

JOSÉ MARCELO NOGUEIRA MAZIERO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE MOLHAMENTO
FOLIAR NOS COMPONENTES EPIDEMIOLÓGICOS DE
Phytophthora infestans E VALIDAÇÃO DO
SIMULADOR BLIGHT NO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001**

JOSÉ MARCELO NOGUEIRA MAZIERO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE MOLHAMENTO
FOLIAR NOS COMPONENTES EPIDEMIOLÓGICOS DE
Phytophthora infestans E VALIDAