



MARINA GUIMARÃES PACIFICO

**LEVANTAMENTO DE DOENÇAS DA ALFACE AMERICANA
EM MUNICÍPIOS DO SUL DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

LAVRAS-MG

2017

MARINA GUIMARÃES PACIFICO

**LEVANTAMENTO DE DOENÇAS DA ALFACE AMERICANA NO SUL DO
ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

Orientador

LAVRAS – MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pacífico, Marina Guimarães.

Levantamento de doenças da alface americana no sul do estado de Minas Gerais / Marina Guimarães Pacífico. – Lavras : UFLA, 2017.

63 p. : il.

Orientador: Edson Ampélio Pozza.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Epidemiologia. 2. *Lactuca sativa* L. 3. Ocorrência. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MARINA GUIMARÃES PACIFICO

**LEVANTAMENTO DE DOENÇAS DA ALFACE AMERICANA NO SUL DO
ESTADO DE MINAS GERAIS**

***SURVEY OF ICEBERG LETTUCE DISEASES IN THE SOUTH OF THE STATE OF
MINAS GERAIS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 02 de março de 2017.

Dra. Priscilla de Sousa Geraldino Duarte

UFLA

Dra. Sônia Maria de Lima Salgado

EPAMIG

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

Orientador

LAVRAS – MG

2017

A Deus.
A minha amada mãe, Rosana Pacífico,
E amado irmão, Afonso Augusto,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo...

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Edson Ampélio Pozza, pela orientação e ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia, pela amizade e momentos compartilhados.

Ao técnico do Laboratório de Epidemiologia, Silvio Calazans, por compartilhar todos seus conhecimentos sobre alface e total ajuda na execução deste projeto.

Aos amigos do Laboratório de Virologia pela calorosa recepção, total apoio e indiscutíveis ensinamentos que me proporcionam.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

A todos os funcionários da UFLA, pelos serviços prestados.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para concretizar esse sonho.

RESUMO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa de maior expressão, em área plantada e volume produzido. A produção nacional é de mais de 1,5 milhão de toneladas/ano. Uma das maiores dificuldades no cultivo da alface é a ocorrência de doenças, as quais prejudicam as folhas e o sistema radicular, impedindo absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, reduz a qualidade e produtividade da lavoura. A fim de amenizar os prejuízos ocasionados por fitopatógenos, é necessário estabelecer programas eficientes de manejo de doenças, cujo alicerce está no correto diagnóstico das principais doenças e em conhecer seu progresso espaço temporal. Assim, objetivou-se com esse trabalho realizar o levantamento da ocorrência de doenças ao longo do tempo e estabelecer sua relação com variáveis ambientais. O experimento foi conduzido em sete propriedades situadas entre as regiões de Três Pontas (MG) e Boa Esperança (MG), em produtores da alface tipo americana. Foram realizadas coletas a cada 30 dias, percorrendo todos os lotes de cada propriedade, durante um ano, abrangendo assim, os seis ciclos da cultura e as doenças ocorridas no verão e no inverno. No total, foram encontradas 13 doenças afetando a cultura da alface. As doenças de etiologia bacteriana representaram 39%, as fúngicas 34%, as viróticas 19% e os nematoides 8%. Entre os nematoides encontrados, *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* estavam presentes em 42,85% das propriedades, enquanto *M. arenaria* em 28,57%. O total de relatos de ocorrências foram 1226, sendo a Mancha bacteriana a de maior frequência (24,7%) e 303 relatos. O vira-cabeça, foi a segunda doença mais relatada (233), com ocorrência de 19%, porém sempre observado ao longo do ano e nos lotes mais novos de 7 a 14 DAT (dias após transplântio). As espécies de *Tospovirus* encontradas nas sete propriedades foram TCSV e GRSV. E, não foram encontrados *Tospovirus* em plantas no viveiro. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians* ocorreu em elevadas frequências ao longo do ano, no entanto as menores frequências foram observadas em baixas temperaturas. As maiores frequências de ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* foram em temperaturas baixas.

Palavras-chave: Epidemiologia. *Lactuca sativa* L.. Ocorrência. Sazonalidade.

ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is the most abundant leafy vegetable, in planted area and volume produced. Domestic production is more than 1.5 million tons / year. One of the greatest difficulties in lettuce cultivation is the occurrence of diseases, which damage leaves and the root system, preventing absorption of water and nutrients and consequently, reduces the quality and productivity of the crop. In order to mitigate the damage caused by plant pathogens, it is necessary to establish efficient disease management programs, whose foundation is in the correct diagnosis of the main diseases and to know their temporal progress. Thus, this study aimed to survey the occurrence of diseases over time and establish their relationship with environmental variables. The experiment was conducted in seven properties located between the regions of Três Pontas (MG) and Boa Esperança (MG), in iceberg lettuce producers. Collections were done every 30 days, covering all lots of each property, for a year, covering the six cycles of the crop and diseases occurring in summer and winter. In total, 13 diseases affecting lettuce culture were found. Diseases of bacterial etiology represented 39%, fungi 34%, viruses 19% and nematodes 8%. Among the nematodes found, *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* were present in 42.85% of the properties, while *M. arenaria* in 28.57%. The total number of occurrence reports was 1226, with Bacterial leaf spot being the most frequent (24.7%) and 303 reports. Spotted wilt was the second most frequently reported disease (233), occurring at 19%, but always observed throughout the year and in the younger lots of 7 to 14 DAT (days after transplanting). The species of *Tospovirus* found in the seven properties were TCSV and GRSV. In addition, no *Tospovirus* were found in plants in the nursery. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians* occurred at high frequencies throughout the year, however the lower frequencies were observed at low temperatures. The highest frequencies of occurrence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* were in cold seasons.

Keywords: Epidemiology. *Lactuca sativa* L.. Occurrence. Seasonality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Local das propriedades situadas entre as regiões de Três Pontas (MG) e Boa Esperança (MG).....	20
Figura 2 - Ocorrência de doenças em relação ao total de 13 encontradas nas sete propriedades em municípios da região sul de Minas Gerais.	27
Figura 3 - Frequência de ocorrência das doenças em relação ao total de 1226 observações nas sete propriedades.....	28
Figura 4 - Porcentagem de ocorrência das doenças viróticas dentro de seu grupo etiológico.	29
Figura 5 - Gel de agarose dos produtos da RT-PCR utilizando os pares de primers: A - Nv2 e Nvc2, para detecção de TCSV com banda amplificada de 519 bp.	30
Figura 6 - Gel de agarose dos produtos da RT-PCR utilizando os pares de primers: A - N5 e N3, para detecção de CSNV.	31
Figura 7 - Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando os pares de primers: A - LBCP1 e LBCP2, para detecção de LBVaV; B- MiCP1 e MiCP2 para detecção de MLBVV.	32
Figura 8 - Perfil fenotípico da esterase representando as espécies de <i>Meloidogyne</i> em cada propriedade 1 – 7.	33
Figura 9 - Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o par de <i>primers</i> PscHrc662F e PscHrc751R, para detectar <i>Pseudomonas cichorii</i>	34
Figura 10 - Porcentagem de ocorrência das espécies de bactérias dentro de doenças de etiologia bacteriana.	35
Figura 11 - Porcentagem de ocorrência das espécies de fungos dentro do grupo etiológico fúngico.	36
Figura 12 - Frequência e número de registros para todos os agentes etiológicos observados na cultura da alface americana em municípios do sul de Minas Gerais.	38
Figura 13 - Frequência de ocorrência de espécies de fungos de solo e foliares, médias mensais das variáveis climáticas, temperatura mínima, média e máxima, umidade relativa (UR) e precipitação acumulada.	40

Figura 14 - Frequência de ocorrência de espécies de bactérias, vírus e nematoides, médias mensais das variáveis climáticas, temperatura mínima, média e máxima, umidade relativa (UR) e precipitação acumulada.....	43
Figura 15 - Frequência de ocorrência dos gêneros de fungos de solo e foliares distribuídos de acordo com idade dos lotes.....	46
Figura 16 - Frequência de ocorrência das espécies bacterianas, doenças viróticas e <i>meloidogynoses</i> distribuídos de acordo com idade dos lotes.....	48
Figura 17 - Gel de agarose dos produtos da RT-PCR utilizando os pares de <i>primers</i> : A - N5 e N3, para detecção de CSNV; B- Glyco4vc e Glyco5v para detecção de GRSV.....	52
Figura 18 - Gel de agarose dos produtos da RT-PCR realizado em mudas de alface, utilizando os pares de <i>primers</i> : A -Nv2 e Nvc2, para detecção de TCSV; B- 723 e 722 para detecção de TSWV.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Indicação das áreas experimentais georreferenciadas nos municípios, respectivos cultivares e produtores de alface americana.	19
Tabela 2 – Literatura específica para determinar as espécies fúngicas de cada gênero.	22
Tabela 3 – Pares de <i>primers</i> , temperatura de anelamento testadas para identificação e comprovação de espécies viróticas e tamanho das bandas a serem amplificadas.	25
Tabela 4 – Ocorrência e distribuição das espécies de <i>Meloidogyne</i> nas propriedades avaliadas.	33
Tabela 5 – Espécies de fungos identificadas e o nome de suas respectivas doenças.	36
Tabela 6 – Ocorrência e distribuição das espécies de fungos nas propriedades avaliadas.	37
Tabela 7 – Relato da primeira ocorrência dos patógenos de acordo com os lotes de idade das plantas de alface definidas de 7 a 56 dias após transplântio durante os meses de avaliação das doenças.	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Origem e características morfológicas da alface	14
2.2	Levantamento da ocorrência de doenças	14
2.3	Sazonalidade de doenças na alface	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Local do experimento e coleta das amostras	19
3.2	Coleta de dados climáticos	21
3.3	Identificação de doenças fúngicas	21
3.4	Identificação de doenças bacterianas	22
3.5	Identificação de doenças viróticas	23
3.6	Identificação de fitonematoides nas amostras sintomáticas	25
3.7	Análise dos dados	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Frequência da ocorrência de doenças e patógenos em alface americana no sul de Minas Gerais	27
4.2	Doenças viróticas	28
4.3	Nematoides	32
4.4	Doenças bacterianas	34
4.5	Doenças fúngicas	36
4.6	Sazonalidade de doenças e patógenos em alface americana em municípios do sul de Minas Gerais	38
4.7	Relação entre as fitodoenças e a idade das plantas de alface nos lotes avaliados ...	46
5	CONCLUSÕES	53
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais consumida no mundo, em área plantada e volume produzido. Segundo a FAO (2017), a produção mundial foi de 24,9 milhões de toneladas anuais, sendo a China o principal produtor com 13,7 milhões de toneladas (54% da produção mundial), seguida dos Estados Unidos e Índia com 4 e 3,5 milhões de toneladas, respectivamente.

No Brasil, existem aproximadamente 66.301 propriedades produtoras de alface, com área total plantada de 80.000 ha, capazes de gerar cinco empregos diretos/ha. A produção nacional é de mais de 1,5 milhão de toneladas/ano, permanecendo atualmente, entre os seis vegetais mais importantes economicamente e o oitavo maior em termos de volume produzido (SALA; COSTA, 2012). Entre os estados produtores, Minas Gerais é responsável por 30 mil toneladas, com produtividade de 23 toneladas/ha (SNA, 2015), sendo a região sul do estado, uma das principais produtoras da alface tipo americana, destinada a atender às redes de “fast food” e lanchonetes (EMATER, 2014). Esse tipo de alface é preferido em consequência de manter-se crocante, mesmo em contato com altas temperaturas, no interior de sanduíches, além de apresentar maior durabilidade pós-colheita (DECOTEAU et al., 1995). O ciclo da cultura varia de até 45 dias no verão e 63 dias no inverno.

No entanto, sua produção pode ser drasticamente reduzida tanto em quantidade quanto em qualidade, em razão da ocorrência de doenças, desde o sistema radicular até as folhas, favorecendo perda de qualidade e de produtividade da lavoura (FILGUEIRA, 2008). Mais de 75 doenças já foram relatadas em alface no mundo, tendo como agentes etiológicos fungos, bactérias, vírus e nematoides. Embora a grande maioria das doenças relatadas em espécies sejam de etiologia fúngica (AGRIOS, 2005), na alface prevalecem as viróticas e, no Brasil, grande parte ainda não está presente ou não foi detectada (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010).

Para amenizar os prejuízos ocasionados por esses fitopatógenos, é necessário estabelecer programas eficientes de manejo de doenças, cujo alicerce está no correto diagnóstico das principais doenças (SCHUMANN, D'ARCY, 2010) e em conhecer seu progresso espaço temporal (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Sendo assim, considera-se fundamental obter informações sobre a importância das doenças, a fim de realizar medidas preventivas de manejo, corretas aplicações dos produtos fitossanitários, monitorar flutuações nas suas intensidades e verificar a eficiência e a aceitação de práticas recomendadas de controle (KING, 1980; SILVA et al., 2007). Dessa forma, o produtor realizará o manejo da doença diagnosticada corretamente, no momento certo, de

forma a reduzir o impacto ambiental, financeiro e social das medidas adotadas no agroecossistema de sua região.

Em decorrência disso, a diagnose correta associada aos aspectos epidemiológicos e o manejo dessas doenças poderão oferecer subsídios a pesquisas mais abrangentes, e também, a cadeia produtiva, tornando-a mais eficiente. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivos realizar o levantamento da frequência da ocorrência de doenças e da sua sazonalidade no cultivo de alface americana nos municípios do sul do estado de Minas Gerais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem e características morfológicas da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) pertence à ordem Asterales e família Asteraceae. Possui origem mediterrânea, é cultivada desde a Roma Antiga e foi introduzida na Europa por intermédio dos próprios romanos (DAVIS; SUBBARAO; KURTS, 1997). Difundiu-se rapidamente para a França, Inglaterra e toda a Europa. Tornou-se expressiva economicamente graças ao seu ciclo curto e a alta produtividade, além de ser cultivada durante o ano todo, no campo ou ambientes protegidos. Os portugueses a introduziram no Brasil em 1647 (RYDER; WHITAKER, 1976; CASALI et al., 1979). Entre os diversos grupos de alface, destaca-se a do tipo americana, introduzida no Brasil, na década de 80, com a finalidade de atender às exigências dos consumidores e das redes “fast food” (ABCSEM, 2015).

A alface tipo americana possui caule curto, no qual estão inseridas as folhas, semelhante ao repolho, com cabeça compacta, folhas imbricadas, nervuras salientes, aspecto crocante, sabor agradável e maior durabilidade pós-colheita, ou seja, maior capacidade de transporte e armazenamento. Além disso, as folhas externas são de coloração verde-escura e a parte interna apresenta cor clara, sendo creme-amarelada. A raiz pivotante pode atingir até 60 cm de profundidade, e as ramificações finas, curtas e superficiais atingem os 25 cm de profundidade (YURI et al., 2002). Em razão de boa parte dessas características, é consumida na forma de saladas, graças ao seu método simples e rápido de preparo. Entre as variedades de alface de maior consumo destaca-se a tipo americana, também conhecida como ‘iceberg lettuce’ a qual, possui 95,5% de água, constituindo importante fonte de fibras insolúveis e minerais, como potássio, ferro, cálcio, e vitamina K (USDA, 2014). Entretanto, essa composição também a torna fonte de água e nutrientes para patógenos de diferentes etiologias.

2.2 Levantamento da ocorrência de doenças

As doenças de plantas possuem diversos agentes etiológicos, destacando os fungos, as bactérias, os vírus e os nematoides. Estima-se em 70% as doenças de etiologia fúngica em grandes culturas, potencialmente capazes de reduzir a produtividade e causar perdas (AGRIOS, 2005).

As doenças são um obstáculo à produção de hortaliças, podendo comprometê-las completamente, embora várias vezes, o produtor as negligencie (DAL SOGLIO, 2004). Logo, a diagnose inicial torna-se importante com a finalidade de estabelecer estratégias de controle eficazes. Porém, os produtores, consultores e pesquisadores encontram grande dificuldade em

associar alguns tipos de sintomas com a etiologia da doença. Até mesmo, na diferenciação entre os sintomas de origem abiótica (deficiência nutricional, estresse hídrico, fitotoxidez e outros), dos bióticos (fungos, bactérias, nematoides, vírus, entre outros) (POZZA et al., 1999; TALAMINI et al., 2003).

Os dados de levantamento permitem realizar trabalhos de pesquisa com interesse em avaliar a importância da doença, em constituir fonte importante sobre os dados de ocorrência, frequência e distribuição geográfica de fitopatógenos e ser a base de trabalhos iniciais e relevantes com o propósito de desenvolver projetos futuros de controle, epidemiologia, melhoramento e manejo integrado de doenças.

Contudo, o manejo de doenças de plantas baseia-se no conhecimento epidemiológico, o qual inicia-se com o levantamento fitopatológico, cuja importância é transmitir aos agricultores informações sobre os patógenos causadores de danos nas culturas com intenção de tomar medidas corretas de controle. Portanto, deve-se listar os patógenos de um mesmo hospedeiro, obter informações a respeito da distribuição ao longo do tempo sobre a prevalência de determinado patógeno e estimar as perdas ocasionadas de acordo com as doenças (POZZA et al, 1999).

No sul do estado de Minas Gerais, dentre os trabalhos de levantamento de doenças em hortaliças destacam-se Goulart (1990), no qual constataram-se 26 doenças de etiologia fúngica, permitindo elaborar o programa de manejo integrado de doenças nessas culturas. Já o trabalho realizado por Pozza et al., (1999) concluiu maior ocorrência de patógenos de etiologia fúngica, representando 81,5% de um total de 525 doenças encontradas. Além disso, os autores destacaram as hortaliças como os hospedeiros com maior número de doenças nas amostras avaliadas (29,4%) e encontraram nove patógenos afetando a cultura da alface.

No Brasil, levantamentos da ocorrência de patógenos na cultura da alface são escassos e insuficientes, porém trabalhos realizados durante quatro meses em alface crespa na região da Zona da Mata e Agreste de Pernambuco, evidenciaram prevalência de 42,9% de *Pectobacterium carotovorum* nas áreas produtoras (SILVA et al., 2007), alertando os produtores para o correto manejo da doença, principalmente próximo à colheita, evitando, assim, maiores perdas de produção. No entanto, no Estado de São Paulo, durante período de 12 meses, das 268 alfaces analisadas apenas 88 estavam infectadas por vírus, sendo 73,6% LeMoV (*Lettuce mottle virus*), 18,19% LMV (*Lettuce mosaic virus*) e 5,69% BiMV (*Bidens mosaic virus*), constatando prevalência e importância do LeMoV comparado ao LMV, assim, a explicação possível ao seu aumento é mediante utilização de cultivares tolerantes ao LMV (DE MARCHI et al., 2012). Em levantamentos de doenças realizados em Lavras (MG), as

doenças encontradas na cultura da alface foram Míldio e Septoriose, sendo posteriormente estudadas as suas severidades (DA SILVA, 2015).

Em outros países, também foram feitos levantamentos de doenças nessa cultura e em muitos casos relacionando com o manejo da cultura. Levantamentos da ocorrência de Engrossamento das nervuras ('Big Vein') no estado da Califórnia (EUA), realizados ao longo do tempo e em determinados locais comprovaram a influência dos tipos de irrigação na ocorrência do vírus LBV (*Lettuce big vein*) e o aparecimento dos sintomas. A água de irrigação forneceu condições favoráveis ao vetor, fungo presente no solo (*Olpidium brassicae*), ocorre produção de zoósporos e, assim, o vírus é carregado até as plantas. A irrigação por aspersão foi responsável por distribuição aleatória da doença, porém em sulco e gotejamento demonstrou distribuição em reboleira (HAO; SUBBARAO, 2014). Em outro trabalho, levantamentos realizados durante período de 12 meses revelaram o LMV (*Lettuce mosaic virus*) como agente etiológico dominante na cultura da alface em Teerã (Irã). Sua ocorrência nos campos foi de 48,69%, sendo superior aos demais patógenos (SOLEIMANI et al., 2004) e, portanto, esse relato indica necessidade de pesquisa e de concentrar recursos e mão de obra no manejo desse vírus. Entretanto, levantamentos realizados durante os anos de 1999 a 2011 na República Tcheca na cultura da alface, reportaram o Míldio como principal doença. Durante esses 12 anos de levantamentos, houve variações dos níveis dessa doença, isto é, das 92 localidades avaliadas apenas 43,4% foram infectadas com Míldio, no entanto, em análises realizadas anualmente, constatou-se diminuição da incidência da doença de 66,7% em 2004 para 4,8% em 2009 (PETRZELOVA; LEBEDA; KOSMAN, 2013).

Já em outras hortaliças, em seis meses, foram realizados estudos da ocorrência de doenças em melancia e abóbora no sertão da Paraíba, no estado de Pernambuco. De 32 amostras com sintomas virais, foi detectada a presença do vírus ZYMY (*Zucchini yellow mosaic virus*) em 27,28% das amostras de abóbora e 6,3% nas de melancia. No mesmo estudo, os autores relataram 10 gêneros de fungos em 127 amostras com sintomas de doenças fúngicas. Dessa maneira, na cultura da abóbora, os gêneros de maior frequência foram *Alternaria* e *Cladosporium* com 16,67% e 13,34%, enquanto na melancia houve predominância de *Fusarium* spp. e *Alternaria* spp. com 33% e 14,44% (SOARES et al., 2016). Contudo, o levantamento de doenças possibilita a tomada de medidas eficientes de controle, econômicas e de menor impacto ambiental.

2.3 Sazonalidade de doenças na alface

A importância de cada doença é variável de ano para ano e de região para região, influenciada principalmente por condições climáticas ocorridas durante o desenvolvimento da cultura. As relações entre clima e doenças são intensas, de tal modo, são usadas em sistemas de previsão de doenças e manejo de epidemias, pois as flutuações na severidade das doenças são determinadas por meio dos anos, principalmente, por variações climáticas (GHINI, 2005). O conhecimento da análise temporal das doenças da alface é limitado, no entanto possui potencial para fornecer informações importantes para o manejo dos patógenos. A análise do padrão sazonal pode permitir inferência de fatores ambientais como influência do vento ou da chuva na disseminação de patógenos e fornecer informações sobre fontes de inóculos para prever os níveis de doenças (BENSON et al., 2006).

Segundo Abawi e Grogan (1979), a podridão de esclerotinia na alface, cujo agente etiológico é *Sclerotinia sclerotiorum* depende não somente da concentração de escleródios no solo, mas também, de temperaturas e umidades favoráveis, as quais afetam a germinação do apotécio, além da velocidade e direção do vento serem responsáveis por realizar a dispersão dos ascósporos do patógeno.

A doença Engrossamento das nervuras ('Big vein') ocorre na cultura da alface principalmente em temperaturas inferiores a 20°C. No Brasil, os sintomas foram observados principalmente no inverno, quando as temperaturas diurnas variaram de 18° a 22°C e as noturnas de 10° a 16°C (COLARICCIO et al., 2003). Confirmando ser uma doença típica de temperaturas amenas, Sanches et al., (2007) em quatro cidades do estado de São Paulo, também encontraram os vírus causando sintomas da doença somente em épocas frias, não sendo verificada a presença de sintomas em plantas cultivadas no verão mesmo em solos com histórico da doença.

A Murcha de *Fusarium* foi relatada em 27 campos de alface no estado do Arizona (Estados Unidos), sendo observada no outono, durante os cultivos de verão e constatada como a doença mais severa, nessa época do ano (MATHERON et al. 2005). Da mesma forma, no distrito de Edogowa, no Japão, foram cultivados quatro ciclos de cultura na mesma área em um ano, e a doença foi relatada na primavera, verão e outono (MATUO; MOTOHASHI, 1967). Além disso, em estudos de Matheron e Porchas (2010), cultivares de alface do tipo americana tiveram perdas de 0 a 2,3%, quando as temperaturas estavam entre 11 e 14 ° C, enquanto as mesmas cultivares sofreram perdas de 51 a 100% quando variaram de 21 a 32° C., contudo, a temperatura interfere na incidência e na severidade da doença.

O Míldio (*Bremia lactucae*) é detectado quando as temperaturas são baixas, principalmente no inverno, com temperaturas abaixo de 20 ° C. Além disso, é necessária a presença de água nessa época do ano para o aparecimento da doença, permitindo a germinação dos esporos e a infecção do patógeno na planta (WU et al., 2002). Esses autores verificaram correlação negativa da temperatura e correlação positiva da umidade relativa com a incidência da doença. Conforme a temperatura se elevava para 25 ° C, a incidência da doença diminuía. E quando houve aumento da umidade relativa, a incidência se elevou. Wu et al., (2002) observaram incidência de 30% de *B. lactucae* em mudas de alface no mês de março quando a temperatura era de 15 ° C, no entanto, a incidência diminuiu para 5% quando as temperaturas se elevaram para 28 ° C.

A temperatura ideal para desenvolvimento da Mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians*) em alface foi 25 ° a 28 ° C (BLANCARD; LOT; MAISONNEUVE, 2004). A incidência da doença em temperaturas de 27 ° a 29 ° C foi de 75% em cultivos de alface de verão, no estado da Carolina do Sul (Estados Unidos) (PATTERSON; GROGAN; CAMPBELL, 1986). No Canadá, nos meses de julho e agosto foi observado surto da doença na temperatura de 30 ° C, com incidência de 62% nos campos de alface (ROBINSON, 2003). No entanto, ocorreu epidemia da doença no mês de abril quando a temperatura era de 16 ° C, no estado da Califórnia, nos Estados Unidos (TOUSSAINT et al., 2001). Além disso, na Itália após um período de frio, no mês de novembro, com temperaturas próximas a 12 ° C, ocorreu epidemia com incidência de 90% da doença nas lavouras de alface (ZOINA; VOLPE, 1992). Contudo, as condições ambientais influenciam a penetração dos patógenos nos hospedeiros, a sobrevivência e a disseminação de vetores transmissores de patógenos e, desse modo, a doença torna-se dependente de condições climáticas favoráveis para seu aparecimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

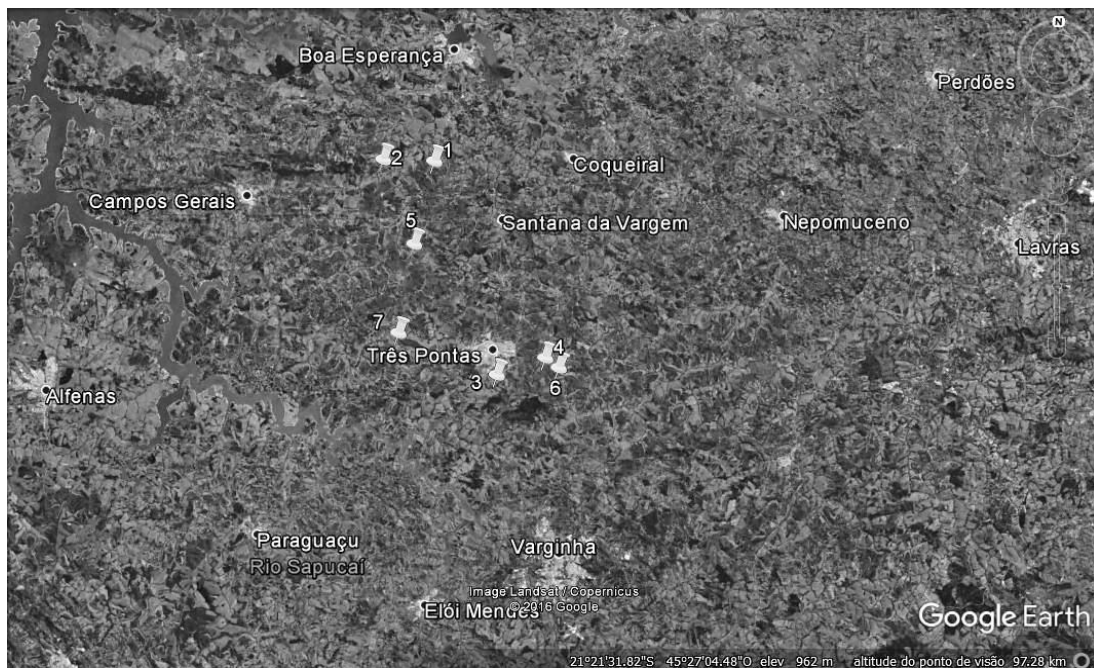
3.1 Local do experimento e coleta das amostras

O experimento foi conduzido em sete propriedades (TABELA 1) em produtores da alface tipo americana. Essas áreas estavam localizadas entre as regiões de Três Pontas (MG) e Boa Esperança (MG) (FIGURA 1).

Tabela 1 – Indicação das áreas experimentais georreferenciadas nos municípios, respectivos cultivares e produtores de alface americana.

Propriedades / Proprietário	Municípios	Coordenadas geográficas	Cultivares
1 – Eduardo Nogueira	Boa Esperança (MG)	21°12'36''S	Laurel (verão)
		45°34'50''O	Raider Plus (inverno)
2 – Douglas Spineli	Boa Esperança (MG)	21°15'75''S	Laurel (verão)
		45°37'50''O	Raider Plus (inverno)
3 – Paulo Henrique Ávila	Três Pontas (MG)	21°24'20''S	Laurel (verão)
		45°34'80''O	Raider Plus e Winslow (inverno)
4 – Marcos Mendonça de Paula	Três Pontas (MG)	21°23'16''S	Laurel (verão)
		45°27'46''O	Raider Plus (inverno)
5 – Antônio Brito Júnior	Santana da Vargem (MG)	21°17'16''S	Laurel e Ludmila (verão)
		45°35'47''O	Raider Plus (inverno)
6 – Antônio Brito Júnior	Três Pontas (MG)	21°23'47''S	Laurel e Ludmila (verão)
		45°26'57''O	Raider Plus (inverno)
7 – José Claudio Nogueira	Três Pontas (MG)	21°22'15''S	Laurel (verão)
		45°36'28''O	Raider Plus (inverno)

Figura 1 – Local das propriedades situadas entre as regiões de Três Pontas (MG) e Boa Esperança (MG).



Foram realizadas 12 amostragens, a cada 30 dias durante período de um ano, de 13 de novembro de 2015 a 25 de outubro de 2016, abrangendo assim, os sete ciclos da cultura e as doenças ocorridas no verão e no inverno.

Os lotes possuíam 0,2 hectare e foram compostos, em média, de 20 canteiros de 50 metros com 4 linhas. O espaçamento foi de 0,26 m entre plantas e 0,30 m entre linhas, totalizando 192 plantas/linha, 768 plantas/canteiro e aproximadamente 15.360 plantas/lote.

Todas as propriedades possuíam cultivo de alface americana em lotes de acordo com a época do ano ou dias após o transplântio (AT), variando desde lotes de 7 a 14 dias (AT) até lotes de 56 a 63 dias (AT).

Para coletar as amostras, foram percorridos todos os lotes de cada propriedade. Dentro de cada lote foram percorridos de 4 a 5 canteiros. Esses canteiros eram escolhidos de forma aleatória nos lotes de até 28 dias (AT), após essa idade, a amostragem foi tendenciosa aos canteiros com maior aparecimento de doenças. As amostras coletadas constituíram em um único exemplar de cada sintoma encontrado nos lotes em cada propriedade, sendo coletadas folhas, raízes ou a planta inteira.

Após a coleta, as amostras de alface com sintomas atípicos de doenças não identificadas foram colocadas em sacos de papel, e levadas ao Laboratório de Epidemiologia

do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras com o intuito de diagnosticar as doenças e identificar patógenos.

Em todas as propriedades, foram obtidas informações adicionais sobre a cultivar plantada, anos de cultivo da cultura em estudo na mesma área, cultura anterior, produtos fitossanitários usados e preparo das mudas.

3.2 Coleta de dados climáticos

Os dados meteorológicos foram obtidos a partir de estação meteorológica, modelo Datalogger-CR10X, Campbell Scientific Inc., instalada em torre metálica. A estação foi localizada em área central, na propriedade 3, representativa das condições climáticas entre todas as propriedades estudadas (TABELA 1). Com ela foram obtidos valores diários das temperaturas máxima, média e mínima, umidade relativa do ar e precipitação. Além da estação meteorológica, foi instalado um sensor (Datalogger-HT500) na área do estudo, próximo ao “mulching” da cultura, para coleta de dados de umidade relativa do ar e temperatura próximos à planta.

3.3 Identificação de doenças fúngicas

Resultando em doenças bióticas e, com o propósito de determinar a sua etiologia, plantas com suspeita de doenças causadas por fungos, foram examinadas em microscópio estereoscópio e, por conseguinte, realizado o isolamento dos fungos, segundo a metodologia de Amorim, Bergamin Filho e Kimati (2011). Foi realizada assepsia das folhas com água corrente e detergente, com o objetivo de evitar contaminação por organismos saprófitas. Em seguida, foram cortados pequenos pedaços foliares entre a área lesionada e sadia, e depois, imersos em álcool 70% durante dois minutos, em hipoclorito de sódio a 2%, durante um minuto, e lavados com água destilada por dois minutos. Depois da assepsia, as amostras foram depositadas em meio batata-dextrose-ágar (BDA), e incubadas em BOD a 25°C em fotoperíodo de 12 horas, durante cinco a 10 dias. Após o crescimento do patógeno em placas de ‘Petri’, suas estruturas foram observadas em microscópio ótico e seus gêneros identificados por análise morfológica (ELLIS, 1971; AINSWORTH; SPARROW; SUSSMAN, 1973; ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL et al., 1996 e DICK, 2001).

As espécies de fungos foram identificadas empregando-se literatura específica (TABELA 2).

Tabela 2 – Literatura específica para determinar as espécies fúngicas de cada gênero.

Gênero	Literatura
<i>Fusarium</i>	Leslie e Summerell (2006)
<i>Cercospora</i>	Blancard, Lot e Maisonneuve (2004)
<i>Thielaviopsis</i>	O'Brien, Davis e Wright (1997)
<i>Septoria</i>	Verkley et al., (2013)
<i>Rhizoctonia</i>	Parmeter Júnior e Whitney (1970)
<i>Sclerotinia</i>	Kohn et al., (1988)
<i>Bremia</i>	Bruggen e Scherm (1997)

3.4 Identificação de doenças bacterianas

No caso de sintomas com suspeita de bactéria, as amostras foram submetidas à corrida bacteriana. Quando positivas, as amostras foram submetidas ao isolamento. Foi então realizada a desinfestação descrita no item 3.3. Logo após, os fragmentos lesionados foram transferidos para água destilada, macerados e transferidos novamente para placas de ‘Petri’ contendo o meio Kado 523 (KADO; HESKETT, 1970). Após o crescimento da colônia pura de bactéria, foram realizados testes bioquímicos com o objetivo de determinar o gênero e a espécie (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

No caso do gênero *Xanthomonas*, após o isolamento anteriormente descrito, foram realizados segundo Schaad, Jones e Chun (2001), testes para determinação da espécie, como crescimento a 28°C em BOD, durante 24/48 horas em fotoperíodo de 12 horas, crescimento a 40°C com meio líquido em banho-maria, oxidase, hidrólise do amido e asparagina como única fonte de carbono de nitrogênio.

Para determinar a subespécie de bactérias pectinolíticas foi realizado o método de iscas biológicas, utilizando-se tubérculos de batata. Esse método consistiu em toque na área lesionada da alface com suspeita de podridão mole, por meio de um palito de madeira com 2 mm de diâmetro previamente autoclavado, em seguida, toque no interior do tubérculo de batata, previamente flambada para eliminar contaminantes superficiais e cortada ao meio. Após esse procedimento, a batata foi fechada com elástico e colocada em câmara úmida por 24 horas. Após esse período, realizou-se em câmara de fluxo laminar a transferência da massa de pus formada no interior da batata para placas de ‘Petri’ contendo meio Kado 523 com o auxílio de uma alça de platina. As placas foram levadas a BOD com 25°C por 24 a 48 horas para as colônias crescerem. Logo após, realizou-se testes de crescimento a 37°C e sensibilidade a eritromicina para determinar subespécies, segundo Schaad, Jones e Chun (2001).

