome) Ferraris são os patógenos radiculares que ocasionam os maiores prejuízos para cultura no país (PAVAN et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005; SALA., 2006; LOPES et al., 2010; citados por CABRAL, 2011). Esses patógenos infectam a semente, a raiz e o caule da planta, causando doenças que interferem na produtividade e na comercialização das plantas. Como resultado, há danos econômicos ao produtor (CABRAL, 2011).

Entre as principais doenças fúngicas da alface destaca-se a murcha de fusário, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (MATUO E MOTOHASHI, 1967). Esta doença foi relatada recentemente no Brasil, inicialmente no estado do Espírito Santo (VENTURA & COSTA, 2008). E, em seguida, em outros estados das regiões Sul e Sudeste do Brasil (CABRAL et al., 2009).

A podridão da raiz da alface, causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl f. sp. *lactucae* é um problema grave em alguns campos de alface em distritos do Japão. Uma doença semelhante denominada murcha de fusário da alface foi relatada nos Estados Unidos (HUBBARD & GERIK, 1993; MATHERON & KOIKE, 2003), Taiwan (HUANG & LO, 1998), e Itália (GARIBALDI et al. 2002).

Hubbard & Gerik, (1993) relataram este patógeno dos Estados Unidos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucum*. Recentemente, o agente causal, *F. oxysporum* f. sp. *lactucum*, foi pensado ser *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (FUJINAGA et al. 2003).

4.4. Gênero *Fusarium*

Os fungos do gênero *Fusarium* Link ex Fr. têm uma ampla distribuição geográfica, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes, ocorrendo, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas, embora algumas espécies tenham uma íntima associação com os hospedeiros (BURGESS et al., 1994).

A variabilidade do patógeno é relacionada a sua distribuição, como em *F. oxysporum*, *F. solani* e *F. equiseti*, estando possivelmente associada a sua ampla adaptação em diferentes ambientes, enquanto que outras de menor variabilidade, como *F. decemcellular*, *F. beomiforme* e *F. longipes*, teriam uma distribuição mais restrita a ambientes específicos (MENDES et al., 1998).

O principal objetivo da sistemática de fungos é organizá-los em grupos que facilitem a identificação das espécies e a relação entre elas, dependendo diretamente das informações disponíveis para análise. Tradicionalmente, os fungos são classificados em espécies de acordo com as características morfológicas. No entanto, estas análises, muitas vezes, não possibilitam distinguir a homologia e a convergência das espécies, principalmente no caso de fungos mitospóricos. As ferramentas para a identificação de fungos foram incrementadas ao longo dos últimos anos e incluem a utilização da microscopia ótica e eletrônica, o desenvolvimento de meios de cultura seletivos e diferenciais, a comparação de enzimas e metabólitos secundários, bem como, mais recentemente, o uso de tecnologias imunológicas e moleculares (LEAL-BERTIOLI, 1998).

Os critérios morfológicos são o primeiro passo na identificação das espécies de *Fusarium*, mas podem ser complementados com a utilização de métodos mais acurados, como, por exemplo, os baseados nas características genéticas. As descrições para a classificação de *Fusarium* têm base no uso de meios de cultura específicos e condições de cultura (crescimento micelial, pigmentação, estruturas e esporulação), a forma dos macroconídios, forma e modo de produção dos microconídios, e formação de clamidósporos (ausentes ou presentes) são critérios consistentes e necessitam do uso de meios de cultura especiais, também a morfologia das culturas e taxas de crescimento são usadas na identificação (NELSON et al., 1983; BURGESS et al. 1994).

O gênero *Fusarium* foi criado por Link em 1809 e, até o momento, não existe um sistema completo que possibilite a identificação das espécies de *Fusarium*. Atualmente, todos os sistemas de taxonomia têm como base a publicação de Wollenweber & Reinking (1935).

Analisando os sistemas, Nelson et al. (1983) apresentaram uma nova proposta para a identificação das espécies, tendo como base a experiência e a utilidade prática dos caracteres usados na identificação de *Fusarium*; nesse sistema, o número de espécies foi reduzido e as variedades e formas foram reagrupadas.

Fusarium oxysporum é considerado uma espécie heteromórfica, por não apresentar uma única origem filogenética. As múltiplas origens podem ter surgido a partir da associação de um fenótipo virulento com mais de um grupo de compatibilidade vegetativa e do polimorfismo do DNA existente dentro do complexo *F. oxysporum* (KATAN & KATAN, 1988; KIM et al., 1993; SKOVGAARD et al., 2001; JIMÉNEZ-GASCO et al., 2003; LORY et al., 2004; ABO et al., 2005).

A identificação de isolados patogênicos de *F. oxysporum* é baseada em testes de patogenicidade. A *forma speciales* é geralmente feita por meio de testes de patogenicidade em várias espécies de plantas, enquanto as raças são determinadas por ensaios de virulência em diferentes cultivares de uma única espécie de planta. Embora, esses bioensaios sejam muito eficazes são muito demorados e trabalhosos. Além disso, por causa da abundância de *forma speciales*, para a correta identificação, os isolados devem ser inoculados em um vasto número de espécie (CABRAL, et al. 2009).

4.5. Murcha de fusário

A murcha de fusário da alface, causada por *Fusarium oxysporum* Schechtend.; Fr foi relatada recentemente no Brasil, inicialmente no estado do Espírito Santo (VENTURA & COSTA, 2008). Em seguida, a doença também foi relatada nos estados de Minas Gerais e Santa Catarina, mas desta vez o patógeno foi identificado como *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* Matuo & Motohashi (CABRAL et al., 2009).

A fusariose ou murcha de fusário representa uma das ameaças mais recentes à cultura da alface no Brasil. A doença afeta de forma significativa a produtividade e a qualidade, podendo causar perdas superiores a 70% (TOFOLI et al., 2012).

De acordo com Tofoli et al., 2012, a fusariose da alface é uma doença de solo, desta forma o fungo penetra nas raízes através de aberturas naturais ou ferimentos e coloniza o sistema vascular das plantas dificultando a absorção de água e nutrientes. A obstrução do xilema causa, com o passar do tempo, a murcha, atrofia e morte das plantas. Na ausência de hospedeiros suscetíveis ou condições adversas, esse pode permanecer viável na área infestada por longos períodos através de estruturas de resistência denominadas clamidósporos ou, ainda, associado a restos de cultura ou matéria orgânica. Estudos têm evidenciado que o patógeno pode permanecer viável no solo por períodos de até 8 anos.

Conforme a doença progride, as folhas mais velhas podem entrar em colapso levando a morte da planta. Uma intensa cor acastanhada pode ser vista nos vasos vasculares de plantas doentes após seccionamento transversal da haste como resultado da reacção do hospedeiro à colonização e de produção de toxina por *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (Folac) (FUJINAGA et al, 2001;.. GARIBALDI et ai, 2004b;. SCOTT et al, 2010).

No campo, a fusariose afeta plantas ao acaso e pode ocorrer associada a outras doenças como a queima da saia (*Rhizoctonia solani*) e a marchadeira (*Thielaviopsis basicola*) (KATAN et al., 1970).

Esse patógeno vem se tornando importante justamente por ser um organismo do solo e colonizador do sistema vascular, podendo ser veiculado por sementes, restos culturais e movimento de solo de diversas naturezas (HILLOCKS & KIBANI, 2002).

Os sintomas de Folac são bem parecidos com o patógeno *Thielaviopsis basicola*. As plantas infectadas pelo patógeno apresentam lesões amarronzadas no sistema radicular, num estágio inicial. Com o passar do tempo, as lesões tornam-se mais escuras. Normalmente, as raízes laterais são destruídas e as plantas passam a emitir novas raízes, com conseqüente redução do desenvolvimento da planta (O'Brien & Davis, 2002). Nas horas mais quentes do dia ocorre a murcha da parte aérea, sintoma que é conhecido como marchadeira da alface. Assim como no Folac o melhor método para evitar e controlar a doença é o controle genético, sendo necessário a seleção de cultivares resistentes para realizar melhoramento genético (CABRAL et al., 2013).

Segundo Pasquali et al. (2005), nos últimos 30 anos, os isolados patogênicos *Fusarium oxysporum* Schlechtend, agentes causais da murcha de fusário em alface, foram relatados em muitos países (Japão, Estados Unidos, Taiwan, Iran, e Itália).

As reações diversas entre as cultivares à podridão radicular sugere que Folac (TSUCHIYA et al. 2004) possui raças patogênicas diferenciadas específicas para alface cultivares. Assim, raças 1 e 2 foram propostas em relatórios anteriores (FUJINAGA et al. 2001) com base na sua patogenicidade para cultivares diferenciais raciais e linhas. Identificação patogênica de raças de Folac é fundamentalmente necessária para os produtores de alface para escolherem as cultivares adequadas e para melhoristas desenvolverem cultivares resistentes a enfermidade.

A doença pode ser causada por três raças do patógeno, pois isolados do patógeno foram categorizados em raças 1, 2 (FUJINAGA et al. 2001) e 3 (FUJINAGA et al., 2003), de acordo com sua reação em cultivares diferenciais de alface. As raças fisiológicas são baseadas em sua patogenicidade nas cultivares diferenciais de raças, Patriot (suscetível a todas as raças), Banchu Red Fire (resistente à raça 2), Costa Rica (resistente à raça 1), Summer Green (resistente à raça 2) que são cultivares comerciais no Japão (FUGINAGA et al. 2003). Os quais constataram que é necessária a criação e cultivo de cultivares resistentes a todas as raças.

A ocorrência da fusariose é mais frequente no verão, quando prevalecem períodos com altas temperaturas e umidade. No Japão as três raças foram encontradas, sendo relatada por diversos autores (FUJINAGA et al., 2001, 2003; YAMAUCHI et al., 2004).

De acordo com Cabral et al., 2013, esta fusariose tem uma ampla distribuição geográfica sendo relatada no Japão (MATUO & MOTOHASHI, 1967), Estados Unidos (HUBBARD & GERIK, 1993), Taiwan (HUANG & LO, 1998), Irã (MILLANI et al., 1999), Itália (GARIBALDI et al., 2002) e Portugal (PASQUALI et al., 2007). Três raças de *Folac* foram identificadas e o Japão é o único país onde todas as três corridas estão presentes (FUJINAGA et al, 2003). (FUJINAGA et al, 2001;., 2003; YAMAUCHI et al, 2004.). Raça 1 é a mais difundida em todo o mundo com os relatórios da Itália, Portugal, Taiwan, Irã e os Estados Unidos (PASQUALI et al., 2005) e raça 3 foi relatado em Taiwan (CHANG et al., 2011).

As raças descritas por Fujinaga et al. (2001, 2003) são distribuídas em várias províncias no Japão. A doença causada pela raça 1 ocorreu em Nagano e Hokkaido, raça 2 em Nagano, e raça 3 em Shizuoka e Fukuoka. Especialmente em Nagano, o maior distrito de alface em crescimento no Japão, ocorreram surtos causados por raças 1 e 2 que gradualmente estão se tornando um problema sério. Por outro lado em outros países como Itália, Portugal, Iran, Estados Unidos foram encontrados apenas a raça 1 (PASQUALI et al., 2007; MCCREIGHT et al., 2005).

De acordo com Cabral., 2011, todos os isolados pertencentes a raça 1 de diferentes locais como Japão, Califórnia, Arizona e Brasil ficaram agrupados no mesmo clado, o que sugere uma origem comum. A raça 1 de *Folac* é mundialmente distribuída. Atualmente, raças 2 e 3 foram encontradas apenas em algumas regiões do Japão.

De acordo com estudos de Yamauchi et al., 2004, as raças 1 e 3 de *Folac* são amplamente distribuídas no Japão. A diferenciação racial de isolados de *Folac* foram realizadas com base na patogenicidade de cultivares de alface diferenciadoras de raças. Por outro lado, foram encontradas primeiramente uma gama diversificada de patogenicidade entre os isolados, incluindo os obtidos de cultivares de alface do tipo manteiga.

De acordo com Yamauchi et al., 2001b mostraram que 6 isolados de 6 localidades no Japão pertenciam a três grupos (1,2 e 3), de acordo com sua patogenicidade em quatro tipos de alface, neste sistema de diferenciação, os isolados de alface crespa caíram em ambos os grupos 1 e 3, já o tipo manteiga nos grupos 2 e 3.

O uso de sementes infectadas é considerado o modo mais importante de introdução e disseminação da doença. A introdução do fungo em áreas sadias é feita através do plantio de mudas e sementes infectadas. No campo, a transmissão da doença deve-se principalmente ao uso de implementos e ferramentas agrícolas infestados, água de irrigação, chuvas e circulação de pessoas e veículos. Para o manejo da fusariose recomenda-se a adoção de medidas que visem evitar o aparecimento da doença, reduzam o potencial de inóculo ou dificultem a sua disseminação (TOFOLI, et al., 2012)

Para prevenir a infestação de novas áreas de cultivo é preciso o uso de sementes sadias ou tratadas e mudas de boa qualidade. Em áreas já infestadas com o patógeno, a rotação de culturas deve ocorrer pelo menos a cada três anos, bem como a solarização do solo (MATHERON et al., 2003; LOPES et al., 2002).

O uso de cultivares resistentes de alface é uma das medidas mais importantes e eficazes para o controle desta doença. Cultivares de alface resistentes à raça 1, raça 2, ou ambas as raças têm sido descobertas e têm sido utilizadas para a obtenção de novas cultivares resistentes (GARIBALDI et al., 2004a).

Para obtenção de uma cultivar resistente a cada raça do patógeno, deve-se relatar a ocorrência de uma raça no campo infectando uma cultivar específica. No entanto, a identificação da espécie por meio da inoculação de cultivares diferenciais, é geralmente afetado pela virulência dos isolados e as condições, tais como temperatura, estágio de desenvolvimento da planta hospedeira, e quantidade de conídios no solo. Além disso, este método leva pelo menos duas semanas para determinar a etapa do isolamento (GARIBALDI, et al. 2002).

Apesar de todas estas medidas recomendadas para o controle da fusariose da alface, o método de controle mais eficiente e viável para o produtor é a utilização de cultivares com resistência genética. No entanto, nada se sabe sobre o nível de resistência à fusariose em cultivares de diferentes segmentos de alface cultivada no Brasil. Além disso, os lançamentos de novas cultivares pelos programas de melhoramento genético é uma constante, e é necessário avaliar e identificar os novos lançamentos em termos de resistência a patógenos radiculares de importância econômica para a alface, particularmente *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (CABRAL et al., 2009).

Pouco se conhece sobre a epidemiologia deste fungo, pois apresentam muitas semelhanças com outras formas especializadas de *Fusarium oxysporum*, que são parasitas vasculares de diversas plantas cultivadas. O fungo prefere temperaturas mais elevadas, e seu ótimo térmico se situa ao redor dos 28°C. Nos EUA esta doença é observada

principalmente no outono (HUBBARD & GERIK 1993). O patógeno sobrevive no solo na forma de clamidósporos (estruturas de resistência) e em restos culturais. (GARIBALDI et al., 2004b).

Após a germinação de seus clamidósporos, o fungo deve penetrar na alface, por aberturas naturais, como as que estão presentes no nível do ponto de germinação das raízes secundárias. Uma vez na planta, alcança vasos e os invade com seu micélio. As condições favoráveis para sua germinação são temperaturas mais elevadas. É comum a incorporação dos resíduos no solo após a colheita. Os tecidos vegetais enterrados são colonizados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* que produz muitos clamidósporos. A eliminação das plantas com o sistema de raiz infectado ajuda a reduzir a quantidade de inoculo no solo. É capaz de manter-se no solo graças a restos vegetais e a seus clamidósporos de paredes grossas e resistentes (BLANCARD, 2005).

O patógeno possui atividade saprofítica, que permite colonizar e sobreviver em diversos compostos orgânicos. Outras plantas suscetíveis ao hospedeiro, cultivadas ou não, não são conhecidas, ficando evidente que o patógeno não se adaptou a outras culturas (MILLANI et al. 1999).

O fungo sobrevive no solo na forma de clamidósporos (estruturas de resistência) e em restos culturais. (BALARDIN et al., 1990).

O controle da murcha de fusário pode ser obtido através de várias estratégias de manejo, como uso de sementes não contaminadas para evitar a introdução do patógeno na área de cultivo, mudas saudáveis, rotação de culturas por longos períodos, e a utilização de cultivares de alface com resistência ao patógeno. Dentro do manejo integrado, a resistência genética é um importante componente por ser uma tecnologia de baixo custo, efetiva e, conseqüentemente, fácil de ser adotada pelos agricultores, além de reduzir a contaminação do meio ambiente causada pelo uso indiscriminado de defensivos agrícolas. O primeiro passo de um programa de melhoramento visando à utilização da resistência genética consiste na identificação de fontes de resistência ao patógeno (PIZA, 1993; ROCHA-JUNIOR et al., 1998; SALA et al., 2001; ITO et al., 2002; SILVA et al., 2002, PEREIRA et al., 2008). Atualmente há poucas informações disponíveis na literatura sobre a resistência a fusariose entre as variedades usadas. O segundo passo é caracterizar e identificar as raças de ocorrência baseado nas cultivares diferenciadoras.