Para as plantas com sintomas da doença causada por *Pseudomonas* spp. e para confirmar sua espécie realizou-se reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos. Após o isolamento, já descrito da fitobactéria, foi utilizado o par de *primers* PscHrc662F 5'-AGG CTT TAT GGA AAC CCT GAC G-3' e PscHrc751R 5'-ACA ATC ACC GCC ACG ATC AG-3', o qual amplificou um fragmento de 90bp (COTTYN et al., 2011). A reação foi realizada para o volume total de 25 µL, contendo: 2,5 µL de tampão (5X), 1,5 µL de MgCl₂ (25mM), 1,0 µL de dNTP mix (10 mM), 1,0 µL do *primer* anti-senso (15 nM), 1,0 µL do *primer* senso (15 nM), 0,25 µL da enzima Taq DNA Polimerase, 2,0 µL do DNA (10 ng/µL) e 15,75 µL de água livre de nuclease.

A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100TM (*Programmable Thermae Controller*, MJ Research, Inc.), utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95° C, por 5 min, seguida por 30 ciclos de 95° C por 1 min, 63° C por 1 min e 72° C por 30 segundos, e uma extensão final a 72° C por 10 min (COTTYN et al., 2011).

O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X e corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). O marcador utilizado foi 100bp DNA ladder (Bioscience).

3.5 Identificação de doenças viróticas

As plantas com sintomas de vírus como 'Big Vein' (LBVaV - *Lettuce big-vein associated virus* e MLBVV - *Mirafiori lettuce big-vein virus*) e "Vira-cabeça" (TCSV - *Tomato chlorotic spot virus*, GRSV - *Groundnut ringspot virus*, CSNV - *Chrysanthemum stem necrosis virus* e TSWV - *Tomato spotted wilt virus*) foram analisadas quanto aos seus sintomas morfológicos. Para confirmar a etiologia, realizou-se a extração do ácido nucleico dos vírus nas folhas macerando-as com nitrogênio líquido e submeteu-os à técnica de transcrição reversa e reação de polimerização em cadeia (RT-PCR).

As sequências dos oligonucleotídeos específicos para MLBVV e LBVaV foram descritas por Rosales, Sepulveda e Bruna (2004). Para a detecção de MLBVV utilizou-se os pares de *primers*: MiCP1 5'TTG CAA CGT GAT GAA ACC 3' e MiCP2 5'AAA GAA GAG AAG CCT GTT CC 3' e para o LBVaV os pares de *primers*: LBCP1 5'AAG CTT TCC GTA CTG TCC3' e LBCP2 5'CCT TGA TAC AGT TTT TGA CC3'. O par de *primer* MiCP1/MiCP2 amplifica um fragmento de 725 bp enquanto o par LBCP1/LBCP2 amplifica 485 bp, ambos correspondentes a parte da região codificadora da proteína capsidial. As sequências dos oligonucleotídeos específicas para TCSV foram Nv2 5'CCT AAA GCT TCT TTA GTG TTA TAC TTC G 3' e Nvc2 5'CTA ACT CAG GCT GGA GAA ATC GAG 3'

designadas para amplificar 519 bp de uma parte do núcleo capsidial (WEBSTER et al., 2013). A sequência específica para GRSV foi descrita por Webster et al. (2010) e consistiu nos *primers* Glyco4vc 5' AGC ATT CTG TTG TTC AGG GCT AC 3' e Glyco5v 5' CAG AGT GTG CTT TGA AGT TCC C 3', os quais amplificam 166 bp. Para CSNV utilizou-se os pares N5 5' GAG CGA CTG CGG AAT ACT CT 3' e N3 5' GAC ACA CTT TAA ATC TTT AAC ACA CC 3' cuja amplificação é de 950 bp (BEZERRA et al., 1999), e por fim para o TSWV utilizou-se o par de *primers* 723 5' CAC AAG GCA AAG ACC TTG AG 3' e 722 5' GCT GGA GCT AAG TAT AGC 3', o qual amplifica 620 bp (ADKINS; ROSSKOPF, 2002).

Esses vírus possuem RNA como ácido nucleico e, assim, a extração do RNA total foi de acordo com o protocolo do método do Trizol (AFGC Protocols, 2002). Foram macerados 0,4 g de folhas jovens infectadas em almofariz na presença de nitrogênio líquido e ao pó obtido, foi adicionado 6 mL do tampão Trizol (380 mL/L; 118,16g de Guanidina tiocianato, 0,8M; 76,12g de Amônia tiocianato, 0,4M; Acetato de sódio 33,4 mL, 0,1M; Glicerol 50 mL e água ultrapura). O extrato obtido foi transferido para microtubos e, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um outro microtubo e foram adicionados 300 µL de clorofórmio. Cada microtubo foi agitado em vórtex por 15 segundos, e mantidos em temperatura ambiente por 3 minutos. Para finalizar a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Cuidadosamente, a fase aquosa (400 µL) foi pipetada e transferida para um novo microtubo, adicionando-se 200 µL de isopropanol e 200 µL de Citrato de sódio 0,8M /1,2M de NaCl, (½ do volume da fase aquosa) e misturados gentilmente por inversão, mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos, para ocorrer precipitação do RNA. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a uma rotação de 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 75%, em seguida, foi centrifugado novamente a uma rotação de 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C e descartado o sobrenadante. O '*pellet*' então foi seco na câmara de fluxo por aproximadamente 30 a 40 minutos e ressuspenso em 25 µL de água ultrapura tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

O RNA total extraído foi utilizado na reação de RT-PCR para cada vírus testado. Para a síntese do cDNA foi utilizado 1,25 µL do RNA, 0,5 µL do *primer reverse* (25nM) específico para cada vírus, 5,35 µL de água ultrapura e 0,5 µL de dNTPs (10 mM), essa mistura foi colocada na centrífuga para um "spin", depois levada ao termociclador por 10 minutos a 70 °C. Após essa etapa, o microtubo foi transferido para recipiente com gelo para evitar degradação. Em seguida, foram adicionados 2 µL de *buffer* (5X) M-MLV e 0,4 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV (Ludwig). Essa mistura foi colocada em termociclador

por 50 minutos a 50 °C, após essa etapa, os microtubos foram mantidos em gelo até o preparo da PCR.

Para o preparo da PCR foram utilizados: 5 µL *buffer* (5X), 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL do *primer reverse* (25 nM), 1 µL do *primer forward* (25 nM), 1 µL do cDNA, 40,8 µL de água ultrapura tratada com DEPC (Dimetil pirocarbonato) e 0,2 µL da enzima TAQ DNA Polymerase (5U/ µL) (Cellco), resultando em um volume total de reação de 50 µL. Para a reação de PCR foram utilizados os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 95° C por 1 minuto, seguida por 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, temperatura de anelamento do *primer* testado (TABELA 3) por 30 segundos, 72° C por 30 segundos, e uma extensão final a 72° C por 5 minutos. Por fim, permaneceu a 4°C indefinidamente.

Tabela 3 – Pares de *primers*, temperatura de anelamento testadas para identificação e comprovação de espécies viróticas e tamanho das bandas a serem amplificadas.

Pares de <i>Primers</i> testados	Espécie de vírus	Temperatura de anelamento	Tamanho das bandas (bp)
MiCP1 / MiCP2	MLBVV	50° C	725
LBCP1 / LBCP2	LBVaV	47,5° C	485
Nv2 / Nvc2	TCSV	64° C	519
Glyco 4vc / Glyco 5v	GRSV	62,3° C	166
N5 / N3	CSNV	53° C	950
723 / 722	TSWV	55,7° C	620

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 0,7% e corados com Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). O marcador utilizado foi 100bp DNA ladder (Bioscience).

Para detectar os *Tospovirus* em mudas dos viveiros, coletaram-se 150 folhas assintomáticas com 28 dias após semeadura, em cada propriedade. As coletas foram realizadas aleatoriamente entre bandejas de 288 cédulas. Realizou-se extração dos vírus e RT-PCR com os *primers* e metodologia já mencionados anteriormente.

3.6 Identificação de fitonematoides nas amostras sintomáticas

Nas raízes contendo galhas, foram retiradas as fêmeas com auxílio de estilete e transferidas para tubo com tampão de extração. Em seguida, realizou-se eletroforese da isoenzimas esterase para identificar espécies de *Meloidogyne*, seguindo o protocolo de extração e Eletroforese Vertical (ORNSTEIN, 1964 e DAVIS, 1964) com o uso da cuba: The Mini-PROTEAN® 3. Dessa maneira, escolheram-se de três a cinco fêmeas jovens com

aspecto leitoso por amostra por lote. Fêmeas jovens no início da ovoposição tem alta atividade enzimática, podendo esta atividade ser alterada conforme a idade das fêmeas, e assim, fêmeas velhas tem essa atividade reduzida (KUNIEDA DE ALONSO; ALFENAS, 1998).

3.7 Análise dos dados

Os resultados da incidência e frequência dos patógenos por meio da estatística descritiva foram apresentados em gráficos de setores (pizza), tabelas e gráficos de barras, de maneira a expressar a porcentagem dos agentes etiológicos em relação ao total encontrado.

Foram plotados gráficos de setores de porcentagem da frequência de ocorrência, e de cada agente etiológico encontrado, nas sete propriedades durante 12 meses. Os gráficos de barras consistiram em número de relatos de cada espécie encontrada, em relação ao total de observações de todos os patógenos ocorridos nas sete propriedades, e também as frequências de ocorrência de cada espécie encontrada de acordo com a idade de cada lote, em relação a todos os lotes das sete propriedades durante 12 meses. As tabelas apresentadas descreveram a ocorrência e a porcentagem das espécies identificada, em relação ao total das sete localidades durante 12 meses. Além do relato da primeira ocorrência de cada espécie, de acordo com a idade ou fase da cultura, distribuídos nos 12 meses de amostragem.

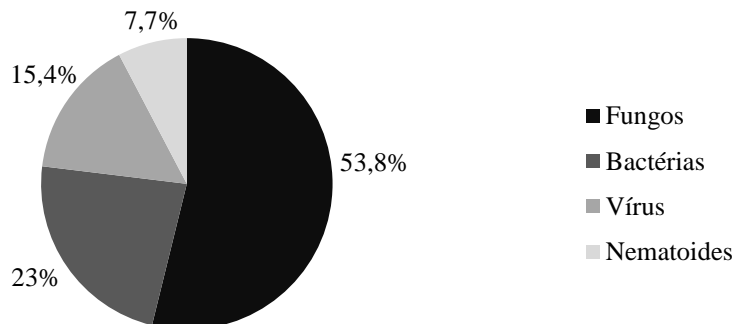
Assim, as frequências de ocorrência dos patógenos em todas as propriedades foram relacionadas com a média da temperatura, da precipitação e da umidade relativa, coletados na estação climatológica, aos 7,15 e 30 dias anteriores a ocorrência de cada doença. Desse modo, plotaram-se gráficos com a porcentagem de ocorrência de cada patógeno, ao longo do tempo (eixo X), juntamente com as variáveis ambientais coletadas na estação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Frequência da ocorrência de doenças e patógenos em alface americana no sul de Minas Gerais

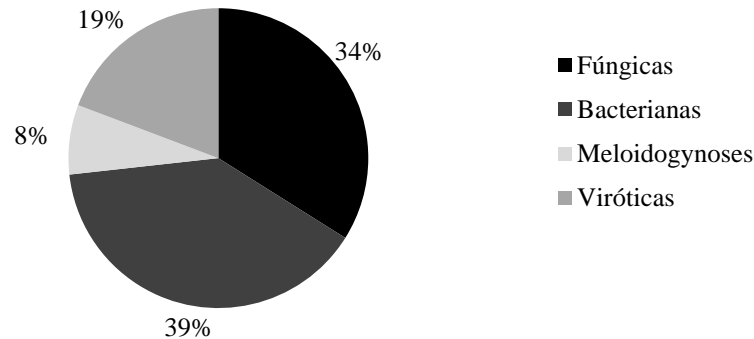
Nos 12 meses de levantamento de doenças entre os anos de 2015 e 2016, nas sete propriedades avaliadas foram encontradas um total de 13 doenças, sendo a maioria, ou 53,8% de etiologia fúngica, 23% de etiologia bacteriana, 15,4 % de etiologia virótica e 7,7% de nematoides (FIGURA 2). Mais de 10.000 espécies de fungos são conhecidas podendo causar doenças em plantas e, segundo Agrios (2005), 70% das principais doenças possuem os fungos como agentes etiológicos. Embora 13 doenças tenham sido identificadas nesse trabalho, no mundo, mais de 75 doenças já foram relatadas na alface (FILGUEIRA, 2008; LOPES; QUEZADO; REIS, 2010).

Figura 2 - Ocorrência de doenças em relação ao total de 13 encontradas nas sete propriedades em municípios da região sul de Minas Gerais.



Calculando-se a frequência de ocorrência por doenças, as de etiologia bacteriana lideraram com 39%, seguida das fúngicas com 34%, das viróticas com 19% e, por fim, das meloidogynoses com 8% (FIGURA 3).

Figura 3 – Frequência de ocorrência das doenças em relação ao total de 1226 observações nas sete propriedades.



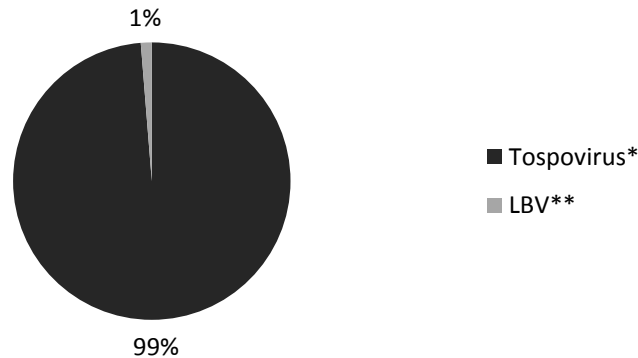
Embora as frequências de bactérias e fungos estejam próximas, a maior porcentagem de bactérias deve-se a sua rápida disseminação e multiplicação (ROMEIRO, 2005) e, também a não existência de bactericidas registrados para cultura da alface (MAPA, 2017). Entretanto, em trabalhos de levantamentos de não prospecção a campo, ou seja, apenas recebendo as amostras no centro de pesquisa, Pozza et al, (1999) relataram prevalência de doenças fúngicas, viróticas e bacterianas com 81,5%, 5,1%, e 5% respectivamente, em hospedeiros distintos. Porém, Talamini et al. (2003) constaram prevalência de fungos com 70%, bactérias 12,9% e vírus 1,2% no total de 1429 amostras de 85 espécies de hospedeiro. Por outro lado, Da Silva (2015), em levantamentos realizados no campo durante período de seis meses, obteve na cultura da alface 60% de doenças de etiologia fúngica, 20% bacterianas e 20% viróticas.

4.2 Doenças viróticas

Foram encontradas duas doenças de etiologia virótica, Vira-cabeça cujos agentes etiológicos são *Tospovirus*, e ‘Big vein’ causados por *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV) e *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV).

Os *Tospovirus* representaram 99% (FIGURA 4) da ocorrência de doenças viróticas e foram detectados em 100% das propriedades avaliadas.

Figura 4 – Porcentagem de ocorrência das doenças viróticas dentro de seu grupo etiológico.



*TCSV e GRSV. **MLBVV e LBVaV.

Enquanto ‘Big vein’ representou somente 1% (FIGURA 4) da ocorrência e foi detectado apenas na Propriedade 1, com distribuição de 14,29% nas propriedades avaliadas. Os altos valores de ocorrência de *Tospovirus* assemelharam-se a resultados encontrados por Oliveira (2016). O autor relatou 53% de presença de *Tospovirus* em levantamentos no campo no estado de São Paulo em 2014, e apenas 9% de LMV (*Lettuce mosaic virus*). O mesmo autor, em 2015, observou 80% de plantas infectadas com *Tospovirus*, não detectando LMV. Dentre os vírus relatados na cultura da alface, LMV é considerado o mais importante (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010), no entanto, nesse estudo sintomas desse vírus não foram encontrados.

Dessa maneira, houve prevalência dos *Tospovirus*. Sua alta frequência no campo pode estar relacionada às temperaturas elevadas ao longo dos últimos anos (23° a 27 °C), as quais favoreceram reprodução de tripses, vetor das tospoviroses, (NONDILLO et al., 2008), enquanto os pulgões (vetor do LMV), foram desfavorecidos, por preferirem temperaturas moderadas para reprodução (16° a 24°C) (SALVADORI; PEREIRA, 2016).

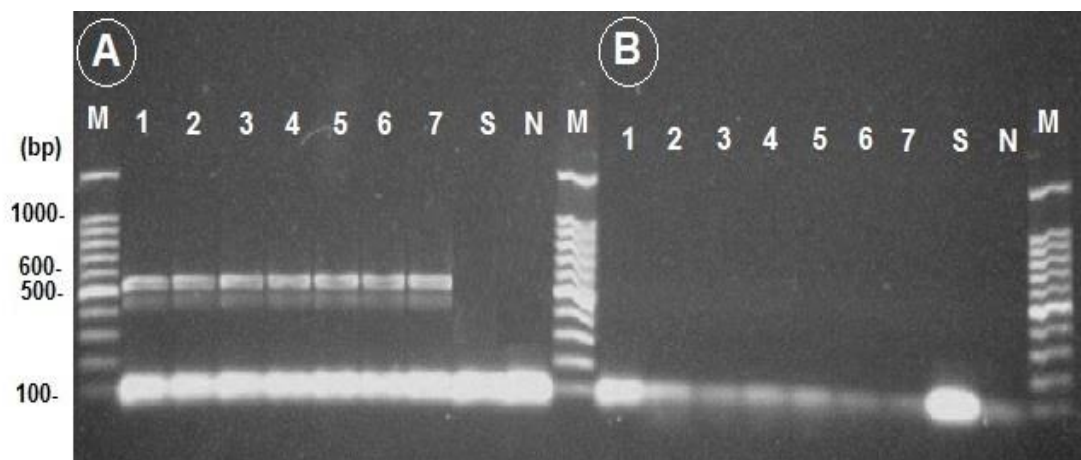
A baixa ocorrência de ‘Big vein’ também está relacionada a temperatura. Os vírus (LBVaV e MLBVV) são transmitidos mediante esporos do fungo de solo (*Olpidium brassicae*), contudo a transmissão por meio dos esporos ocorre em temperaturas abaixo de 20 ° C durante meses consecutivos (COLARICCIO et al., 2003), condição ausente nesse estudo, caracterizando uma doença típica de climas temperados e épocas frias.