A maioria dos tipos de alface cultivados no Brasil (crespa, lisa, americana e mimosa) é suscetível à doença. Além da alface, a fusariose afeta também outra astereacea — a *Valerianella locusta*, conhecida também como alface de cordeiro. Sabe-se,

ainda, que o patógeno pode colonizar o sistema radicular de plantas de tomate, melão, melancia e algodão sem, no entanto, causar sintomas. (TOFOLI et al., 2012).

É capaz de manter-se no solo por longos períodos graças a restos vegetais e a seus clamidósporos de paredes grossas e resistentes. O patógeno pode atacar as plantas em canteiros, essas murcham e morrem. Observa-se uma alteração marrom-avermelhado que se estende desde os principais vasos de raiz, raízes e espalhando-se pelo córtex. As plantas adultas afetadas mostram sintomas radiculares e vasculares parecidos com os observados nas mudas. Um corte longitudinal mostram vasos de cor escura. Em consequência, as folhas amarelam, murcham e morrem. O crescimento das plantas podem ser reduzidos. Folac produz clamidósporos e microconídeos em vasos e sobre tecidos colonizados. O fungo é disseminado dentro e entre lavouras através do movimento de solo, fragmentos infectados de tecidos do hospedeiro, água de drenagem ou irrigação, restos vegetais, sementes contaminadas, homem e equipamentos agrícolas (SARTORATO & RAVA, 1994).

É de suma importância para o melhoramento desta cultura, o estudo dos efeitos do ambiente, sobretudo da temperatura, sobre os caracteres agronômicos e a forma como esses afetam a qualidade do produto final. A estimativa dos efeitos genéticos e ambientais sobre determinado caráter, bem como da herdabilidade e das correlações genéticas são de fundamental importância para o melhoramento de plantas (CRUZ, 2005).

4.6. Resistência genética

A resistência é definida como a habilidade de alguns acessos de uma espécie de planta sabidamente hospedeira de um patógeno de suprimir, reduzir ou retardar as injúrias e danos causados por este patógeno. A resistência é caracterizada pela sua natureza dinâmica e coordenada, onde efetividade depende da expressão dos seus mecanismos em uma sequência lógica, após o contato do patógeno em potencial com o hospedeiro. Mostra-se como um sistema multicomponente, onde o nível de resistência resulta da somatória das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (PASCHOLATTI & LEITE, 1995).

O termo raça fisiológica vem sendo utilizado para descrever os patógenos da mesma espécie, morfologicamente semelhantes e com mesma virulência. Patógenos de distintas raças fisiológicas apresentam diferentes níveis de virulência (KIMATI et al, 1997).

Segundo Bueno et al., 2001 as raças fisiológicas são identificadas ou diferenciadas pela reação que causam num grupo selecionado do hospedeiro cujos componentes são denominados variedades diferenciadoras. Em geral existem apenas dois tipos de reação: resistência e susceptibilidade. É muito importante para o melhorista conhecer as raças fisiológicas das principais doenças na cultura que ele está trabalhando. O aparecimento ou introdução de novas raças de um patógeno pode “quebrar” a resistência de uma cultivar a determinada doença. O melhorista precisa então introduzir novos 13 genes de resistência para essa nova raça fisiológica.

A resistência pode ser classificada de acordo com sua efetividade contra raças do patógeno. Segundo Van Der Plank (1963), existem resistências que são efetivas contra algumas raças do patógeno e resistências que são efetivas contra todas as raças. No primeiro caso, temos as resistências verticais, ao passo que no segundo caso temos as resistências horizontais.

O controle genético, na maioria dos casos, a resistência vertical é do tipo monogênica enquanto a resistência horizontal é do tipo poligênica. Durabilidade, de forma geral, a resistência vertical é de curta duração, pois os patógenos têm capacidade de quebrá-la, quando aparecem ou são introduzidas novas raças para as quais as cultivares não tem resistência. Já a resistência horizontal parece ser mais durável, pois ela se mantém mesmo com o aparecimento de novas raças do patógeno (BESPALHOK, et al 2007).

A resistência vertical, por ser efetiva apenas contra algumas raças do patógeno, age no sentido de reduzir a quantidade de inóculo inicial, fazendo com que o início da epidemia seja atrasado. Já a resistência horizontal, reduz a taxa de desenvolvimento da doença, sem afetar significativamente o inóculo inicial (KIMATI et al, 1997).

A resistência horizontal está presente em maior ou menor grau em todas as espécies de hospedeiros. Os genes que determinam este tipo de resistência não são específicos, mas sim genes que normalmente existem em plantas saudáveis, regulando os processos fisiológicos normais. A resistência horizontal tende a ser perdida quando as culturas são melhoradas para resistência vertical, ou quando elas são melhoradas sobre proteção de agroquímicos. Consequentemente, a maioria das cultivares modernas tem uma resistência horizontal consideravelmente menor que as cultivares de 1900s (BESPALHOK, et al 2007).

Os avanços da genética e epidemiologia têm proporcionado melhor entendimento das relações planta-patógeno, ficando evidente que esse tipo de relação envolve fatores genéticos de ataque e defesa presentes no patógeno e no hospedeiro, respectivamente, sob a influência do ambiente (FLOR, 1971).

Em muitos casos, a resistência é determinada por poucos genes que apresentam herança simples. No entanto, essa não é a regra. A resistência é na maioria das vezes poligênica ou de caráter quantitativo, envolvendo uma série de genes, com efeitos diferenciados, associados a um pronunciado efeito ambiente, o que leva a uma variação fenotípica contínua na reação do hospedeiro (ALZATE-MARIN et al. 2005).

De acordo com estudos de Flor 1971, sua hipótese se resume que para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona a avirulência. Essa interação ficou conhecida como teoria da interação gene a gene com teoria de gene a gene. Sendo assim, a resistência só ocorre quando o hospedeiro possui o gene de resistência (R) e o patógeno o gene de avirulência (V) correspondente. Qualquer outra situação resulta em susceptibilidade.

De acordo com Casela (2003), a resistência genética de plantas a doenças tem sido um dos principais pilares de sustentação da agricultura moderna. Essa estratégia é, ao mesmo tempo, o meio mais eficiente, econômico e seguro, do ponto de vista ambiental, de se controlar doenças de plantas. Atualmente, todos os alimentos consumidos pelo homem são provenientes, direta ou indiretamente, de cultivares resistentes de uma ou mais doenças através da resistência genética. Do ponto de vista do agricultor, a resistência genética é a medida de controle mais atraente, já que não requer nenhuma atividade extra durante o ciclo da cultura, é compatível com outras medidas de manejo, além de ser, muitas vezes, suficiente para o controle de determinada doença. Um dos principais problemas enfrentados por melhoristas e fitopatologistas é a manutenção da durabilidade da resistência genética a doenças, que pode ser, muitas vezes, "quebrada" ou reduzida pelo desenvolvimento de novas raças na população de patógenos capazes de se adaptarem à resistência presente em cultivares comerciais.

Durante a interação patógeno-hospedeiro ocorre a ativação do sistema de defesa da planta por vários meios, resultando na produção de substâncias tóxicas aos patógenos, impedindo o estabelecimento destes. Alguns compostos produzidos pelas plantas possuem ação antimicrobiana, enquanto outros restringem o desenvolvimento de patógenos pela formação de barreiras estruturais (OLIVEIRA et al., 2001)

Conforme Durrant & Dong (2004), a resistência sistêmica adquirida (RSA), caracteriza-se pela expressão de genes relacionados com a produção de proteínas PR (relacionadas com a patogênese), consideradas como importantes fatores na resistência de plantas a diversas classes de fitopatógenos, incluindo fungos, bactérias, vírus e oomicetos. Os genes envolvidos nas diferentes rotas de síntese de substâncias de defesa, assim como as

interações entre as rotas envolvendo o ácido salicílico (AS) e jasmonato/etileno, têm importância significativa no processo de sinalização que leva à RSA .

Segundo Alzate-Marin et al. (2005), no manejo integrado de doenças e pragas, uma das estratégias preconizadas é o uso de cultivares resistentes. Estas normalmente são desenvolvidas pela transferência de alelos de resistência de fontes exóticas e, muitas vezes, não adaptadas, para cultivares elite. Essa estratégia vem sendo usada com sucesso, em programas de melhoramento, há várias décadas. Devido à co-evolução entre hospedeiro e patógeno e o consequente surgimento de novas raças, as cultivares resistentes necessitam ser continuamente desenvolvidas. Essa é uma situação que faz parte da dinâmica da interação planta-patógeno e que precisa ser compreendida pelo melhorista.

O melhoramento para resistência a doenças é um dos principais objetivos do melhoramento. Isto porque o controle de doenças através do uso de variedades resistentes é o mais barato e de fácil utilização. Em algumas espécies, o controle de importantes doenças só é feito através da utilização de variedades resistentes. Por exemplo: ferrugens e carvões em cereais e cana-de-açúcar; murchas vasculares em hortaliças; e viroses na maioria das culturas (BESPALHOK, et al 2007).