Os sintomas causados por Vira-cabeça possuem como agente etiológico os vírus do gênero *Tospovirus*, família *Bunyaviridae*. No Brasil, já foram relatadas seis espécies de tospoviroses: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Zucchini*

lethal chlorotic virus (ZLCV) e *Iris yellow spot virus* (IYSV) (POZZER et al. 1999), porém em alface somente as espécies TSWV, CSNV, GRSV e TCSV são encontradas na literatura (CHAVES et al., 2001).

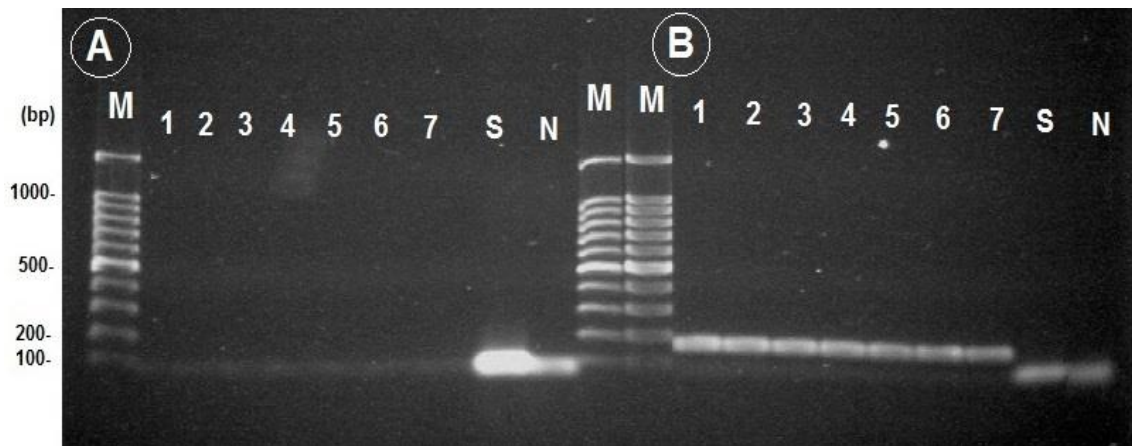
Por meio da RT-PCR, identificaram-se as espécies do gênero *Tospovirus*. A utilização dos *primers* específicos para as espécies de *Tospovirus*, as quais infectavam as plantas de alface analisadas permitiu a amplificação de uma banda de 519 bp (FIGURA 5), correspondendo ao TCSV e de 166 bp para GRSV (FIGURA 6). Não foram amplificadas bandas referentes à utilização dos *primers* para detecção do TSWV (FIGURA 5) e CSNV (FIGURA 6). Colariccio et al., (2001), descreveram TCSV como a principal tospovirose no estado de São Paulo, sendo prejudicial a diferentes culturas, especialmente às olerícolas, enquanto GRSV prevaleceu em alface no Vale do Rio São Francisco, no estado de Pernambuco. Contudo, este é o primeiro relato dessas duas espécies do gênero *Tospovirus* no estado de Minas Gerais.

Figura 5 - Gel de agarose dos produtos da RT-PCR utilizando os pares de primers: A -Nv2 e Nvc2, para detecção de TCSV com banda amplificada de 519 bp.



Legenda: (M) - Marcador de peso molecular 100 bp; (1-7) - Amostras de alface coletadas nas propriedades avaliadas; (S) - Planta saudável de alface (sem sintoma de *Tospovirus*); (N) Controle negativo. B- 723 e 722 para detecção de TSWV.

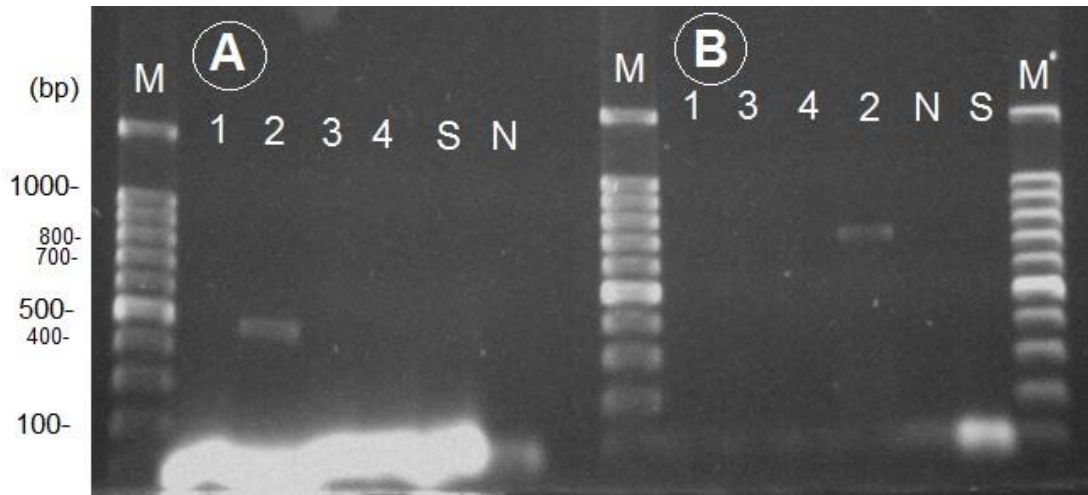
Figura 6 - Gel de agarose dos produtos da RT-PCR utilizando os pares de primers: A - N5 e N3, para detecção de CSNV.



Legenda: (M) - Marcador de peso molecular 100 bp; (1-7) – Amostras de alface coletadas nas propriedades avaliadas; (S) – Planta saudável de alface (sem sintoma de *Tospovirus*); (N) Controle negativo. B- Glyco4vc e Glyco5v para detecção de GRSV, com banda de amplificação de 166 bp.

Os sintomas da doença ‘Big vein’ foram encontrados em apenas uma propriedade (Propriedade 1), e a comprovação dos agentes etiológicos *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV) e *Mirafiori lettuce big vein virus* (MLBVV), por RT-PCR apresentou amplificação das bandas 725 bp para MLBVV (FIGURA 7) e 485 bp para LBVaV (FIGURA 7) apenas na amostra constituída por folhas velhas, em contraste, não houve detecção dos vírus na amostra constituída por folhas novas, embora apresentassem sintomas característicos da doença. Esses resultados suportam estudos de Rogerro et al., (2003) e Navarro et al., (2004, 2005), cujas plantas exibindo sintomas de ‘Big vein’ estavam coinfectadas com ambos os vírus. Sanches et al., (2007) também constataram infecção mista dos vírus e, ambos estavam disseminados em importantes áreas produtoras de alface no estado de São Paulo. No entanto, há relatos de plantas sintomáticas infectadas com somente um vírus (MLBVV) na época do inverno e, LBVaV na primavera e no outono (SANCHES et al., 2007). Nas amostras com resultados negativos, podem ter ocorrido baixa concentração viral, infecção tardia ou distribuição irregular de vírus na planta, principalmente em razão da maior concentração dos vírus nas folhas mais velhas (NAVARRO et al., 2004). O primeiro relato da ocorrência dessa doença em regiões subtropicais foi no estado de São Paulo em 2003, reportando associação entre ambos os vírus (COLARICCIO et al., 2003). Por fim, este é o primeiro relato de MLBVV e LBVaV em alface no estado de Minas Gerais.

Figura 7 - Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando os pares de primers: A - LBCP1 e LBCP2, para detecção de LBVaV; B- MiCP1 e MiCP2 para detecção de MLBVV.



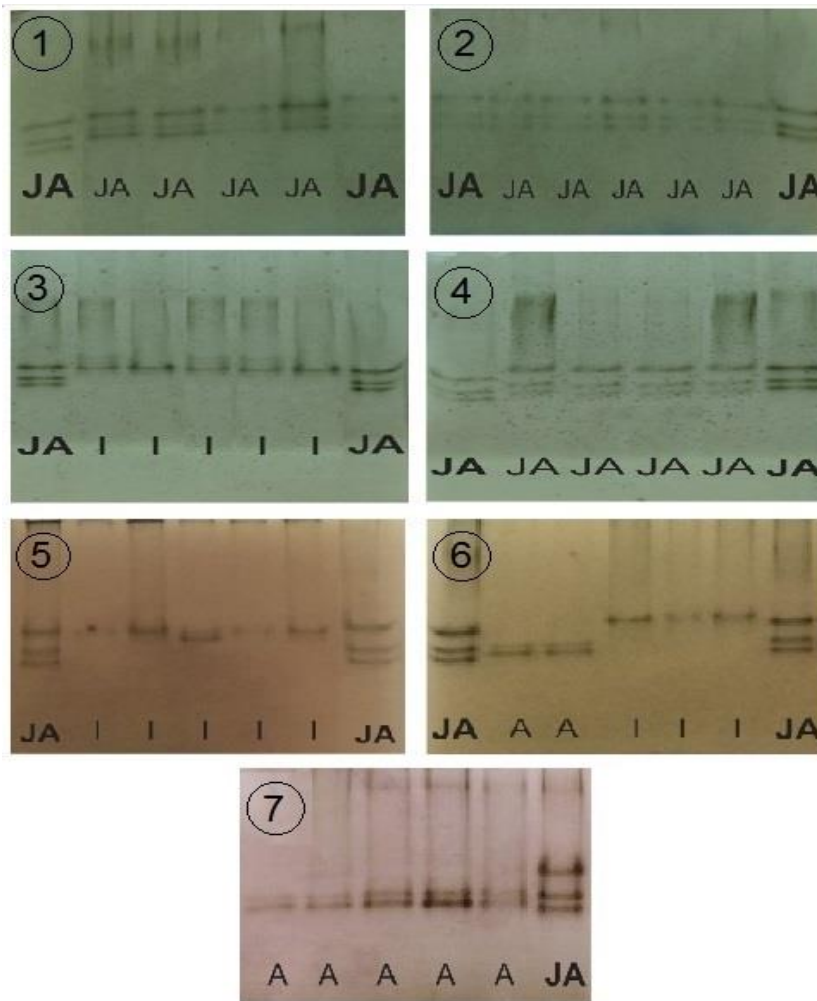
Legenda: (M) - Marcador de peso molecular 100 bp. (1, 3) – Amostra folha nova coletada na propriedade 1, (2, 4) - Amostra folha velha coletada na propriedade 1 (S) – Planta saudável de alface (sem sintoma de ‘Big Vein’). (N) Controle negativo (água).

4.3 Nematoides

Os nematoides representaram 7,7% dos casos de doenças (FIGURA 2). Somente foi encontrado o gênero *Meloidogyne*, apesar de *Pratylenchus* sp. já ter sido descrito nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Itália, Alemanha e Grã Bretanha na cultura da alface (BLANCARD; LOT; MAISONNEUVE, 2004). No entanto, *Meloidogyne* spp. é considerado o nematoide de maior importância na agricultura mundial, em razão da presença na maioria das áreas de cultivo, com ampla gama de hospedeiros, alta capacidade destrutiva e elevada taxa de reprodução (CAMPOS; SIVAPALAN; GNANAPRAGASAM, 1997).

Nas análises realizadas por meio da eletroforese de isoenzimas, foi detectado *M. javanica* nas propriedades 1, 2 e 4 (FIGURA 8), ocorrendo em 42,85% das propriedades avaliadas (TABELA 4). Nas propriedades 3, 5 e 6 foi identificado *M. incognita* (FIGURA 8), também representando 42,85% das propriedades (TABELA 4). Já, *M. arenaria* foi encontrado nas propriedades 6 e 7, representando 28,57%. Na propriedade 6, houve ocorrência das espécies *M. incognita* e *M. arenaria* ambos causadores de galhas. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Charchar e Moita (2005), cuja maior frequência de nematoide das galhas também na cultura da alface foi de *M. javanica* e *M. incognita*. Embora *M. hapla* já ser descrito na cultura da alface no Brasil, não foi encontrado, nesse levantamento, possivelmente por ser uma espécie dependente de temperaturas amenas (12° a 24°C), (CHARCHAR, 1995; BLANCARD; LOT; MAISONNEUVE, 2004).

Figura 8 – Perfil fenotípico da esterase representando as espécies de *Meloidogyne* em cada propriedade 1 – 7.



Legenda: 1 – Propriedade 1, 2 – Propriedade 2, 3 – Propriedade 3, 4 – Propriedade 4, 5 – Propriedade 5, 6 – Propriedade 6 e 7 – Propriedade 7. **JA** – Padrão de comparação de bandas (*M. javanica*). **I** – *M. incognita*. **JA** – *M. javanica*. **A** – *M. arenaria*.

Tabela 4 – Ocorrência e distribuição das espécies de *Meloidogyne* nas propriedades avaliadas.

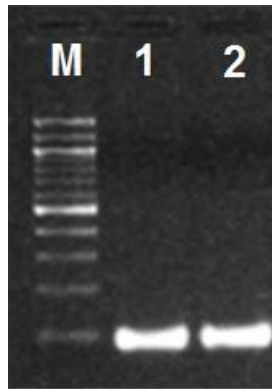
Espécie	Ocorrência / Propriedades avaliadas	Distribuição nas propriedades
<i>M. javanica</i>	3/7	42,85%
<i>M. incognita</i>	3/7	42,85%
<i>M. arenaria</i>	2/7	28,57%

4.4 Doenças bacterianas

Foram identificadas três espécies de bactérias, *Pseudomonas cichorii*, *Pectobacterium carotovorum* subs. *carotovorum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitiens* ocasionando as doenças Mancha cerosa, Podridão mole e Mancha bacteriana, respectivamente.

Na identificação de *P. cichorii*, o isolado de alface apresentou produto de amplificação de 90 bp (FIGURA 9) quando se utilizou o par de *primers* PscHrc662F e PscHrc751R, resultado semelhante ao encontrado por Cottyn et al. (2011). Seu primeiro relato em alface no Brasil foi descrito por Freire (1954) e *P. cichorii*, atualmente está disseminada nos estados de Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul, e região Sudeste (BERIAM, 2007).

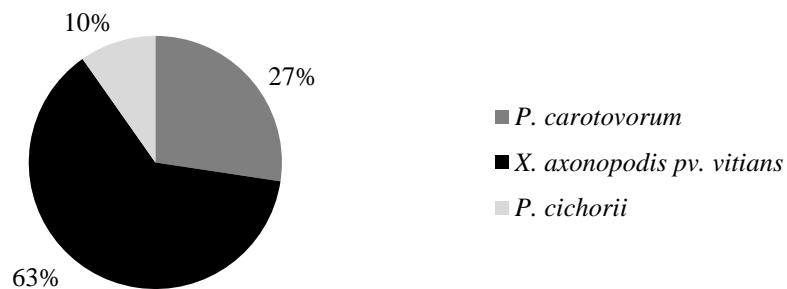
Figura 9 - Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o par de *primers* PscHrc662F e PscHrc751R, para detectar *Pseudomonas cichorii*.



Legenda: (M) Marcador de peso molecular 100 bp, (1) Pc CFBP 2101 – Controle positivo. (2) Isolado da cultura da alface.

Dentre os 39% de doenças bacterianas (FIGURA 3), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitiens* apresentou maior ocorrência, de 63% (FIGURA 10), seguida de *Pectobacterium carotovorum* subs. *carotovorum* e *Pseudomonas cichorii*, com 27 e 10%, respectivamente.

Figura 10 – Porcentagem de ocorrência das espécies de bactérias dentro de doenças de etiologia bacteriana.



Entretanto, os três gêneros de bactérias foram detectados nas sete localidades avaliadas, representando 100 % de distribuição nas propriedades.

A ocorrência de *X. axonopodis pv. vitians* em 100% das propriedades avaliadas coincidiu com estudos de Sahin et al., (2003) sobre a ampla disseminação desse patógeno nas áreas produtoras de alface. Embora os três gêneros de bactérias encontrados sobrevivam de um ciclo para outro da cultura, associados a restos não decompostos e a plantas daninhas da família *Asteraceae* (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010), a ampla disseminação de *X. axonopodis pv. vitians* nas áreas produtoras de alface, deve-se a esse patógeno ser disseminado por sementes (CARISSE; OUIOMET; TOUSSAINT, 2000). Essa bactéria foi detectada, pela primeira vez, no estado de Minas Gerais, em 2014 (TEBALDI; MARTINS; MOTA, 2015), sendo citado com frequência em outros estudos. Também, Fayette et al. (2016) relataram *X. axonopodis pv. vitians* como o patógeno de maior ocorrência na cultura da alface, sendo Mancha bacteriana a principal doença no estado da Flórida (EUA), em razão de surtos severos, ocasionando perdas totais na produção (BARAK; KOIKE; GILBERTSON, 2001).

Silva e Lima Neto (2007), também encontraram *P. carotovorum* subs. *carotovorum* em 100% de 10 localidades amostradas na cultura da alface no estado do Paraná. No entanto, Felix et al. (2014) encontraram outros resultados, em seus estudos de levantamento no campo na cultura da alface, encontraram prevalência de 42% de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no Agreste e Zona da Mata de Pernambuco. Ou seja, a prevalência de determinada espécie pode depender da região do estudo, ainda mais em um país de dimensões continentais como o Brasil, com diferentes tipos de clima e de solo. Quanto a *P. cichorii*, esse patógeno possui diferentes hospedeiros entre alface, brócolis, tomate, couve, pimentão, beldroega e café

(SILVA JÚNIOR et al., 2009). Sua ocorrência em 100 % das propriedades avaliadas está em razão dos cafezais circundarem os canteiros de alface em todas elas.