Segundo Michereff (2001), três etapas básicas devem ser consideradas em qualquer programa de obtenção e utilização de variedades resistentes: 1) Identificar fontes de resistência, ou seja, identificar no germoplasma genótipos que possuam genes de resistência; 2) Incorporar estes genes em cultivares comerciais por meio dos métodos de melhoramento; 3) Após a obtenção de um cultivar resistente, traçar a melhor estratégia para que a resistência seja durável face à natureza dinâmica das populações patogênicas. Um dos problemas que os melhoristas têm que enfrentar é a variabilidade dos organismos fitopatogênicos (fungos, bactérias, vírus e nematóides).

De acordo com resultados do estudo de Cabral et al., 2011, No ensaio preliminar, nenhum dos acessos de alface apresentaram reação do tipo imunológico (doença zero), para o isolado Fus-173. Dos 104 acessos testados, 30 (incluindo os controles sensíveis) reagiram como suscetível (suscetibilidade alto ou médio). Deste grupo, 19 acessos (18,6%) foram classificados como altamente suscetíveis, com DI variando de 77,08% a 100%, 25 acessos (24,5%) foram classificados como moderadamente resistente com DI variando de 27,08% a 47,91% e 47 acessos (46,1%) eram altamente resistentes ao DI variando de 2,08% a 25%. Destes, 47 acessos foram preliminarmente considerados como fontes promissoras de resistência e potencialmente adequada para o plantio em áreas onde a doença está presente. No grupo de acessos suscetíveis, 19 cultivares pertenciam ao segmento "Manteiga". Da

mesma forma Garibaldi et al. (2004) avaliando 32 cultivares de alface de diferentes segmentos descobriram que sete cultivares (incluindo algumas Romana e tipo mimosa) eram resistentes à murcha de *Fusarium*, enquanto as cultivares de alface foram todos sensíveis. Estes resultados indicam que as cultivares não devem ser utilizadas em zonas onde ocorre fusariose vascular. Os dados obtidos, indicaram que, em cultivares gerais do segmento de Mimosa, Green Salad Bowl, Oak Leaf Saladin, Red Salad Bowl, Salad Bowl Roxo, Read Salad Bowl, Ultra Rosso, Mimosa Vermelha e Roxane foram altamente resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *Lactucae*, raça 1. Isto está de acordo com Scott et al. (2010), que descobriu que duas cultivares Mimosa (Lolla Rossa e Red Rossa) foram altamente resistentes à murcha de fusário, raça 1. Estes resultados indicam uma baixa variabilidade dentro do segmento de alface mimosa e sugere que todos eles podem ter uma origem comum. Portanto, a resistência de alface à raça 1 foi eficaz para os isolados dos EUA e do Brasil. Estas diferenças na resistência a cada isolado ocorrem provavelmente porque alguns cultivares e linhas podem ter uma resistência quantitativa, o que pode ser influenciada pelo ambiente.

Scott et al. (2010) observaram que as cultivares consideradas suscetíveis foram mais afetadas do que as cultivares com resistência intermediária, quando eles foram desafiados com uma maior concentração de inóculo. No entanto, quando a concentração de inóculo foi baixa não houve diferenças aparentes entre as plantas suscetíveis e resistentes.

Portanto, Cabral et al., 2011 constataram que a maior concentração de inóculo permitiu uma melhor resolução para a diferenciação de graus de susceptibilidade entre algumas cultivares. A agressividade dos isolados pertencentes à mesma raça, provenientes de diferentes regiões geográficas, podem mostrar diferenças na sua capacidade de causar doença. Estas diferenças entre os isolados também podem explicar as disparidades da resposta de resistência.

Entre as cultivares de forma altamente resistentes a Folac é a cultivar 'Pira Roxa', vermelha brilhante pertencente ao segmento de folha crocante. Esta cultivar foi criada no Brasil, e é resistente a outros importantes patógenos de alface como *Thielaviopsis basicola*, *Bremia lactucae* e *Lettuce mosaic virus*, patótipo II. Isto é reconhecido como a primeira cultivar de alface crespa tropical vermelha carregando resistência múltipla a doenças no Brasil (SALA & COSTA, 2005; SALA et al, 2008.).

Em estudos de Cabral et al., 2013 obtiveram como cultivares resistentes: Sofia, Romana Nova e Romana Paris foram altamente resistentes a todos os isolados do patógeno, enquanto Donna apresentou resistência intermediária à Fus-220 e

altamente resistente em relação aos demais. Os resultados obtidos foram semelhantes aos relatados por Matheron et al. (2005) em ensaios realizados em campos que foram naturalmente infestados com *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* no Arizona. Esses autores identificaram duas cultivares de alface do segmento de alface (Sluggar e Rei Louie), de 16 cultivares testadas, mostrando baixos níveis de doença e, portanto, considerava-os como resistentes ou tolerantes ao patógeno. Resultado semelhante foi obtido na Califórnia por Scott et al. (2010, 2012), que identificou três cultivares de alface romana resistentes (Caesar, floresta verde e Rei Henry) em ensaios de campo. Tal como observado para as cultivares do segmento mimosa, estes resultados também indicam uma baixa variabilidade genética dentro deste segmento de alface e sugere que todos eles têm uma origem comum.

A baixa durabilidade da resistência tem, em determinadas situações, prejudicado o desenvolvimento de cultivares com maior potencial de produtividade, visto que a maior parte dos esforços de um programa de melhoramento pode, eventualmente, ser direcionado para a substituição de cultivares cuja resistência já foi superada pelo patógeno. Entretanto, avanços obtidos no conhecimento sobre o comportamento de patógeno em comunidades de plantas têm aberto novas possibilidades para o manejo da própria resistência genética, permitindo o estabelecimento de sistemas hospedeiros - patógenos estáveis e com o mínimo de perdas na produtividade. As etapas básicas para um programa de melhoramento para resistência genética se baseia em: identificar fontes de resistência, incorporar genes de resistência em variedades comerciais, traçar melhor estratégia para manter resistência (BORÉM et al, 2005).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Levantamento

5.1.1. Local da realização do trabalho

Os trabalhos foram realizados no departamento de Proteção Vegetal - Defesa Fitossanitária, Laboratório de Micologia e casa de Vegetação da FCA “Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Botucatu.

5.1.2. Coleta de isolados de plantas sintomáticas para caracterização dos isolados

No segundo semestre de 2011, em novembro, foram observados em plantas de alface lisa (*Lactuca sativa* L.) cultivares: Bruna, Luísa e Estela; coletadas no município de Capão Bonito e na região de Campinas no Estado de São Paulo, sintomas de murcha, descoloração dos feixes vasculares seguidos de morte das plantas. Plantas doentes foram coletadas para análise, identificação e caracterização do patógeno conforme visualizado na figura 1.



Figura1: Plantas apresentando sintomas característicos de infecção do Folac
FONTE: arquivo da autora (2013)

5.2. Caracterização do Isolado

5.2.1. Isolamento do patógeno

Primeiramente foi realizado o isolamento do patógeno, o qual ocorreu em condições assépticas, recortando-se fragmentos das raízes e caule das plantas de alface que apresentavam sintomas de murcha e escurecimento vascular para posterior análise e identificação do patógeno, através de suas estruturas e sintomas no hospedeiro. Os pequenos fragmentos das raízes e caule apresentando sintomas de escurecimento vascular foram lavados em água corrente por 2 minutos, desinfestados com éter por 1 minuto, passados em detergente Twin por 1 minuto, lavados em água destilada e esterilizada por 30 segundos, e após secos ao ar, depositadas em pontos equidistantes em papel toalha. Após esse procedimento os fragmentos contendo o isolado foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata, dextrose e ágar) que é um meio nutritivo para desenvolvimento de fungos. As placas foram incubadas em estufa a 25°C que favorece o crescimento do patógeno, durante sete dias.

5.2.2. Identificação dos Isolados

Após o crescimento do fungo, foram retirados fragmentos dos isolados para preparação da lâmina para observar as estruturas do patógeno em microscópio óptico e também foram utilizados para realizar a inoculação em mudas saudáveis, para confirmação da patogenicidade.



Figura 2: Sintoma de escurecimento vascular em plantas de aface
Fonte: Arquivo da autora (2013)

A identificação e confirmação do patógeno ocorreram realizando a observação das estruturas do patógeno, baseado na cultura formada em meio de cultura, na análise das lâminas com o patógeno em microscópio óptico e reação das plantas após inoculação em cultivares de alface.