4.5 Doenças fúngicas

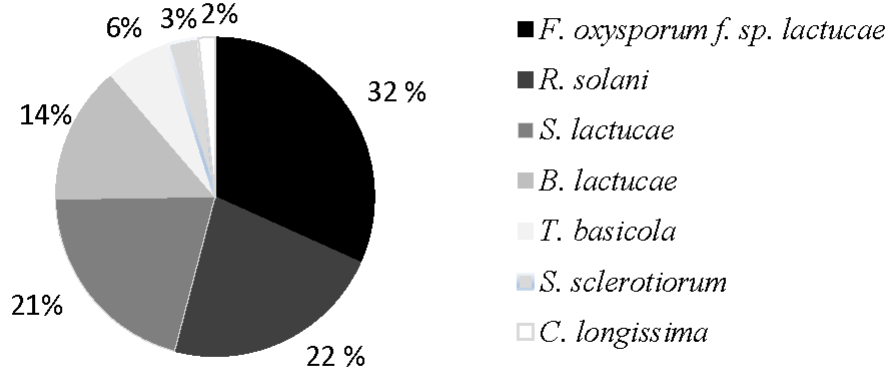
As doenças de etiologia fúngica representaram 34% do total de frequências de doenças (FIGURA 3) e foram identificadas seis espécies de fungos e uma de oomiceto (TABELA 5).

Tabela 5 – Espécies de fungos identificadas e o nome de suas respectivas doenças.

Gêneros e espécies	Nome comum da doença
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	Murcha de fusário
<i>Rhizoctonia solani</i>	Queima da saia
<i>Septoria lactucae</i>	Septoriose
<i>Bremia lactucae</i>	Míldio
<i>Thielaviopsis basicola</i>	Podridão negra
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Podridão de esclerotinia
<i>Cercospora longissima</i>	Cercoporiose

Quanto aos fungos, os quatro patógenos de maior ocorrência foram dois de solo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* e *Rhizoctonia solani* com 32% e 22%, seguido de dois de parte aérea, *Septoria lactucae* e *Bremia lactucae* com 21 % e 14%. (FIGURA 11). Esse último teve menor ocorrência entre os dois patógenos foliares, provavelmente porque ocorreu somente na época fria, enquanto *S. lactucae* ocorreu durante todo o ano.

Figura 11 – Porcentagem de ocorrência das espécies de fungos dentro do grupo etiológico fúngico.



Foi detectada a presença em 100% das localidades avaliadas de ambos os fungos de solo de maior ocorrência (TABELA 6).

Tabela 6 – Ocorrência e distribuição das espécies de fungos nas propriedades avaliadas.

Gêneros	Ocorrência / Propriedades avaliadas	Distribuição nas propriedades
<i>Rhizoctonia solani</i>	7/7	100 %
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lactucae</i>	7/7	100 %
<i>Bremia lactucae</i>	7/7	100 %
<i>Septoria lactucae</i>	6/7	85,71 %
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	4/7	57,14 %
<i>Cercospora longissima</i>	4/7	57,14 %
<i>Thielaviopsis basicola</i>	3/7	42,86 %

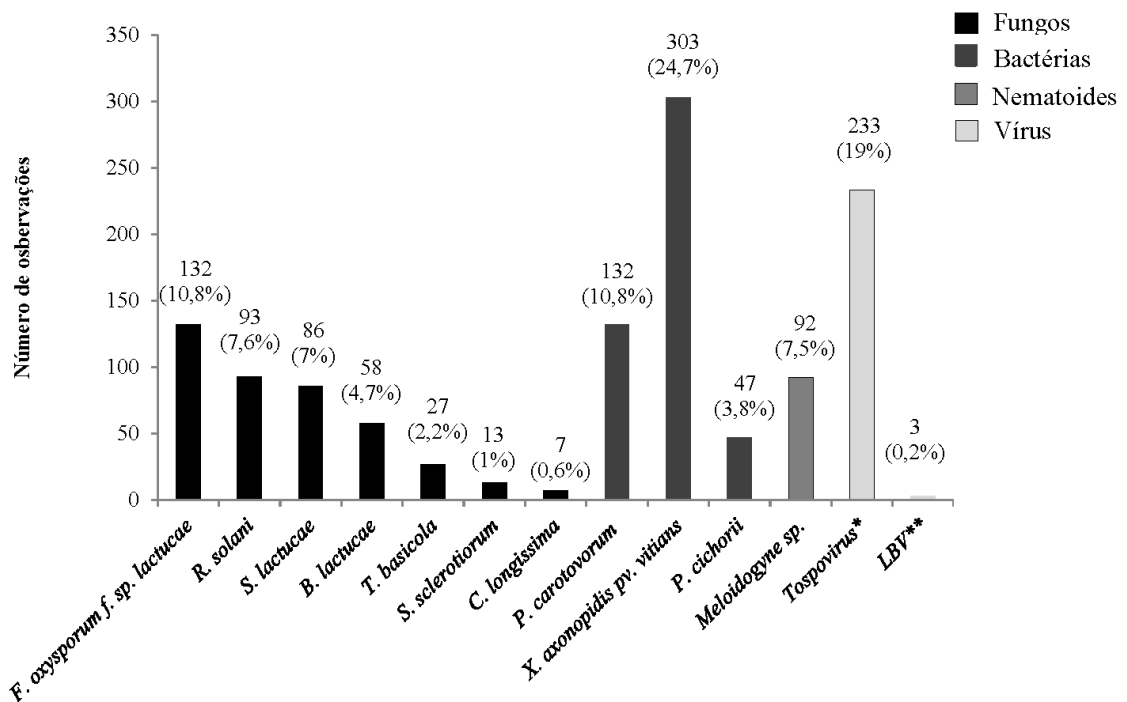
Segundo Cabral (2012), *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* foi relatado nas principais regiões produtoras de alface dos estados Sul e Sudeste, enquanto *R. solani* está presente em todas as regiões produtoras do Brasil (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010). A maior ocorrência de *Fusarium* sp. também foi encontrada por Barros (2010), em amostras recebidas no laboratório. O autor relatou o patógeno como o de maior ocorrência (18%) entre 36 gêneros de fungos encontrados nas culturas de algodão, braquiária, café, feijão, milho e soja. Resultados semelhantes foram encontrados por Pozza et al., (1999) e Talamini et al., (2003) cuja ocorrência de *Fusarium* sp. foi a maior entre os fungos identificados, com 12,1% e 26%, respectivamente, ambos em levantamentos de não prospecção a campo. Em geral, a ocorrência de fungos de solo foi maior, comparados aos da parte aérea em decorrência dos cultivos sucessivos da cultura na mesma área, sem realização de rotação e, por esses patógenos apresentarem dificuldades no seu manejo (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010), além de, possuírem estruturas de resistência capazes de sobreviver no solo por longos períodos (AGRIOS, 2005).

Entre os patógenos foliares, *Septoria lactucae* foi encontrado em 85,7% das propriedades enquanto *Bremia lactucae* em 100% (TABELA 6). Esse último foi relatado no Brasil, infectando alcachofra (*Cynarascolymus* L.) e duas espécies de plantas daninhas: serralha lisa e serralha de espinho (*Sonchus oleraceus* e *S. asper* L.) (VIEIRA; BARRETO, 2006), ambas da família *Asteraceae* e presentes nas lavouras de alface.

4.6 Sazonalidade de doenças e patógenos em alface americana em municípios do sul de Minas Gerais

No total, foram realizadas 1226 observações de frequência de doenças dentre os 13 agentes etiológicos encontrados, durante os 12 meses de levantamento nas sete propriedades. Desse modo, o patógeno com maior frequência de ocorrência ao longo do tempo foi *X. axonopodis pv. vitians*, com 303 relatos, correspondendo a 24,7 % do total (FIGURA 12), seguida dos *Tospovirus* com 233 ocorrências do total de 1226.

Figura 12 – Frequência e número de registros para todos os agentes etiológicos observados na cultura da alface americana em municípios do sul de Minas Gerais.



*TCSV, GRSV. **MLBVV e LBVaV

O maior número de relatos de *X. axonopodis pv. vitians* pode estar associado à disseminação da bactéria, por meio de sementes (PERNEZNY et al. 2001). Além da sobrevivência da mesma em plantas daninhas (*Lactuca scariola* L., *L. canadensis* L., *L. ludoviciana*, *L. pulchella*, *Sonchus oleraceus* e *Malva parviflora*), próximas às lavouras, sem exibir sintomas característicos da doença como manchas angulares com aspecto de encharcamento, e o mais importante, sobrevivência da bactéria em restos culturais por até

cinco meses, transformando-se em fontes de inóculo para os ciclos subsequentes (BARAK; KOIKE; GILBERTSON, 2001).

Embora houve maior ocorrência de *X. axonopodis* pv. *vitians*, plantas de alface infectadas por *Tospovirus* ficam totalmente comprometidas, por assumirem formas irregulares e sintomas de bronzeamento, inviabilizando o produto e, conseqüentemente, devem ser retiradas da lavoura para impedir novas infecções. Já aquelas com sintomas da bactéria podem ser comercializadas, em razão do patógeno não afetar diretamente a “cabeça” da alface, somente as folhas externas, desse modo, as folhas são retiradas e a planta é comercializada.

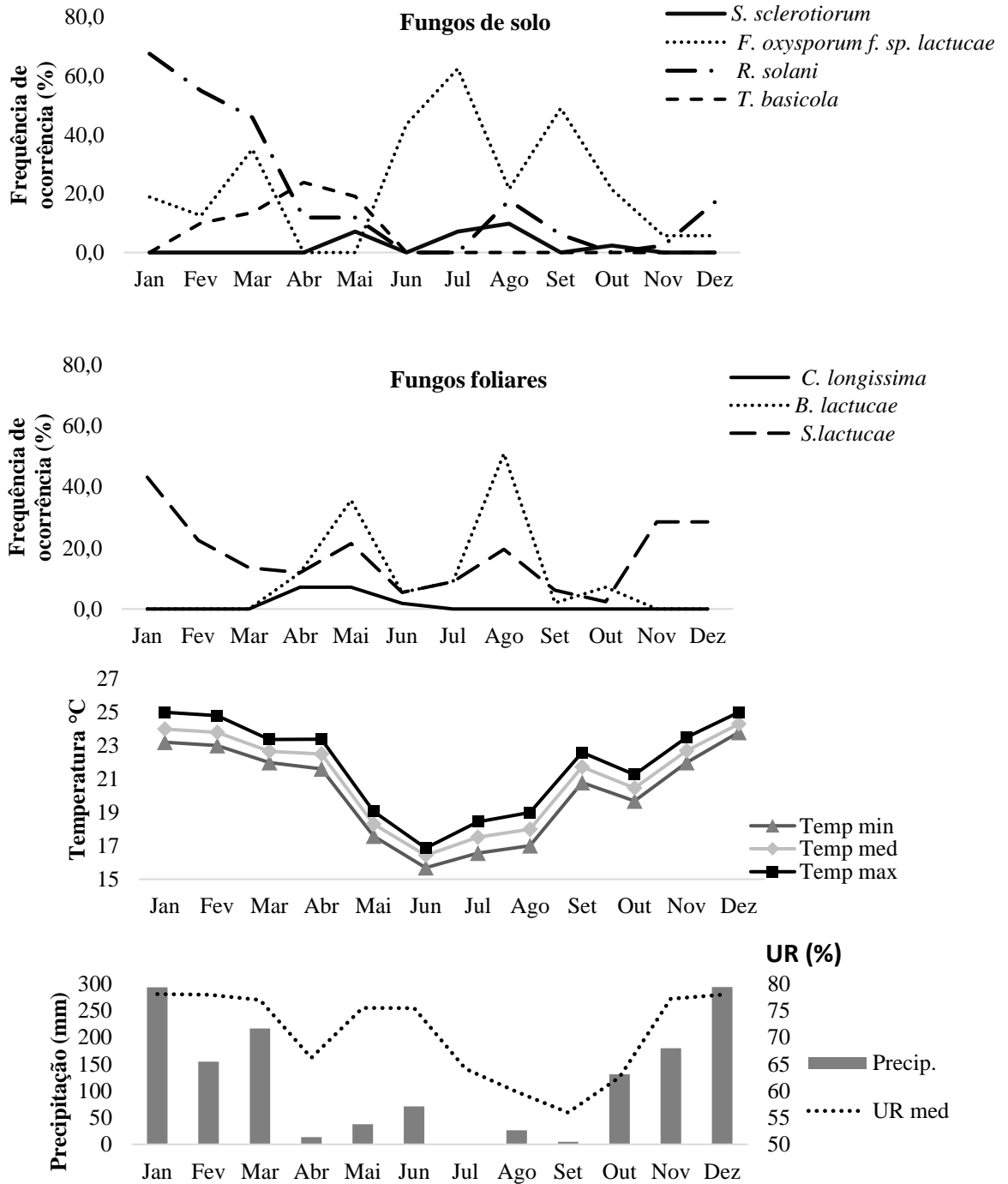
As doenças de etiologia fúngica foram detectadas 416 vezes (FIGURA 12). Dentre os fungos, *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* foi o de maior ocorrência ao longo do tempo, com 132 observações em 1226 totais, representando 10,8% dos relatos. Enquanto a *C. longissima* foi observada 7 vezes, equivalente a 0,6% de todas as doenças relatadas. A ampla disseminação do *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* está relacionada com sua transmissão, por meio de sementes (GARIBALDI; GILARDI; GULLINO, 2004), por esporos aderidos em equipamentos agrícolas ou tubos de irrigação (MATHERON et al., 2005), e também por sobreviver no solo na forma de clamidósporos, durante longos períodos (GARIBALDI; GILARDI; GULLINO, 2004). Embora Lopes, Quezado e Reis (2010), não considerarem esse patógeno como um dos mais severos à alface, no estado da Califórnia nos Estados Unidos (GARIBALDI; GILARDI; GIULLINO, 2002) houve relatos de perdas na produção superiores a 50%.

Assim, a maior frequência de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* entre os fungos encontrados, neste trabalho, comprovam prevalência do mesmo, o qual pode acarretar em maiores perdas se sua frequência continuar aumentando nos campos, pela dificuldade no seu manejo, por esse patógeno apresentar estruturas resistentes sobreviventes no solo.

A baixa ocorrência observada de *C. longissima* deve-se ao fato dessa doença ser comum em variedades de folha lisa além de maior frequentes em cultivos protegidos. Esse patógeno prevalece em áreas produtoras de alface da região Norte e Nordeste do Brasil (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010). Apesar disso, na Costa do Marfim é considerada a doença mais severa, acarretando perdas de até 100% na produção de alface (SNOWDON, 2010).

As frequências de ocorrência de cada doença foram plotadas com as variáveis climáticas. Para doenças de etiologia fúngica, foi observada ocorrência de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* em todos os meses, com exceção de abril e maio (FIGURA 13).

Figura 13 – Frequência de ocorrência de espécies de fungos de solo e foliares, médias mensais das variáveis climáticas, temperatura mínima, média e máxima, umidade relativa (UR) e precipitação acumulada.



Entretanto, a maior frequência de Fusariose foi de 62,5% no mês de julho, quando a temperatura permaneceu de 15° a 18 °C e a precipitação foi inferior a 100 mm. Esse resultado discorda dos obtidos por Gordon e Koike (2015), cuja ocorrência de *F. oxysporum* f sp. *lactucae* foi menor durante os três meses de temperatura entre 23° a 25°C, no estado da Califórnia, e Matheron et al., (2005) cuja frequência do mesmo patógeno foi 88% quando a temperatura era de 26 °C no estado do Arizona (EUA). Desse modo, houve maior severidade da Fusariose da alface quando a temperatura se elevou (21° a 32 °C), e, por fim, ocasionou perdas na produção de 51 a 100%. Todavia, foi constatado severidade da doença em temperaturas de 18° a 23°C quando testados com duas concentrações de inóculo (SCOTT; GORDON, 2010). Já houve relatos de cultivares de alface tipo americana sofrerem perdas de 2,3% em temperaturas entre 11° a 14°C (MATHERON; PORCHAS, 2010). Assim, as maiores frequências de Fusariose observadas em baixas temperaturas, no presente estudo, podem estar relacionadas ao atraso no desenvolvimento da cultura, nessa época do ano, tornando as plantas mais suscetíveis à infecção do patógeno e, também em decorrência do cultivo de vários ciclos da cultura na mesma área, aumentando a pressão de inóculo.

Rhizoctonia solani teve maior frequência de ocorrência (67,6%) no mês de janeiro (FIGURA 13), quando a temperatura, precipitação e umidade relativa foram as maiores registradas (25°C, 300 mm e 80%). No entanto, a queima da saia não ocorreu nos meses de junho e julho quando a temperatura e a precipitação eram as mínimas registradas (15° C e 70 mm). Blancard, Lot e Maisonneuve (2004), descrevem como temperatura ótima para ocorrer a doença no campo de 23° a 27°C, com presença de umidade, concordando com os resultados encontrados neste estudo. Grosch; Schneider e Kofoet (2004) obtiveram resultados semelhantes, cuja faixa para desenvolvimento micelial do patógeno foi de 20° a 30°C, todavia, 25°C foi a temperatura ótima, com maior agressividade na cultura da alface. No entanto, recentes estudos em Chipre (KANETIS; TSIMOURIS; CHRISTOFOROU, 2016) observaram a temperatura de 20° a 30°C como ideal para crescimento micelial de isolados de *Rhizoctonia* sp. de batata.