5.2.3. Determinação de raça de isolados de Folac

Foi realizada a identificação da raça dos isolados através de cultura monospórica e também o teste de patogenicidade na estufa, utilizando cultivares diferenciais. Na tabela 1, encontram-se as cultivares diferenciais citadas como: Patriot (3807), Costa Rica (3808), Summer Green (3809), Banchu Red Fire (3810) e suas respectivas reações as raças do patógeno. Estas cultivares diferenciadoras foram fornecidas pela empresa SAKATA Seed Sudamérica LTDA para realização deste trabalho.

Os quatro isolados (Folac-1; Folac-2, Folac-3, Folac-4) foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA-t) (T:tetraciclina) em placas de Petri que foram incubadas a 25 ° C durante 2 semanas. Suspensões conidiais foram

preparadas adicionando aproximadamente 5 ml de água esterilizada a cada placa de meio de cultura de BDA e raspando à superfície do ágar com uma lâmina de vidro. O inóculo foi ajustado na concentração de 10^6 conídios/mL foi utilizada para realizar a inoculação do patógeno nas mudas de cultivares diferenciadoras de alface. Os isolados de Folac foram inoculados em mudas de alface com 25 após a semeadura, sendo 5 mudas por isolado. As mudas foram retiradas das bandejas, realizando o corte nas raízes os quais foram colocadas na solução do inóculo por 1 minuto/cultivar.

De acordo com o método de Fuginaga et al. (2003), a determinação das raças de isolados ocorrem da seguinte forma, apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Reação as cultivares de alface às raças a Folac

Cultivar	Registro DAS	Raças de Folac		
		1	2	3
Patriot	3807	S	S	S
Costa Rica	3808	R	S	S
Summer Green	3809	S	R	S
Banchu Red	3810	S	R	S

Fonte: dados adaptados a Fuginaga et al (2003)

Após a inoculação do patógeno, ocorreu o transplante para vasos de 1 litro, os quais foram preenchidos com terra de barranco e substratos autoclavados. Para testemunha foram utilizados apenas imersão das raízes em água destilada. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e, após 25 dias da data de inoculação, foi realizado a avaliação de plantas com sintomas de escurecimento vascular foram avaliadas e o ocorreu o re-isolamento, a partir dos tecidos que apresentaram sintoma vascular para a confirmação da presença e patogenicidade, por meio da comparação dos isolados.

5.3. Triagem de genótipos de alface

O isolado caracterizado como sendo o mais agressivo foi escolhido para a realização da triagem de genótipos de alface (Tabela 2). No total foram inoculados 63 genótipos de alface, para testes de resistência.

A inoculação ocorreu realizando cortes nas raízes das mudas e após imersão em meio com água esterilizada, detergente Thwin. O isolado mais agressivo FOLac – 2, na concentração de 10^6 conídios/ml., foi utilizado e realizou-se a imersão das raízes da alface no meio por 1 minuto, sendo utilizadas 5 mudas por cada cultivar de alface testada. As mudas foram transplantadas em vaso de 1 litro contendo solo autoclavado. O solo foi preparado na proporção de 1:1:1 (terra de barranco + areia lavada+ esterco) com a adição de 250 g de 04-14-08 por m^3 de solo.

A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação utilizando as seguintes notas: 0 (saudável, sem sintomas), 1 (Folha amarelada ou necrosada), 2 (folha de necrose, nanismo e amarelada), e 3 (Plantas mortas). A severidade da doença foi calculada a partir da seguinte fórmula: $[n1 + (n2 + 2) + (n3 + 3)] / (n1 + n2 + n3)$, onde $n1$ é o número de plantas marcados como 1, $n2$ é o número de plantas classificados como 2, e assim por diante.



Figura 3: Mudanças saudáveis utilizadas para realização de triagem de genótipos de alface
Fonte: arquivo da autora (2013)

Tabela 2: Relação de genótipos de alface testados

Nº	nº dos acessos	Genótipos	Nº	nº dos acessos	Genótipos
1	3807	Patriot	34	12.30	Tiberius
2	3808	Costa Rica	35	12.31	Romana
3	3809	Summer Green	36	12.32	Sierra
4	3810	Banchu Red Fire	37	12.33	S-18
5	12.01	Lucy Brown	38	12.34	Ninja
6	12.02	Robinson	39	12.35	L-9851
7	12.03	Calona	40	12.36	Giselle
8	12.04	Classic	41	12.37	Capistrano
9	12.05	Vanguard-75	42	12.38	L-1998
10	12.06	Winterset	44	12.40	Kristine
11	12.07	Salinas-88	45	12.41	Crispino
12	12.08	Onondaga	46	12.42	G-Geen
13	12.09	Ithaca	47	12.43	Krizet
14	12.10	Raider Plus	48	12.44	Gallega
15	12.11	Desert Queen	48	12.45	Mignette
16	12.12	Sonoma	50	12.46	Anuenue
17	12.13	JP-11	51	12.47	B. Aswan
18	12.14	Sundevil	52	12.48	Brasil 48
19	12.15	Challenge	53	12.49	Floresta
20	12.16	Summer Time	54	12.50	Karina Regina
21	12.17	L-104	55	12.51	Aurea
22	12.18	L-109	56	12.52	Karina
23	12.19	Taina	58	12.53	Gloria
24	12.20	Ryder	59	12.54	Elisa
25	12.21	Lady	60	12.55	Leticia
26	12.22	L-1397	61	12.56	Transat
27	12.23	Blonde à Bord Rouge	62	12.57	Transat 2
28	12.24	Doree	63	12.59	Sabine
29	12.25	La Brillante	64	12.60	Hilde
30	12.26	King Henry	65	12.61	UCDM14
31	12.27	Pavane	66	12.62	Argeles
32	12.28	Valmaine	67	12.63	Mariska
33	12.29	Conquista Dor			

Fonte: dados da autora (2012-2013)



Figura 4: Plantas transplantadas e inoculadas com o patógeno
Fonte: Arquivo da autora (2013)

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Identificação e caracterização dos isolados

Todos os isolados apresentaram características morfológicas típicas do gênero *Fusarium*, ocorrendo produção de microconídeos, macroconídeos e clamidósporos. Através dos testes realizados com cultivares diferenciais de alface, os isolados patogênicos foram caracterizados como *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. Que é um patógeno de solo que transmite a murcha de fusário da alface. Esta fusariose é uma doença agressiva que causa severos danos e prejuízos em campos produtores de alface no Brasil e no mundo.

Segundo diversos autores, a podridão da raiz da alface ou murcha da alface, é causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl f. sp. *lactucae* (MATUO e MOTOHASHI 1967) é um problema grave em alguns campos de alface em distritos do Japão. A murcha de fusário da alface foi relatada nos Estados Unidos, Taiwan, e Itália. No Brasil o patógeno foi relatado recentemente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (CABRAL et al., 2009).

Análises em microscópio óptico revelaram a presença de macroconídios falcados de coloração hialina e microconídios hialinos unicelulares, conforme imagem a seguir.