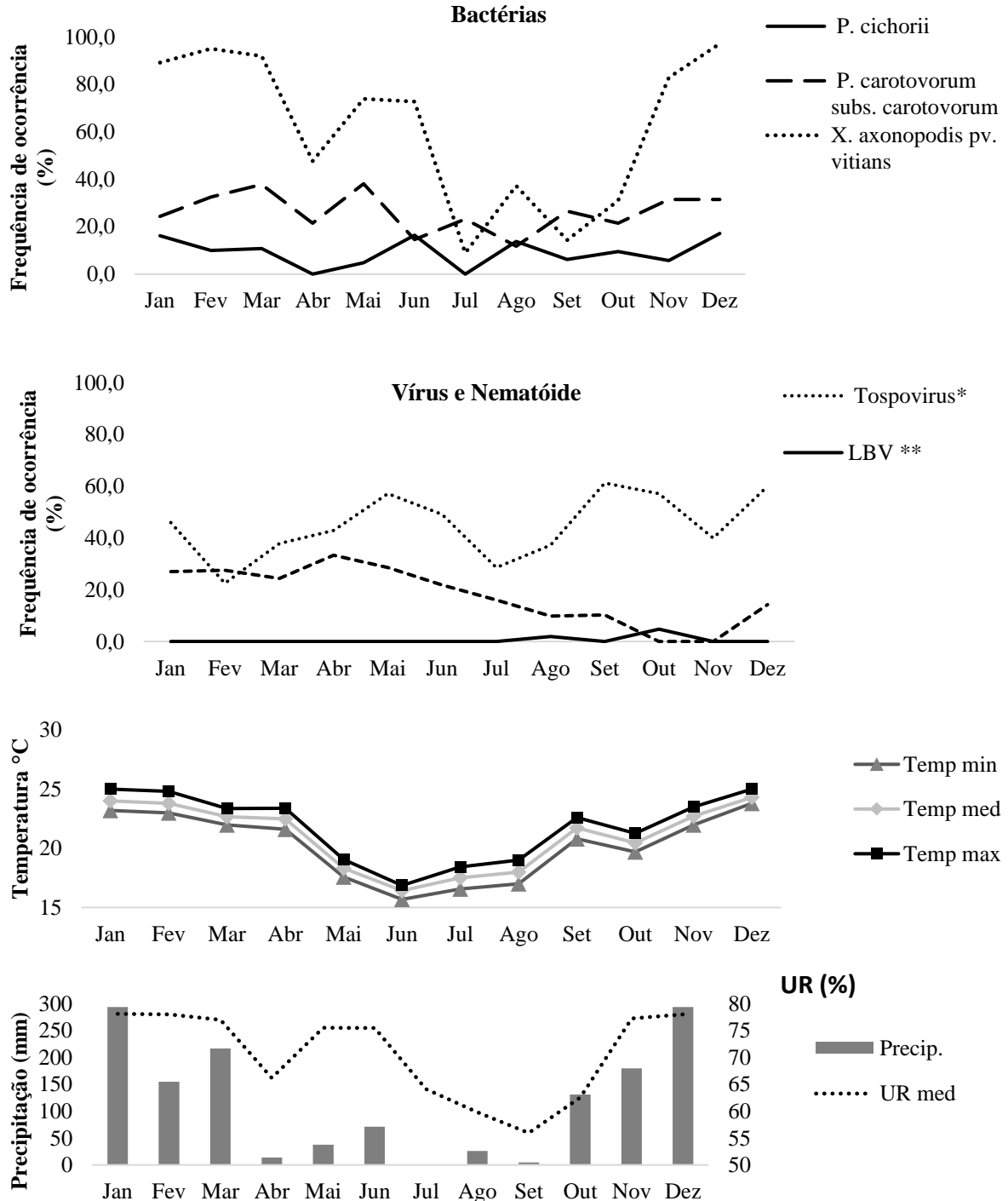
O Míldio (*Bremia lactucae*) apresentou maiores frequências de ocorrência nos meses de maio e agosto com 36% e 51%, respectivamente (FIGURA 13), quando as temperaturas mínimas registradas eram de 17° C, com umidade relativa próxima de 70%, confirmando ser uma doença típica de climas amenos. Conforme relatado por Lopes, Quezado e Reis (2010), quando a temperatura é baixa e as folhas ficam constantemente molhadas por irrigação, chuva ou orvalho, o Míldio é responsável por perdas de até 80% na produção. Nunes et al., (2016) citaram período de molhamento, umidade relativa e temperatura como fatores importantes

para a germinação e penetração do patógeno. De acordo com Blancard, Lot e Maisonneuve (2004), os grandes períodos de molhamento foliar no período da manhã favoreceram as infecções, temperaturas diurnas entre 12° e 20 °C fazem a esporulação do patógeno ser intensa e, a irrigação por aspersão beneficiou o aparecimento do Míldio. Essas condições foram semelhantes às relatadas, neste estudo, bem como as lavouras estudadas também possuíam irrigação por aspersão. Os resultados apresentados também se assemelharam com estudos de Su et al., (2004), cuja sobrevivência dos conídios foi ótima aos 23°C e a umidade relativa permaneceu entre 33 e 76%. Todavia, a temperatura ótima para infecção foi 15°C (VAN BRUGGEN; SCHERM, 1997), assim, com 20°C e 2 horas de molhamento foliar ou 23° a 26°C com 3 horas de molhamento foi suficiente para causar infecção por *B. lactucae* (FALL et al., 2015). Contudo, para facilitar a germinação dos conídios e penetração do patógeno, *B. lactucae* necessita de molhamento foliar e baixas temperaturas, ocorridas no orvalho, além de condições de alta umidade relativa beneficiadas com irrigação por aspersão, tornando-as favoráveis ao aparecimento da doença.

O fungo *Septoria lactucae* ocorreu o ano todo, porém, sua maior frequência foi observada em épocas de maior temperatura (25°C), precipitações elevadas (300 mm) e umidade relativa alta (80%) (FIGURA 13). Os períodos prolongados de molhamento foliar em combinação com temperaturas favoráveis à germinação foram fatores importantes para desenvolvimento da *S. lactucae* em alface (NAO, 2008) e *S. lycopersici* em tomate (SUGHA; KUMAR, 2000). A Septoriose é uma doença importante em épocas chuvosas e cultivos irrigados por aspersão (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010). Conforme os resultados obtidos por Nao (2008), a temperatura de 25°C associada com 12 horas de molhamento foliar foi suficiente para desenvolvimento dos sintomas de *S. lactucae*, semelhante aos resultados obtidos neste trabalho. Temperaturas adequadas de 20° a 25°C estimularam a formação de picnídios nas folhas e na parte superior dessas estruturas, formaram-se massa de esporos (cirros), cuja liberação foi realizada somente na presença de filme de água (LOHMEIER et al., 2013). Não havendo água, os conídios não germinaram e dificilmente são disseminados por meio do vento (PAVAN; KUROSZAWA, 1997). Contudo, para Lohmeier et al., (2013), no desenvolvimento da Septoriose em alface é necessário molhamento foliar de 20 horas e temperaturas próximas a 15°C ou molhamento de 24 horas e temperaturas entre 20° e 25°C, elucidando os resultados obtidos neste estudo, maior frequência de ocorrência do patógeno em temperaturas e umidades relativas elevadas.

O patógeno bacteriano de maior frequência de ocorrência foi *X. axonopodis* pv. *vitians* (FIGURA 14).

Figura 14 – Frequência de ocorrência de espécies de bactérias, vírus e nematoides, médias mensais das variáveis climáticas, temperatura mínima, média e máxima, umidade relativa (UR) e precipitação acumulada.



Foi observado em frequências elevadas, ao longo de todo ano, porém foi encontrada menor frequência de sua ocorrência em quedas de temperaturas e baixas precipitações. Blancard, Lot e Maisonneuve (2004), também relataram a dispersão da bactéria ocorrendo por meio de água da chuva a qual ocasionou ferimentos nas folhas de alface, facilitando a penetração das bactérias. Os maiores valores de frequência de *X. axonopodis* pv. *vitians* foram acima de 95% nos meses de fevereiro e dezembro quando a umidade relativa foi de 78%, e as temperaturas máximas em torno de 25°C. Blancard, Lot e Maisonneuve (2004) registraram a necessidade de períodos úmidos, orvalhos matinais, chuvas e irrigação por aspersão para progresso da bacteriose. Os autores mencionaram desenvolvimento da bactéria entre 0 e 35°C, sendo este, o motivo de sua ocorrência ao longo do ano. Entretanto, segundo os mesmos autores, a faixa ótima para desenvolvimento da bactéria é de 25° a 28°C. Sob condições de umidade relativa de 90% provocadas por neblina, irrigação por aspersão ou chuva, a doença pode disseminar-se rapidamente causando perdas na produção (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010), sendo essas condições similares as do presente trabalho.

Os sintomas de *Tospovirus* também foram observados em todos os meses, mantendo a frequência de ocorrência da doença entre 20 e 50% (FIGURA 14), contudo os maiores valores foram registrados nos meses de maio, setembro e dezembro com 57%, 61% e 61%, respectivamente. No Brasil, os vetores dessa virose em alface são os tripses, *Frankliniella occidentalis* e *F. shultzei* (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010). Segundo Nondillo et al., (2008), a faixa de temperatura mais indicada para desenvolvimento do inseto é de 23° a 26°C, sendo essas condições semelhantes às encontradas neste estudo. Porém, quando a temperatura aumenta, o número de dias do ciclo biológico do tripses é reduzido. Os mesmos autores propuseram ciclo de 18 dias para o tripses em temperaturas próximas a 22°C, no entanto, aos 27°C o ciclo diminuiu para 11 dias, aumentando o número de gerações no ambiente. Os tripses adquirem os vírus na fase larval e os transmitem de maneira persistente propagativa circulativa na fase adulta (WHITFIELD; ULLMAN; GERMAN, 2005). Dessa maneira, a permanência das frequências de ocorrência dos *Tospovirus*, ao longo dos meses deve-se às seguintes hipóteses: 1. Faixa ideal de temperatura para o desenvolvimento do ciclo biológico do tripses; 2. A fase de pupa do inseto ocorrer no solo e, apesar de imóvel, mantém a infecção viral, e permanece escondida da ação de inseticidas, assim, quando o adulto emergir estará ativo para disseminação do vírus. 3. Os ovos são ovopositados dentro dos tecidos das plantas, as quais os protegem dos defensivos agrícolas (PAVAN et al., 2008); 4. Os vírus podem manter-se em plantas daninhas circundantes aos cultivos de alface, ao longo de todo o ano,

tais como *Amaranthus spp.*, *Ipomoea sp.*, *Anagallis arvensis*, *Chenopodium amaranticolor*, *Convolvulus arvensis* e *Solanum nigrum* (BLANCARD; LOT; MAISONNEUVE, 2004).

Portanto, a tospovirose é uma doença fatal à cultura da alface, pois condena e compromete totalmente a planta afetada, inviabilizando-a para comercialização e consumo, sendo seu vetor de difícil controle por meio de inseticidas. Assim, caso a planta infectada não seja retirada da lavoura, será fonte de inóculo dos vírus, pois ainda não existem viricidas para seu controle ou cultivares resistentes a esses vírus (LOURENÇAO et al., 1997).

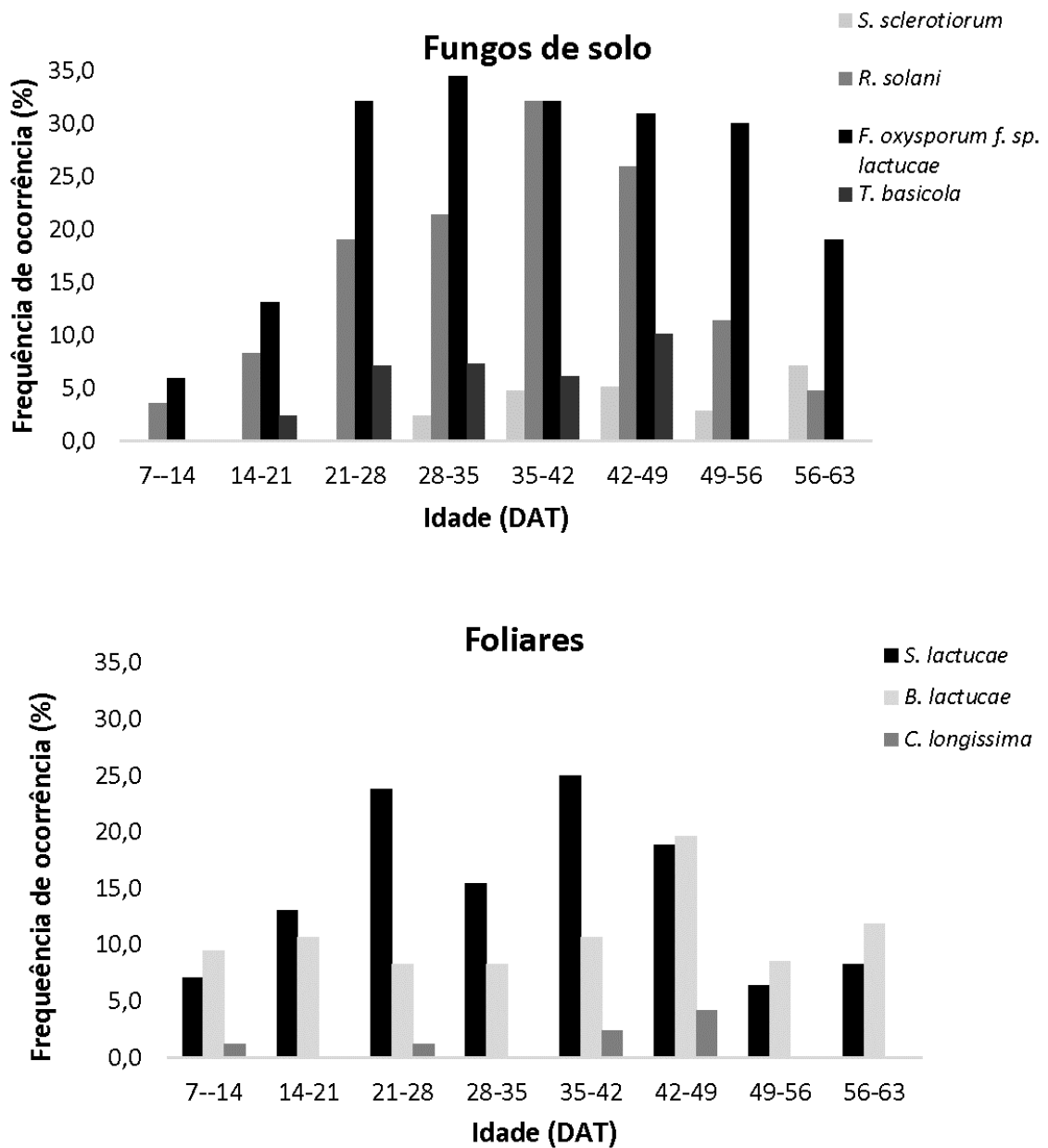
Para os nematoides das galhas (*Meloidogyne spp.*), a maior frequência de ocorrência foi de 35% no mês de abril (FIGURA 14). A duração do ciclo de vida dos *Meloidogyne spp.* variam de acordo com a temperatura, a umidade relativa e a planta hospedeira (TAYLOR; SASSER, 1983). Nos resultados de Ferraz, (2001) o ciclo de *Meloidogyne spp.* completou-se em 21 a 28 dias quando a temperatura foi de 27°C, podendo o mesmo variar com alterações de temperatura. Segundo Blancard, Lot e Maisonneuve (2004), a faixa de temperatura ideal para o ciclo de desenvolvimento de *Meloidogyne spp.* foi de 18° a 27°C, faixa encontrada neste estudo. Os nematoides desse gênero podem sobreviver às condições de extrema temperatura, reduzindo ou paralisando atividades vitais e, podendo também ocorrer em temperaturas inferiores a 5°C ou superiores a 40°C (FERRAZ, 2001). Em estudo de Mendonça et al., (2016) na cultura da alface, com temperatura de 26°C e precipitação de 342,5 mm, no terceiro ciclo seguido da cultura na mesma área, não houve dano no desenvolvimento dessa hortaliça. Entretanto, a partir do quarto ciclo consecutivo, os autores notaram aumento de 65% no número de galhas por planta e de 56% na população final. Sendo assim, *Meloidogyne spp.* foi favorecido por vários ciclos consecutivos da cultura na mesma área e, provavelmente por temperaturas elevadas nos ciclos anteriores, beneficiando a reprodução dos nematoides, tornando-os expressivos a partir do quarto ciclo da cultura. Os resultados do presente trabalho coincidiram com os dos autores citados, constatando dificuldade no manejo desse gênero, por também apresentar ampla gama de hospedeiro e elevada taxa de reprodução (FREIRE et al., 2002), podendo ocasionar perdas de 100% na produção (CHARCHAR, 1995).

Dessa maneira, em razão da intensa relação entre ambiente e doenças em plantas, mudanças na distribuição geográfica e temporal das doenças podem ocorrer como resultado das alterações climáticas.

4.7 Relação entre as fitodoenças e a idade das plantas de alface nos lotes avaliados

Os patógenos *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* e *R. solani* foram identificados em todos os lotes avaliados (FIGURA 15).

Figura 15 – Frequência de ocorrência dos gêneros de fungos de solo e foliares distribuídos de acordo com idade dos lotes.



(DAT) – Dias após o transplântio.

Ambas as espécies tiveram distribuição de frequência de ocorrência semelhante ao longo do ano. A maior frequência para *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* foi de 35% em lotes de 28 a 35 DAT, enquanto para *R. solani* foi 33% em lotes de 34 a 42 DAT. Segundo Lopes, Quezado e Reis (2010), os fungos de solo ocorrem com menor incidência nas lavouras, comparados com os foliares, no entanto, no presente estudo a frequência de ocorrência dos patógenos de solo superaram os foliares. Em decorrência dos fungos de solo possuírem estruturas de resistência sobreviventes no solo e, as lavouras da cultura permanecerem por vários ciclos na mesma área, o manejo das mesmas torna-se difícil. Assim, a tendência desses patógenos é de ocorrer durante o ano todo, exceto quando a temperatura for desfavorável para o seu desenvolvimento.