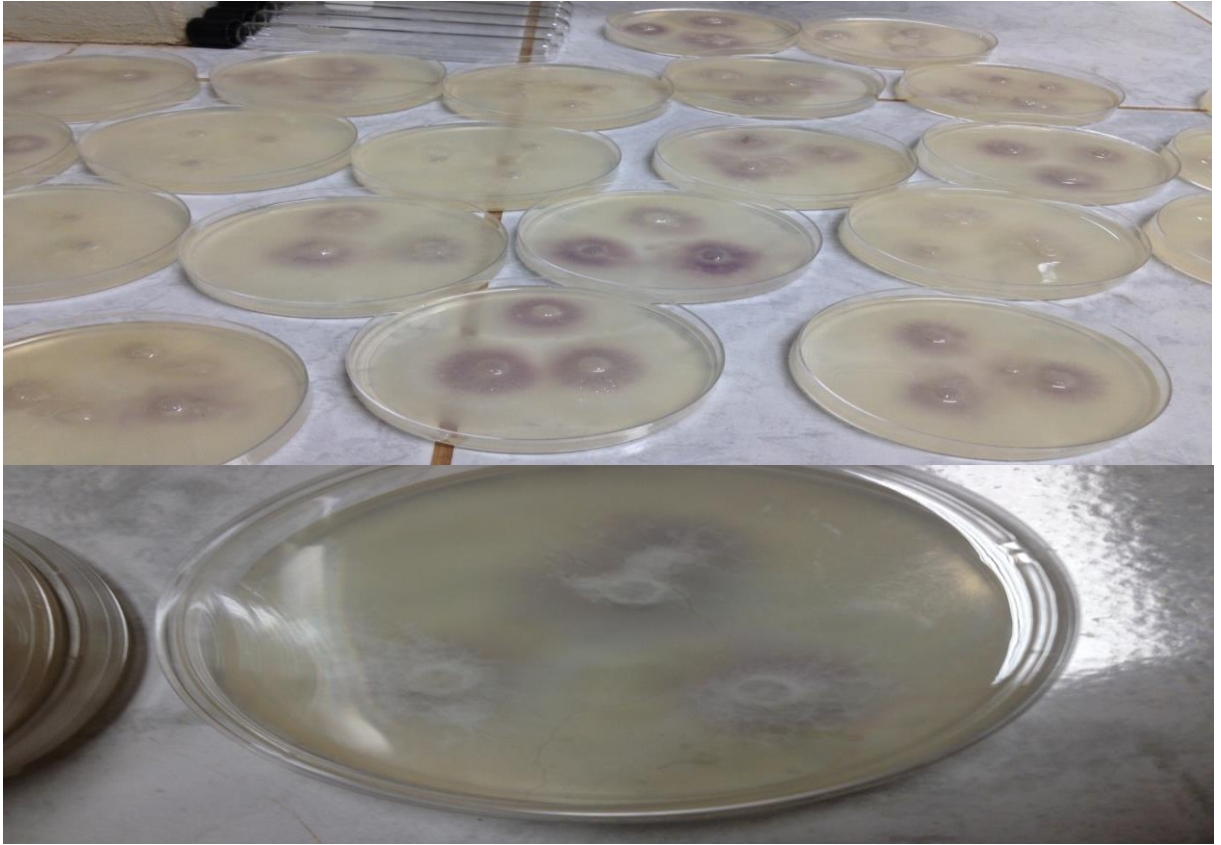


Figura 5: A e B: Fonte de inóculo do isolado mais agressivo raça 3
Fonte: Arquivo da autora (2013)



Figura 6: aspecto da colônia formada pelo patógeno
Fonte: Arquivo da autora (2013)

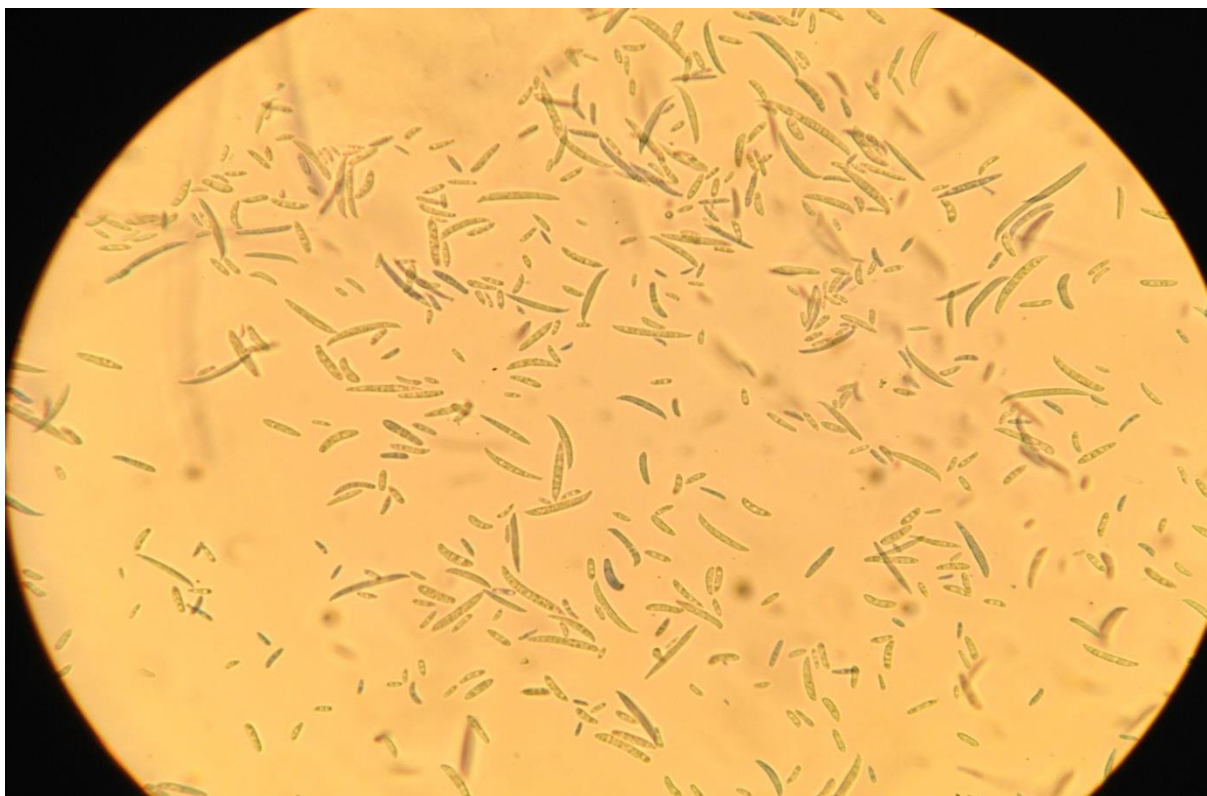


Figura 7: estruturas do patógeno visualizadas em microscópio óptico

Fonte: Arquivo da autora (2013)

Tabela 3: Resultados obtidos das reações dos isolados de Folac inoculados em cultivares diferenciadoras de raças.

CV	1	Reação Raças		Reação dos isolados			
		2	3	Folac A	Folac B	Folac C	Folac D
PATRIOT	S	S	S	S	S	S	S
C. RICA	R	S	S	S	S	S	S
S. GREEN	S	R	S	S	S	S	S
B. RED	S	R	S	S	S	S	S

Legenda: R- Resistente; S- Suscetível

Fonte: dados da autora (2013)

Após a identificação do patógeno como Folac atacando mudas de alface sistematicamente, foi realizado o teste com cultivares diferenciais para as raças que ocorrem no patógeno. Sendo assim, todos os isolados patogênicos se mostraram muito agressivos, causando sintomas de murcha, descoloração dos feixes vasculares seguidos de morte das plantas em todas as cultivares diferenciais, constatando-se assim a ocorrência da raça 3 do patógeno, sendo o primeiro relato desta ocorrência da raça no Brasil. Relatos de

ocorrência da raça 1 deste patógeno foi constatado por VENTURA & COSTA (2008) e CABRAL et al (2009).

As variadas reações em cultivares diferenciais para identificação da murcha de fusário, causada por *Folac* (TSUCHUYA et al., 2004) é diferenciada entre raças patogênicas específicas para cultivares de alface.

As raças 1 e 2 foram propostas por Fujinaga et al., 2001; no Japão baseado em sua patogenicidade nas cultivares diferenciais de raças.

O primeiro relato da ocorrência da raça 3 foi em Nagano, usando isolados coletados em Fukuoka (Japão) e na Califórnia (EUA) descobertos por Fujinaga (2003). Esta raça é predominante no Japão em regiões de produção mais quentes.



Figura 8: Sintomas reproduzidos após inoculação do patógeno *Folac* raça 3
Fonte: arquivo da autora (2013)

6.2. Avaliação de genótipo de alface a infecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* raça 3

Os resultados obtidos mostraram o quão agressivo é o isolado *Folac*-22, caracterizado com sendo da raça 3 do *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. Com base em

escala adaptada, na qual 0: são plantas sem sintomas, 1 plantas amareladas ou necrosadas, 2 plantas amarelas e necrosadas e 3 plantas mortas.

Tabela 4 Comportamento de genótipos de alface a infecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* raça 3.

Nº de Acesso	Classe	Notas	Reação
12-01	Lucy Brown	1	MR
12-02	Robinson	1	MR
12-03	Calona	1	MR
12-04	Classic	1	MR
12-05	Vanguard – 75	1	MR
12-06	Winterset	1	MR
12-07	Salinas – 88	1	MR
12-08	Onondaga	0	R
12-09	Ithaca	0	R
12-10	Raider Plus	1	MR
12-11	Desert Queen	1	MR
12-12	Sonoma	1	MR
12-13	JP-11	0	R
12-14	Sundevil	0	R
12-15	Challenge	1	S
12-16	Summer Time	1	S
12-17	L-104	1	S
12-18	L-109	1	S
12-19	Tainá	1	S
12-20	Ryder	1	S
12-21	Lady	1	S

12-22	L-1397	1	S
12-23	Blonde à Bord Rouge	2	S
12-24	Doree	3	S
12-25	La Brillante	3	S
12-26	King Henry	3	S
12-27	Pavane	2	S
12-28	Valmaine	2	S
12-29	Conquista Dor	2	S
12-30	Tiberius	3	S
12-32	Romana	3	S
12-32	Sierra	3	S
12-33	S-18	3	S
12-34	Ninja	2	S
12-35	L-9851	2	S
12-36	Giselle	3	S
12-37	Capistrano	2	S
12-38	L-1998	2	S
12-40	Kristine	3	S
12-41	Crispino	3	S
12-42	G-Geen	2	S
12-43	Krizet	2	S
12-44	Gallega	2	S
12-45	Mignette	2	S
12-46	Anuenue	2	S
12-47	B. Aswan	3	S
12-48	Brasil 48	3	S

12-49	Floresta	3	S
12-50	Karina Regina	3	S
12-51	Áurea	3	S
12-52	Karina	2	S
12-53	Gloria	2	S
12-54	Elisa	2	S
12-55	Letícia	2	S
12-56	Transat	3	S
12-57	Transat 2	2	S
12-59	Sabine	2	S
12-60	Hilde	3	S
12-61	UCDM14	2	S
12-62	Argeles	2	S
12-63	Mariska	2	S

S: Suscetível, R: Resistente, MR: média resistência

Fonte: dados da autora (2013)

Outro teste foi realizado para fazer a seleção das cultivares que demonstraram maior resistência ao patógeno. Foram confirmados os dados anteriores e o grau de severidade encontrado entre todas cultivares testadas foi de 1,0769. Assim as cultivares suscetíveis, que obtiveram pontuação acima de 1,07 foram descartadas para o futuro teste.

A identificação de cultivares comerciais com resistência a Folac raça 3 é um resultado positivo, pois estes estão disponíveis para uso pelos produtores de alface, sem a necessidade de um processo de criação de novas cultivares. Além disso, o cultivo de cultivares de diferentes segmentos com resistência ao agente patogênico, em uma rotação, pode ser uma alternativa para promover a redução do inoculo, pois esta prática pode minimizar a incidência / gravidade da doença. Como a maioria das cultivares não apresentaram resistência do tipo imunológico (sem doença), ainda é necessário combinar a resistência genética com outras medidas de controle da doença.

As cultivares selecionadas neste estudo, para futuro melhoramento genético de alface baseado na resistência ao patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* raça 3, foram: 12-08: Onondaga; 12-09: Ithaca, 12-13: JP-11 e 12-14: Sudenvil. Estas cultivares serão utilizadas como fonte de resistência à raça 3 e também úteis como diferenciadoras de raças do patógeno em questão.

De acordo com os resultados obtidos ao longo deste estudo, foram selecionadas cultivares que demonstraram resistência ao patógeno. Visto que, como citado por Fujinaga et al., 2003, a raça 3 de Folac é muito agressiva e as cultivares resistentes são poucas. É preciso realizar futuro melhoramento genético, com as cultivares que se mostraram resistentes, pois o patógeno tem alta adaptabilidade e especificidade ao hospedeiro. O melhor método de controle e combate ao fungo é a resistência genética, visto que outros métodos não se mostraram eficazes ao controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. Com o primeiro relato da raça 3 no Brasil ficou claro o alto grau de dispersão do patógeno. Assim é importante que sejam adquiridas sementes e mudas de alface livres do patógeno, realizar a rotação de cultura, manejar corretamente utensílios de campo que estejam contaminados com o patógeno, não plantar em áreas contaminadas por Folac, pois o mesmo vive como saprófita por longos anos na ausência do hospedeiro.

7. CONCLUSÕES

- *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* raça 3 é o agente causal e predominante nas regiões de Capão Bonito e Campinas, SP.
- É o primeiro relato da raça 3 do *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* em alface no Brasil;
- As cultivares Onondaga, Ithaca, JP-11 e Sudenvil foram resistentes ao Folac-raça 3, sendo selecionadas para futuro programa de melhoramento genético;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO, K. KLEIN, K.K. EDEL-HERMAN, V. GAUTHERON, N. TRAORE, D. STEINBERG, C. High genetic diversity among strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* from cotton in Ivory Coast. **Phytopathology**, St. Paul, v.95, n.12, p.1391-1396, Dec. 2005.
- ALVARENGA, M. A. R. et al. Crescimento, teor e acúmulo de macronutrientes em alface americana sob doses de nitrogênio aplicados no solo e de níveis de cálcio aplicados via foliar. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, p. 803-804, jul. 2000. Suplemento.
- ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G.; Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira** 30:333-342. 2005.
- BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M. Resistência de germoplasmas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira** 15:102-103, 1990.
- BESPALHOK, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Noções de Genética Quantitativa. In: BESPALHOK, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. Disponível em: www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo (2007). Acesso em agosto de 2014.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 2005.
- BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. In: BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. (ed). **Melhoramento de Plantas**. Lavras: UFLA, 2001. p.182-201.
- BURGESS, L.W.; SUMMERELL, B.A.; BULLOCK, S. GOTT, K.P. & BACKHOUSE, D. **Laboratory manual for *Fusarium* research**, Sydney, University of Sydney.1994.
- BLANCARD, D.; LOT, H.; MAISONNEUVE, B.; Enfermedades de las lechugas: Identificar, conocer, controlar. **INRA**. Ediciones Mundi-Prensa. 2005.
- CABRAL, C.S.; BRUNELLI, K.R.; CARVALHO, M.R.M.; SANTOS JUNIOR, W.R.; REIS, A. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* em alface no Brasil. **Tropical Plant Pathology** 34: S174, 2009.

CABRAL, C.S. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* das Regiões Sul e Sudeste do Brasil e identificação de acessos de alface resistentes. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal Rural de Pernambuco. (2011). Recife PE, Brasil.

CABRAL CS, REIS A (2013) Screening of lettuce accessions for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1. **Tropical Plant Pathology** 38:272-281.

CASELA, C.R. Variabilidade genética de patógenos e resistência a culturas. **VIII Seminário Nacional do Milho Safrinha**. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas. 2003.

CHANG, P.; LIN, Y.; LAI, P.; CHANG, T.; WAN, Y.; HUANG, J. Pathological and molecular race determinations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from Taiwan. **Phytopathology**, Saint Paul, vol.101(supl), n.6,p.s.31-p.s.31,2011.

COSTA, C. P. ; SALA, F. C. A evolução da alfavicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 1, jan./mar., 2005. Artigo de capa.

CRUZ CD. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa: UFV. 394p.2005

DAVIS, R.M.; SUBBARAO, K.V.; RAID, R.N.; KURTZ, E.A. (Ed). **Compendium of lettuce disises**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1997. 80p.

DURRANT, W.E. & DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology** 42:185-209. 2004.

FERNANDES, H. S.; MARTINS, S. R. Cultivo de alface em solo em ambiente protegido. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 200/201, p. 56-63, set./dez. 1999.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M.; Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 195-200, junho 2002.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: Editora UFV, 402p. 2002.

FILGUEIRA FAR. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV. 412p. 2003.

FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TUCHIYA, N.; SAITO, H. Physiological specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, a causal organismo of fusarium root roto f crisp head lettuce in Japan. **Journal of General Plant Pathology**. 67: 205-206. 2001.

FUJINAGA, M.; OGISO, H.; TUCHIYA, N.; SAITO, H.; YAMANAKA, S.; NOZUE, M.; KOJIMA, M. Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with comercial cultivars. **Journal of General Plant Pathology** 69: 23-28. 2003.

- FLOR, H.H. Current status of gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**.. 9:275-296. 1971
- GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. First report of *Fusarium oxysporum* on lettuce in Europe. **Plant Disease** 86:1052. 2002.
- GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Phytoparasitica, Bet Dagan**, v.32. n23, p.61-65, 2004a.
- GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L. Varietal Resistance of lettuce to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Crop Protection, Guildford**, v.23, p.845-851. 2004b.
- GOTO, R. A cultura de alface. In: GOTO R.; TIVELLI S. W. (Orgs.). **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. São Paulo: Fundação Editora da UNESP. p. 137-159. 1998.
- HILLOCKS RJ, KIBANI THM, 2002. Factors affecting the distribution, incidence and spread of fusarium wilt of cotton in Tanzania. **Experimental Agriculture** 38, 13–27 in Tanzania. *Experimental Agriculture* 38, 13–27.
- HUANG, J.H.; LO, C.T. Wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* in Taiwan. **Plant Pathology Bull** 7:150–153.1998.
- HUBBARD, J.C.; GERIK, J.S A new wilt disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucum* forma specialis nov. **Plant Disease** 77:750–754.1993.
- ITO, M.F.; POMPEU, A.S.; CARBONELL, S.A.M.; SALA, G.M. Seleção de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) com resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira** 27:304-304. 2002.
- JIMÉNEZ-GASGO, M.M.; MILGROOM, M.G.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. Genealogies support *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* as a monophyletic group. **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n.72-77, Jan. 2003.
- KATAN, J.; GREENBERGER, A.; ALON, H.; & GRINSTEN, A.; Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borne pathogens. **Phytopathology** 66:683-688. 1970.
- KATAN, T.; KATAN, J. Vegetative-compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* from tissue and the rhizosphere of cotton plants. **Phytopathology**. St. Paul, v.78 n:6, p. 852-855, June 1988.
- KIM, D.H.; MARTYN, R.D.; MAGILL, C.W. Mitochondrial DNA (mt DNA)- Relatedness among Formae speciales of *Fusarium oxysporum* in the cucurbitaceae. **Phytopathology**, St . Paul, v. 83, n.1, p. 91-97, Jan.1993.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, 774p.