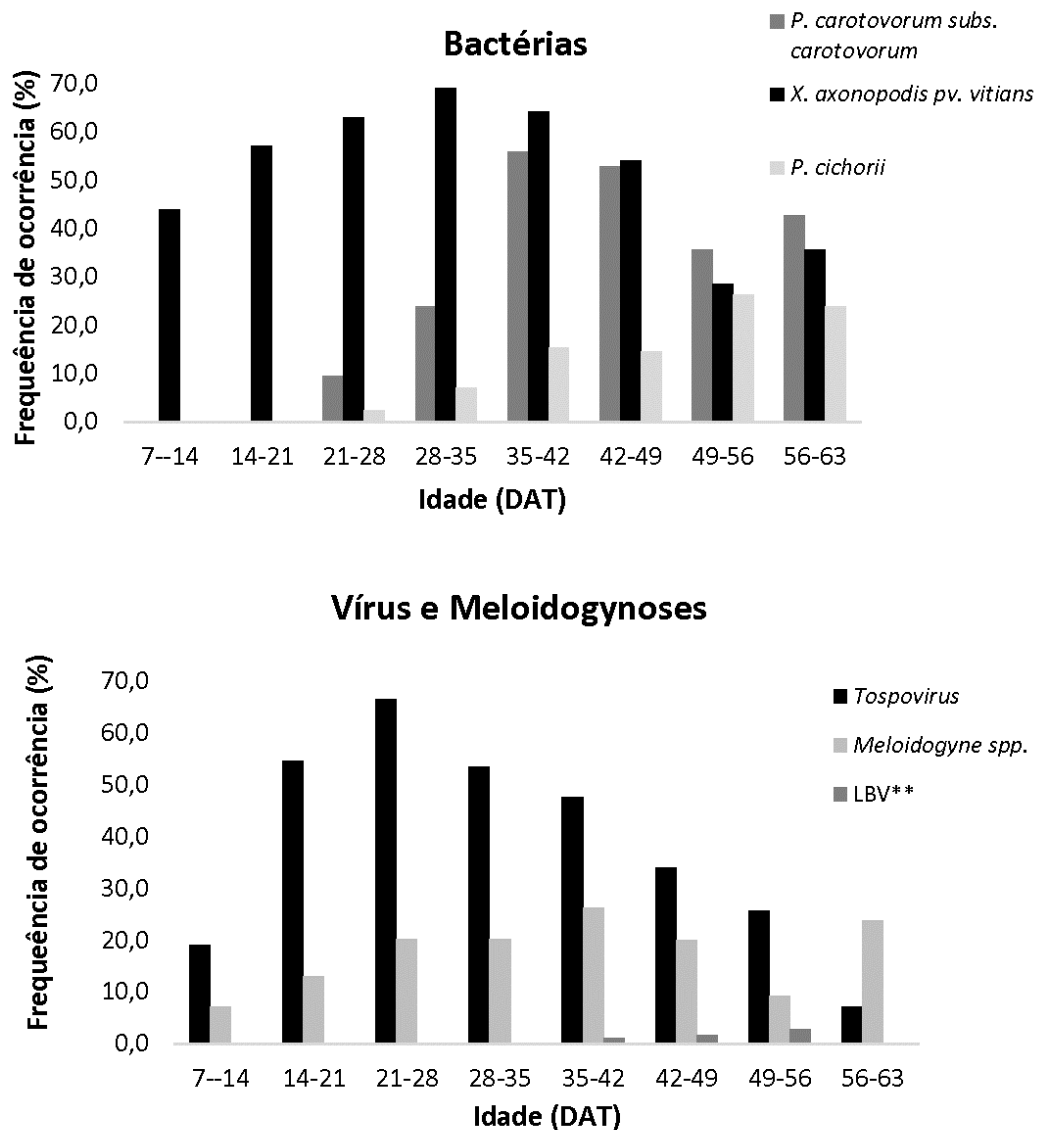
Rhizoctonia solani ocasiona Queima da saia. De acordo com Blancard, Lot e Maisonneuve (2004) e Lopes, Quezado e Reis (2010) esse fungo é encontrado em plantas adultas próximas ao ponto de colheita (FIGURA 15). Coincidindo essa observação com os resultados deste estudo, cuja maior ocorrência do patógeno se deu em lotes próximos ao ponto de colheita (42 a 45 dias no verão). Também foi observada a doença em plantas de 7 a 14 DAT, porém em baixas frequências de ocorrência (3,6%). A ocorrência do patógeno em plantas jovens pode ser decorrente do excesso de água na irrigação por aspersão, juntamente com altas precipitações e temperaturas favoráveis ao patógeno. Desse modo, os solos permanecem úmidos e favoráveis ao aparecimento de *R. solani*. Existem relatos da ocorrência de *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* em plantas jovens de alface com 14 dias após semeadura (MATHERON et al., 2005) e 37 dias (GORDON; KOIKE, 2015), concordando com as baixas frequências obtidas de 6% em plantas nos lotes de 7 a 14 DAT (FIGURA 15). Plantas jovens infectadas com o patógeno murcham e morrem (BLANCARD; LOT; MAISONNEUVE, 2004), todavia, plantas adultas infectadas sobrevivem nas lavouras, mas ficam atrofiadas (MATHERON; PORCHAS, 2010). Assim, os números de plantas com sintomas da doença aumentam na maturidade em comparação com o início do desenvolvimento da cultura (MATHERON et al., 2005)

As doenças foliares, Míldio e Septoriose foram encontradas em todos os lotes, ao longo do ciclo da alface (FIGURA 15). A frequência de ocorrência dos patógenos, ao longo das datas de plantio, permaneceu de 10 a 25% nos lotes. Segundo Blancard, Lot e Maisonneuve (2004), plantas jovens são mais sensíveis ao Míldio comparadas às velhas, porém ambas as doenças podem iniciar-se de sementes infectadas (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010), além disso, chuvas nas fases iniciais da cultura podem dispersar esporos por

meio de respingos de água (LOHMEIER et al., 2013). Portanto, em condições favoráveis à ocorrência dos patógenos, a doença pode manifestar-se em todas as idades da planta.

As bactérias *P. carotovorum subs. carotovorum* e *P. cichorii* ocorreram em elevadas frequências nos lotes com maiores DAT (FIGURA 16).

Figura 16 – Frequência de ocorrência das espécies bacterianas, doenças viróticas e *meloidogynoses* distribuídos de acordo com idade dos lotes.



*TCSV e GRSV. **MLBVV e LBVaV

(DAT) – Dias após o transplante.

Esses patógenos necessitam de plantas maduras no final do ciclo da cultura, próximas à colheita, para expressar sintomas. Desse modo, na alface tipo americana é necessária a formação da “cabeça” da alface, cujo desenvolvimento completo ocorre com 42 a 45 dias no verão e, 56 a 63 dias no inverno. Assim, foi constatada alta frequência desses patógenos em lotes no final do ciclo da cultura. Por outro lado, *X. axonopodis* pv. *vitians* apresentou elevada frequência de ocorrência em todos os lotes avaliados. A distribuição dessa bactéria, ao longo do ciclo da alface, pode estar relacionada à falta de bactericidas recomendados para cultura, aos compostos à base de cobre serem fitotóxicos à alface (BULL et al., 2015), à irrigação por aspersão favorecer o crescimento e dispersão do patógeno para áreas isentas da doença (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010), a bactéria ser disseminada por meio de sementes (UMESH; KOIKE; GILBERTSON, 1996; LOPES; QUEZADO; REIS, 2010), e manter-se viável em resíduos de plantas por meses, como fonte de inóculo para os ciclos seguintes (BARAK; KOIKE; GILBERTSON, 2001).

Os sintomas de *Tospovirus* foram observados em todos os lotes avaliados (FIGURA 16). A maior frequência de ocorrência foi observada no lote de 21 a 28 DAT. A queda de frequência, a partir desse lote, possivelmente está relacionada com a retirada de alfaces infectadas do campo. Nessa idade, as plantas apresentavam porte pequeno e os sintomas da doença não foram facilmente identificados, necessitando de precisão visual para detectar a doença e, acarretando em elevados custos de mão de obra para a execução do serviço. De tal modo, as alfaces permaneceram no campo. Assim, a partir do lote de 21 a 28 DAT, as plantas desenvolvidas facilitaram a identificação dos sintomas, e as alfaces foram retiradas da lavoura para evitar fontes de inóculo, diminuindo a frequência de ocorrência dos *Tospovirus* nos demais lotes.

Foram listados os primeiros registros dos agentes etiológicos dentro de cada mês (TABELA 7), durante os 12 meses avaliados. Em todos os meses, o primeiro relato de *X. axonopodis* pv. *vitians* ocorreu nos lotes jovens de 7 a 14 DAT, porém nos meses frios, a bactéria foi encontrada em plantas mais adultas com 14 a 21 e 28 a 35 DAT. Conforme relatado por Blancard, Lot e Maisonneuve (2004), houve instalação epifítica da bactéria sobre alfaces jovens no campo, sem exibir sintomas da doença. Entretanto, após condições favoráveis de presença de água, o patógeno, na superfície da folha, penetrou facilmente na planta por aberturas naturais (estômatos e hidatódios) (LOPES; QUEZADO; REIS, 2010), evidenciando a ocorrência dessa bactéria em plantas jovens na presença de condições climáticas favoráveis.

Tabela 7 – Relato da primeira ocorrência dos patógenos, de acordo com os lotes de idade das plantas de alface definidas de 7 a 56 dias após transplântio durante os meses de avaliação das doenças.

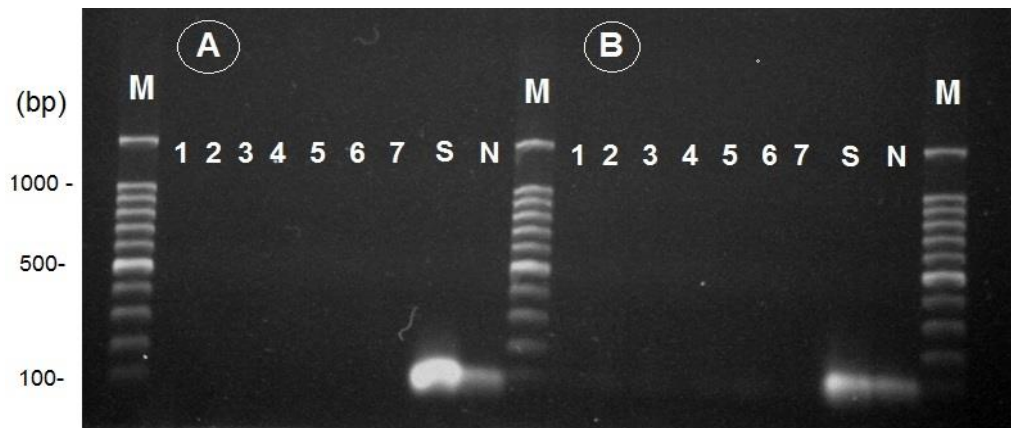
		Registros da primeira ocorrência de acordo com meses do ano											
		Meses											
Agente etiológico	Gêneros/Espécies	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Fungos	<i>F. oxysporum f. sp. lactucae</i>	21-28	21-28	7-14	-	-	7-14	14-21	21-28	14-21	14-21	21-28	28-35
	<i>R. solani</i>	7-14	14-21	14-21	35-42	28-35	-	-	28-35	42-49	49-56	-	28-35
	<i>S. lactucae</i>	07-14	14-21	21-28	14-21	14-21	42-49	14-21	28-35	21-28	35-42	07-14	07-14
	<i>B. lactucae.</i>	-	-	-	7-14	7-14	7-14	35-42	7-14	49-56	7-14	-	-
	<i>T. basicola</i>	-	14-21	21-28	14-21	21-28	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. sclerotiorum</i>	-	-	-	-	28-35	-	28-35	28-35	-	49-56	-	-
	<i>C. longissima</i>	-	-	-	21-28	28-35	7-14	-	-	-	-	-	-
Bactérias	<i>X. axonopodis pv. vitians</i>	7-14	7-14	7-14	7-14	7-14	14-21	28-35	7-14	7-14	14-21	7-14	7-14
	<i>P. carotovorum subs. carotovorum</i>	21-28	21-28	21-28	35-42	28-35	28-35	28-35	35-42	35-42	21-28	21-28	21-28
	<i>P. cichorii</i>	28-35	28-35	21-28	-	42-49	49-56	-	42-49	35-42	42-49	28-35	28-35
Nematoides	<i>Meloidogyne. spp</i>	7-14	7-14	7-14	7-14	7-14	14-21	21-28	35-42	28-35	-	-	14-21
Vírus	<i>Tospovirus*</i>	7-14	7-14	7-14	7-14	7-14	7-14	7-14	7-14	7-14	7-14	7-14	7-14
	LBV**	-	-	-	-	-	-	-	35-42	35-42	42-49	-	-

*TCSV e GRSV **MLBVV e LBVaV

Os primeiros relatos da doença ocasionada por *Tospovirus* foram sempre nos lotes de 7 a 14 DAT (TABELA 7) em todos os meses analisados. Esses resultados assimilaram-se com os de Shrestha et al., (2015), cuja maior suscetibilidade à TSWV foi atribuída às plantas jovens de amendoim. Neste estudo, os autores constataram maior incidência de TSWV (80%) em plantas novas com uma semana de idade, comparadas com 40% de incidência em plantas com quatro semanas. No entanto, plantas de amendoim com duas semanas de idade apresentaram incidência de 73%, superando as com quatro semanas. Mandal, Pappu e Culbreath (2001) demonstraram maiores incidências de TSWV em plantas jovens de amendoim com 7 dias após o plantio, quando comparadas às plantas com idade superior (35 dias após plantio). A suscetibilidade de plantas jovens está associada ao tripses preferir plantas novas para se alimentar, em razão da menor espessura da folha e maiores concentrações de nutrientes tal como nitrogênio (TAIZ; ZEIGER, 2010). Contudo, de acordo com estudos, a população de tripses e a suscetibilidade do hospedeiro têm papel importante na transmissão de tospovirose (SHRESTHA et al., 2015).

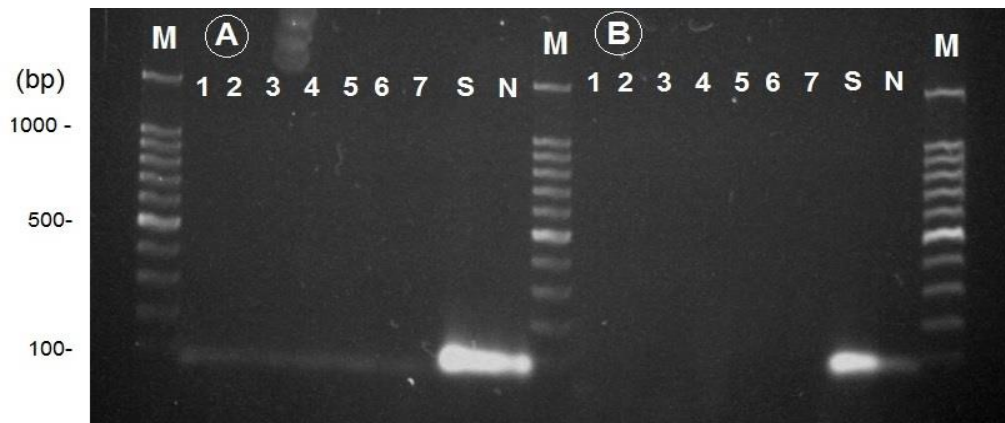
Em decorrência dos sintomas de *Tospovirus* serem sempre relatados nos lotes mais jovens de 7 a 14 DAT, sugeriu-se a hipótese da infecção por tripses nas mudas ocorrer ainda nos viveiros, e essas plantas serem levadas para o campo já infectadas com o patógeno, embora estivessem assintomáticas. No entanto, após ser realizada RT-PCR para sua confirmação, não foi amplificada nenhuma banda referente aos primers testados (FIGURA 17 e 18). Contudo, nenhuma espécie de *Tospovirus* foi detectada nas folhas provenientes de mudas dos viveiros. Dessa forma, supõe-se ocorrência da infecção no campo, após ser desconsiderada a disseminação do vírus via semente (GOLDBACH; PETERS, 1994).

Figura 17 - Gel de agarose dos produtos da RT-PCR utilizando os pares de *primers*: A - N5 e N3, para detecção de CSNV; B- Glyco4vc e Glyco5v para detecção de GRSV.



Legenda: (M) - Marcador de peso molecular 100 bp. (1-7) – Amostras de mudas coletadas nas propriedades avaliadas. (S) – Planta saudável de alface (sem sintoma de *Tospovirus*). (N) Controle negativo.

Figura 18 - Gel de agarose dos produtos da RT-PCR realizado em mudas de alface, utilizando os pares de *primers*: A -Nv2 e Nvc2, para detecção de TCSV; B- 723 e 722 para detecção de TSWV.



Legenda: (M) - Marcador de peso molecular 100 bp. (1-7) – Amostras de mudas coletadas das propriedades avaliadas. (S) – Planta saudável de alface (sem sintoma de *Tospovirus*). (N) Controle negativo.

5 CONCLUSÕES

Foram identificadas 13 doenças na cultura da alface.

As doenças bacterianas apresentaram maior frequência de ocorrência ao longo do tempo.

O agente etiológico de maior frequência de ocorrência foi *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians*, seguido dos *Tospovirus*.

O fungo de maior frequência foi *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*.

Xanthomonas axonopodis pv. *vitians* ocorreu em elevadas frequências ao longo do ano, no entanto as menores frequências foram observadas em baixas temperaturas.

As maiores frequências de ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* foram em temperaturas baixas.

As espécies de *Tospovirus* encontradas nas sete propriedades foram TCSV e GRSV, sendo os sintomas identificados em todos os meses do ano, em plantas com 7 a 14 dias após transplântio.

Não foram encontrados *Tospovirus* em plantas no viveiro.

Foram encontradas as espécies *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV) e *Mirafiori lettuce big vein virus* (MLBVV) ocasionando sintomas da doença 'Big vein'.