LEAL-BERTIOLI, S.C. de M. O enfoque molecular na sistemática de fungos. **Rev. Anu. Patol. Plantas**. 6:197:230. 1998.

LOPES, S.J.; Modelos referentes à produção de sementes de alface sob hidroponia. 129 p. **Tese** (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2010. 68p.

LORI, G.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C. Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n.6, p. 661-668, June, 2004.

MADEIRA, N. R. et al. Fornecimento de nitrogênio, potássio e cálcio para alface americana via fertirrigação. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, p. 841-842.. Suplemento. jul.2000.

MATHERON, M.E.; KOIKE, S.T. First report of *Fusarium* wilt lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Arizona. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 1265. 2003.

MATHERON ME, MCCREIGHT JD, TICKES BR, PORCHAS M (2005) Effect of planting date, cultivar, and stage of plant development on incidence of *Fusarium* wilt of lettuce in desert production fields. **Plant Disease** 89:565-570.

MATUO, T.; MOTOHASHI, S. On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n. f. causing root rot of lettuce. **Trans Mycol Soc Jpn** 8:13–15. (1967)

MENDES, M.A.S.; SILVA, V.L. da; DIANESE, J.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; SANTOS, C.E.N. dos; GOMES NETO, E.; URBEN, A.F. & CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília, EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CENARGEN. 1998.

MCCREIGHT JD, MATHERON ME, TICKES BR, PLATTS B;. *Fusarium* wilt race 1 on lettuce. **HortScience** 40:529-531. 2005

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia** Recife, 12 de fevereiro. 133p. 2001.

MILLANI, M.J.; ETEBARIAN, H.R.; ALIZADEH, A. Occurrence of *Fusarium* wilt of lettuce in Shahr-ray, Varamin and Karaj. **Jornal Plant Pathol** 35:44. 1999.

MOTA JH; YURI JE; FREITAS SAC; RODRIGUES JUNIOR JC; RESENDE GM; SOUZA RJ. Avaliação de cultivares de alface americana durante o verão em Santana da Vargem, MG. **Horticultura Brasileira** 21: 234-237.2003.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. & MARASAS, W.F.O. ***Fusarium* species an illustrated manual for indentification**. University Park: The Pennsylvania State University Press. 1983.

O'BRIEN RG; DAVIS RD. *Black root rot of lettuce - dpi note*. Disponível em <http://www.dpi.qld.gov.au/horticulture/4759.html>. 20 de março de 2002.

OLIVEIRA, J.T.A., ANDRADE, N.C., MIRANDA, A.S.M., BARRETO, A.L.H., MELO, V.M.M., FERNANDES, C.F., VASCONCELOS, I.M., SILVEIRA, J.A.G., CAVALCANTI, F.R., FREIRE-FILHO, F.R., FREIRE, F.C.O. & GONÇALVES, F.J.T. Atividades peroxidásica e β -1,3 glucanásica elicítadas por agente bióticos causadores de doenças e pelo estresse hídrico em feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Anais: V Reunião Nacional de pesquisa de Caupi-V RENAC**, Teresina, PE. pp. 19-23. 2001.

PASCHOLATTI, S.F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO., KIMATI, H., AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**: Princípios e conceitos. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. Cap. 22, p. 417-453. 1995.

PASQUALI, M., DEMATHEIS, F., GILARDI, G., GULLINO, M. L., AND GARIBALDI, A. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. **Plant Dis.** 89:237-240.2005

PASQUALI M, DEMATHEIS F, GULLINO ML, GARIBALDI ;. Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. **Phytopathology** 97:987-996.2007.

PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; KUROZAUWA, C. Doenças da Alface (*Lactuca sativa*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN, F.A., CAMARGO, L.G.A. (ds). **Manual de Fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, v.2, p.27-33.

PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Estratégias para eficiência da seleção de feijoeiro comum quanto à resistência à murcha-de-fusário. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43:721-728. 2008.

PIZA, S.M.T. Patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e reação de germoplasma de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Summa Phytopathologica** 19:165-167. 1993.

RESENDE, F. V.; et. al. Cultivo de alface em Sistema Orgânico de Produção. Brasília, DF. **Circular Técnica**, Embrapa Hortaliças. 2007.

ROCHA-JUNIOR, W.C.; SANTOS, J.B.; MENDES-COSTA, M.C. Reação de cultivares e linhagens de feijão à *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira** 23:407-409.1998.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Murcha ou amarelecimento de Fusarium. In: Sartorato A, Rava CA (Eds.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília DF. EMBRAPA-SPI. pp.175-190.1994.

SALA, G.M.; ITO, M.F.; CARBONELL, A.S.M. Reação de cultivares de feijoeiro comum, recomendadas para o Estado de São Paulo, a raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica** 27:425-428. 2001.

SALA FC, COSTA CP (2005) 'PIRA ROXA': cultivar de alface crespa de cor vermelha intensa. **Horticultura Brasileira**. 23:158-159.

SALA, F.C. **Reação de alface** (*Lactuca sativa* L). a Thielaviopsis basicola (**BERK & Broome**) **Ferraris**. 2006. 103p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SILVA, E.C.; MALUF, W.R.; LEAL, N.R.; GOMES, L.A.A. Inheritance of bolting tendency in lettuce *Lactuca sativa* L. **Euphytica**, Wageningen, v. 109, p. 1-7, 1999.

SILVA, F.B.; BRUZI, A.T.; RAMALHO, M.A.P. Precisão experimental na avaliação de cultivares de feijão. **Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão** 7:288-291.2002.

SOUZA, P.A.; NEGREIROS, M.Z.; MENEZES, J.B.; BEZERRA NETO, F.; SOUZA, G.L.F.M.; CARNEIRO, C.R.; QUEIROGA, R.C.F. Características químicas de alface cultivada sob efeito residual da adubação com composto orgânico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n.3, p. 754-757, jul set.2005.

SCOTT JC, KIRKPATRICK SC, GORDON TR (2010) Variation in susceptibility of lettuce cultivars to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Plant Pathology** 59:139-146.

SCOTT JC, GORDON TR, KIRKPATRICK SC, KOIKE ST, MATHERON ME, OCHOA OE, TRUCO MJ, MICHELMORE M (2012) Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from Fusarium wilt in lettuce. **California Agriculture** 66:20-24.

SKOVGAARD, K.; NIRENBERG, H.I.; O'DONNELL, K.; ROSENDAHL, S. Evolution of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, n.12p. 1231-1237, Dec.2001.

TEIXEIRA-YANEZ, L.D.D. **Resistência genética, fungicidas e solarização para controle de Thielaviopsis basicola (BERK & Broome) Ferraris na cultura da alface (Lactuca sativa L)**. 2005. 104p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R.J.; FERRARI, J. T.; NOGUEIRA, E. M. C.; **Fusariose da alface: agente causal, sintomas e manejo 2012**. Disponível em < http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=168. Acesso em 18 de agosto 2012.

TSUCHIYA, K., 'URSEL, C. C. M. & NOZU, Y.. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies raised against Xanthomonas campestris pv. Mangiferae indicae. J. Gen. **Plant Pathol.** 70: 27.33.2004.

VAN DER PLANK, J.E. . Plant Disiases: Epidemics and Control. **Academic Press**, New York, NY,USA. 1963.

VENTURA, J.A.; COSTA, H.; Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on lettuce in Espirito Santo, Brasil. **Plant Disease** 92:976. 2008.

WOLLENWEBER, H. W. and REINKING, O. A. 1935. **Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekaempfung**. Verlag Paul Parey, Berlin.

YAMAUCHI N, SHIMAZU J, HORIUCHI S, SATOU M, SHIRAKAWA T. Physiological races and vegetative compatibility groups of butterhead lettuce isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokio, v. 67. P. 288-290, 2001b.

YAMAUCHI N, SHIMAZU J, HORIUCHI S, SATOU M, SHIRAKAWA T. Physiological races and vegetative compatibility groups of butterhead lettuce isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokio, v. 70. P. 308-313, 2004.

YURI, J.E.; RESENDE, G.M.; RODRIGUES JUNIOR, J.C.; MOTA, J.H.; SOUZA, R.J. Efeito de composto orgânico sobre a produção e características comerciais de alface americana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p. 127-130, jan-mar 2004.