Foi encontrado *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* dentre as doenças ocasionadas por nematoides.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como perspectiva futura para dar continuidade aos plantios de alface americana nos municípios do sul de Minas Gerais, deve-se realizar medidas preventivas do manejo de doenças, principalmente em relação aos sintomas ocasionados por vírus do gênero *Tospovirus*. Desse modo, é importante a remoção das plantas daninhas e dos restos de cultura da área de cultivo, eliminando possíveis fontes de inóculo. A execução desse manejo acarretará em baixas perdas nos ciclos seguintes da cultura, e caso não sejam desempenhadas medidas para prevenir a ocorrência desses patógenos, em um futuro próximo, não será possível o plantio de alface nos municípios do sul de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; GROGAN, R. G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69, p. 899-904. 1979.
- ADKINS, S.; ROSSKOPF, E. N. Key West nightshade, a new experimental host for plant viruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1310-1314. 2002.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. New York: Elsevier Academic, 2005. 922p.
- AINSWORTH, G. C.; SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A. S. **The Fungi**. An advanced treatise. A taxonomic review with keys: Basidiomycetes and lower fungi. New York: Academic Press., 1973.Vol. IV B, 504p.
- ALEXOPOULOS C. J.; MIMS C.W.; BLACKWELL M. **Introductory Mycology**. 4th. ed. New York: Wiley & Sons, 1996. 869 p.
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. **Manual de fitopatologia: principios e conceitos**. 4.ed. Piracicaba: Ceres, 2011. 704p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **Hortifruti é o segmento que mais emprega por hectare no estado de SP**. Notícias, 2015. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/noticias/3050/hortifruti-e-o-segmen-to-que-mais-emprega-por-hectare-no-estado-de-sp>. Acessado em: 14 jan. 2017.
- BARAK, J. D.; KOIKE, S. T; GILBERTSON, R. L. Role of crop debris and weeds in the epidemiology of Bacterial Leaf Spot of lettuce in California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 196-178. 2001.
- BARROS, F. C. **Ocorrência de fungos em amostras recebidas no laboratório de micologia e proteção de plantas da Universidade Federal de Uberlândia no período de 2001 a 2008**. 2010. 43f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia)–Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2010.
- BENSON, D. M. et al. Temporal and spatial epidemiology of *Phytophthora* root rot in Fraser fir plantations. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 1171-1180. 2006.
- BERIAM, L. O. S. Palestra: Doenças bacterianas em hortaliças. **O Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 81-84. 2007.
- BEZERRA, I. C. et al. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 823–830. 1999.
- BLANCARD, D.; LOT, H.; MAISONNEUVE, B. **Enfermedades de las Lechugas: Identificar, Conocer y Controlar**. Madrid: Mundi-Prensa, 2004. 375 p.
- BULL, C. T. et al. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* is dependent on the host genotype. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, p. 316-324. 2015.

- 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**. 2012. 97f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2012.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532p.
- CAMPOS, V. P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N. C. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in tropical and subtropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1997. p. 387-470.
- CARISSE, O.; OUIMET, A.; TOUSSAINT, V. Evaluation of the effect of seed treatments, bactericides, and cultivars on Bacterial Leaf Spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 84, n. 3, p. 295-299. 2000.
- CASALI, V. W. D. et al. **Anotações de aula teorica sobre produção de alface**. Viçosa: UFV, 1979. 21p. (Mimeografado).
- CHARCHAR, J. M. **Meloidogyne em hortaliças**. In: Congresso Internacional de Nematologia Tropical, e 1º Congresso Brasileiro de Nematologia, 19, 1995. Rio Quente. Programa e Anais, Rio Quente, SBN/ONTA, p. 149-153.
- CHARCHAR, J. M; MOITA, A. W. Metodologia para seleção de hortaliças com resistência a nematóides: Alface/*Meloidogyne* spp. **Embrapa Hortaliças - Comunicado Técnico**, Brasília, nº 27, 8 p. 2005.
- CHAVES, A. L. R. et al. Detecção do *Groundnut ringspot tospovirus* em alface e tomateiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 50-53. 2001.
- COLARICCIO, A. et al. Presence of lettuce big-vein disease and associated viruses in a subtropical area of Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, p.792, 2003.
- COLARICCIO, A. et al. Diversidade de tospovírus em olerícolas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 177-182. 2001.
- COTTYN, B. et al. Development of a real time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grow lettuce, and its detection in irrigating water. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 453-461, 2011.
- DA SILVA, K. E. **Levantamento de doenças da alface e da couve em produção urbana de Lavras (MG) e Campina Grande (PB)**. 2015. 66f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2015.
- DAL SOGLIO, F. K. Manejo de doenças na perspeção da transição agroecológica. In: STADNIK, M.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: Editora UFSC, 2004. p. 1-16.
- DAVIS, B. J. Method and application to human serum protein. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 121, p. 404-427. 1964.

- DAVIS, R. M.; SUBBARAO, K. V.; KURTS, E. A. **Compendium of Lettuce Disease**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 1997. 79p.
- DE MARCHI, B. R. et al. Frequência do LMV, LeMoV e BiMV em três regiões produtoras de alface no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n.3, p.245-247, 2012.
- DECOTEAU, D. R. et al. **The lettuce growing handbook**: botany, field procedures, growing problems, and postharvest handling. Illinois: Oak Brook, 1995. 60p.
- DICK, M. W. **Straminipilous Fungi**: systematics of the *Peronosporomycetes* including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 670p.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. London: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608 p.
- EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Hortaliças**: Produção orgânica. Livraria Virtual EMATER, 2014. Disponível em:
<<http://www.emater.mg.gov.br/doc%5Csite%5Csereviceoseprodutos%5Clivraria%5COleicultura%5CHortali%5C7as%20%20Produ%5C7%C3%A3o%20Org%5C2nica.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2016.
- FALL, M. L. et al. *Bremia lactucae* infection efficiency in lettuce modulated by temperature and leaf wetness duration under Quebec field conditions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99 n. 7 p. 1010-1019. 2015.
- FAYETTE, J. et al. Organic compounds increase the efficacy of famoxadone þ cymoxanil in the control of bacterial leaf spot of lettuce. **Crop Protection**, Guildford, v. 89, p. 47-50. 2016.
- FELIX, K. C. S. et al. Lettuce genotype resistance to “soft rot” caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71. n. 4. p. 287-291. 2014.
- FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 15-38.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ed. Viçosa: Editora UFV. 2008. 421p.
- FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Statistical Yearbook**. FAOSTAT, 2017. Disponível em
<<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.pdf>> Acesso em : 13 jan. 2017.
- FREIRE, C. R. et al. Cromossomos de três espécies brasileiras de *Meloidogyne*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 900-903, 2002.
- FREIRE, J. R. J. Uma bacteriose em alface (*Lactuca sativa* L.) causada por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. **Revista Agronomica**, Porto Alegre, v. 17 p. 36-40. 1954.

- GARIBALDI, A.; GILARDI, G.; GIULLINO, M. L. First report of *Fusarium oxysporum* on lettuce in Europe. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1052, 2002.
- 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, 2004.
- GHINI, R. **Mudanças climáticas e doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 104p.
- GOLDBACH, R.; PETERS, D. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. **Virology**, New York, v. 5, p. 113-120. 1994.
- GORDON, T. R.; KOIKE, S. Management of Fusarium wilt of lettuce. **Crop Protection**, Guildford, v. 73, p. 45-43. 2015.
- GOULART, A. C. P. Levantamento de doenças fúngicas em hortaliças na região norte de M.G. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 110-112. 1990.
- GROSCH, R.; SCHNEIDER, J. H. M.; KOFOET, A. Characterisation of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups causing bottom rot in field grown lettuce in Germany. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 53–62. 2004.
- HAO, J. J.; SUBBARAO, K. V. Distribution of *Lettuce big vein* incidence under three irrigation systems. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 2. 2014.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976. 1970.
- KANETIS, L.; TSIMOURIS, D.; CHRISTOFOROU, M. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with Black scurf in Cyprus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 8, p.1591-1598. 2016.
- KING, J. E. Cereal survey methodology in England and Wales. In: TENG, P. S.; KRUPA, S. V. **Crop loss assessment which constrain production and crop improvement in agriculture and forestry**. Minnesota: University of Minnesota.1980. p. 124-133.
- KOHN, L. M. et al. Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 8, p. 1047-1051. 1988.
- KUNIEDA de ALONSO, S.; ALFENAS, A. C. Isoenzimas na taxonomia e na genética de fitonematóides. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de Isoenzimas e proteínas e afins: Fundamentos e Aplicações em Plantas e Microrganismos**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p. 525-543.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388 p.
- LOHMEIER, U. et al. Factors affecting incidence and severity of leaf spot disease on lettuce caused by *Septoria birgatae*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 162, p. 221-230. 2013.

- LOPES, C. A.; QUEZADO, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2010. 68 p.
- MANDAL, B.; PAPPU, H. R.; CULBREATH, A. K. Factors affecting mechanical transmission of Tomato spotted wilt virus to peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Disease**, Saint Paul, v.85, p. 1259-1263. 2001.
- MATHERON, M. E.; PORCHAS, M. Evaluation of soil solarization and flooding as management tools for fusarium wilt of lettuce. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 1323-1328, 2010.
- MATHERON, M. E. et al. Effect of planting date, cultivar, and stage of plant development on incidence of fusarium wilt of lettuce in desert production fields. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 565-570. 2005.
- MATUO, T.; MOTOHASHI, S. On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n.f. causing root of lettuce. **Transactions of Mycological Society of Japan**, Tokyo, v. 8, p.13-15, 1967.
- MENDONÇA, L. L. R. et al. Management of *Meloigogyne javanica* with biological pesticides and oils in a lettuce field. **Nematoda**, Campos dos Goytacazes, v.3. 2016.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em: 20 jan. 2017.
- NAO, M. Effects of inoculum density, leaf wetness duration and nitrate concentration on the occurrence of lettuce leaf spot. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 74, p. 208–212. 2008.
- NAVARRO, J. A. et al. Genetic variability in the coat protein genes of *Lettuce big vein associated virus* and *Mirafiori lettuce big-vein virus*. **Archives of Virology**, New York, v. 150, p. 681-694. 2005.
- NAVARRO, J. A. et al. Comparative infection progress analysis of *Lettuce big-vein virus* and *Mirafiori lettuce virus* in lettuce crops by developed molecular diagnosis techniques. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 5, p. 470-477. 2004.
- NONDILLO, A. et al. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações anuais de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: *Thripidae*) em Morangueiro. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 6, p. 646-650. 2008.
- NUNES, R. C. et al. Levantamento de raças do agente causador do Míldio da alface no estado de São Paulo em 2012 e 2013. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 1, p. 53-58. 2016.
- O'BRIEN, R.; DAVIS, R.; WRIGHT, D. **The cause and control of two new lettuce diseases**. Queensland: Queensland Department of Primary Industries. 1997. 71 p.

OLIVEIRA, M. L. **Caracterização biológica e molecular do Lettuce mottle virus (LeMoV) em alface e sequenciamento de nova geração de vírus em Jasmim estrelado.** 2016. 95p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

ORNSTEIN, L. **Background and Theory.** New York: Annals of the New York Academy of Sciences, 1964. v.121, p.321-349.

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

PATTERSON, C. L.; GROGAN, R. G.; CAMPBELL, R. N. Economically important diseases of lettuce. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, p. 982-987. 1986.

PAVAN, M. A. et al. Virus diseases of lettuce in Brazil. **Plant Viruses**, London, v. 2, n. 1, p. 35-41. 2008.

PAVAN, M. A.; KUROZAWA, C. Doenças da alface. In: KIMTI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**, vol.2, São Paulo: Editora Ceres. 1997. p. 27-33.

PERNEZNY, K. et al. Investigation of seed treatments for management of bacterial leaf spot of lettuce. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 151-155. 2001.

PETRZELOVA, I.; LEBEDA, A.; KOSMAN, E. Distribution, disease level and virulence variation of *Bremia lactucae* on *Lactuca* in the Czech Republic in the period 1999-2011. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 161. p. 503-514. 2013.

POZZA, E. A. et al. Frequencia da ocorrência de doenças de plantas na região de Lavras - MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 1002-1006, out/dez., 1999.

ROBINSON, P. E. The Epidemiology of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, causal organism of bacterial leaf spot of lettuce. 2003. 46p. Degree of master (The degree of Master of Science). University of Florida. Florida. United States of America. 2003.

ROGERRO, P. et al. Occurrence of *Mirafiori lettuce virus* and *Lettuce big-vein virus* in relation to development of big-vein symptoms in lettuce crops. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 261-267, 2003.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas.** 2 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2005. 417p.

ROSALES, M.; SEPULVEDA, P.; BRUNA, A. First Report of *Lettuce big vein virus* and *Mirafiori lettuce virus* in Chile. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1286. 2004.

RYDER, E. J.; WHITAKER, T. N. Lettuce. In: SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants.** New York: Longman Group, 1976. p. 39-41.

SAHIN, F. et al. Diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* from lettuce. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 1, p. 64-70. 2003.

SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospective and trends of Brazilian lettuce crop. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 187-194. 2012.

- SALVADORI, J. R.; PEREIRA, P. R. **Trigo: Pulgões**. Embrapa, 2008. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia35/AG01/arvore/AG01_90_259200616453.html>. Acesso em: 15 jan. 2017.
- SANCHES, M. M. et al. Frequência de *Lettuce big vein associated virus* e *Mirafiori lettuce big vein virus* em plantas de alface no estado de São Paulo e transmissão através de extrato vegetal e solo. **Summa Phytopathological**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 378-382. 2007.
- SCHAAD, N. W., JONES, J. B., CHUN, W. **Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2001. 373p.
- SCHUMANN, G. L.; D'ARCY, C. J. **Essential Plant Pathology**. 2nd ed. Saint Paul: American Phytopathological Society Press. 369p. 2010.
- SCOTT, J. C.; GORDON, T. R. Effect of temperature on severity of Fusarium Wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 1, p. 13-17. 2010.
- SHRESTHA, A. et al. Effects of thrips density, mode of inoculation, and plant age on Tomato Spotted Wilt Virus transmission in peanut plants. **Environmental Entomology**, College Park, v. 44, n. 1, p. 136-143. 2015.
- SILVA JÚNIOR, T. A. F. et al. Gama de hospedeiros e reação de genótipos de tomateiro a *Pseudomonas cichorii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 35, n. 2, p. 127-131, 2009.
- SILVA, A. M. F. et al. Levantamento da intensidade da podridão-mole em alface e couve-chinesa em Pernambuco. **Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 2, p. 84-93. 2007.
- SILVA, M. S. C.; LIMA NETO, V. C. Lettuce diseases in hydroponic cultivation in the metropolitan green belt of Curitiba, Parana State, Brazil. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 3, p. 275-283. 2007.
- SNOWDON, A. L. **A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables: vegetables**. 2nd ed. London: Manson Publishing. 2010. 416p.
- SOARES, M. G. O. et al. Ocorrência de patógenos em cultivos de melancia e abóbora no sertão da Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, PB, v. 11, n. 1, p. 7-13. 2016.
- SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Alface americana: crocância verde conquista mercado**. SNA News, 2015. Disponível em: <<http://sna.agr.br/crocancia-verde-conquista-mercado/>>. Acesso em: 25 jan. 2017.
- SOLEIMANI, P. et al. Occurrence and distribution of lettuce mosaic disease in Tehran province from Iran. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, Gent, v. 64, n. 4, p. 513-517. 2004.
- SU, H. et al. Sporulation of *Bremia lactucae* affected by temperature, relative humidity, and wind in controlled conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, p. 396-401. 2004.
- SUGHA, S. K.; KUMAR, S. Factors affecting the development of Septoria leaf spot of tomato. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 53, p. 178-180. 2000.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 778p.
- TALAMINI, V. et al. Dez anos de clínica fitossanitária da UFLA: frequência da ocorrência de patógenos, sintomas e principais hospedeiros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 70-75. 2003.
- TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biología, indentificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz**. Raleigh: North Carolina State Universit, 1983. 109p.
- TEBALDI, N. D.; MARTINS, O. M.; MOTA, L. C. B. M. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* em alface, em Minas Gerais. **Summa Phytopathological**, Botucatu, v. 41, n. 4, p. 321, 2015.
- TOUSSAINT, V. et al. Development of bacterial leaf spot of lettuce (BLSL) and dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in relation to weather conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 89. 2001.
- UMESH, K. C.; KOIKE, S. T.; GILBERTSON, R. L. Association of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* with lettuce seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v.3, p. 86. 1996.
- UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **National Nutrient Database for Standard Reference**. USDA Database, 2014. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3053>>. Acesso em 10 dez. 2016.
- VAN BRUGGEN, A. H. C.; SCHERM, H. Downy mildew. In: DAVIS, R. M.; SUBBARAO, K. V.; KURTS, E. A. **Compendium of lettuce diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 1997. p. 17-19.
- VERKLEY, G. J. M. et al. A new approach to species delimitation in *Septoria*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 75, p. 213-305. 2013.
- VIEIRA, B. S.; BARRETO, R. W. First record of *Bremia lactucae* infecting *Sonchus oleraceus* and *Sonchus asper* in Brazil and its infectivity to lettuce. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 154, n. 2, p. 84-87, 2006.
- WEBSTER, C. G. et al. First report of *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) in tomato, pepper and jimsonweed in Puerto Rico. **Plant Health Progress**, Saint Paul, v. 10, p. 1094. 2013.
- WEBSTER, C. G. et al. First report of *Groundnut ringspot virus* infecting tomato in south Florida. **Plant Health Progress**, Saint Paul, v. 10, p.1094. 2010.
- WHITFIELD, A. E.; ULLMAN, D. E.; GERMAN, T. L. *Tospovirus* thrips interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 459-489. 2005.
- WU, B. M. et al. Incorporation of temperature and solar radiation thresholds to modify a lettuce downy mildew warning system. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 631-636. 2002.
- YURI, J. E. et al. **Alface americana**: cultivo comercial. Lavras: Editora UFLA, 2002. 51p. Texto acadêmico.

ZOINA, A.; VOLPE, E. Epidemiological aspects of bacterial leaf spot induced by *Xanthomonas campestris* pv. *vitiens*. In: LEMATTRE, M.; FREIGOUN, S.; RUDOLPH, K.; SWINGS, J. G. **Plant Pathogenic Bacteria**. Versailles: INRA Colloquia, 1992. p. 797-802.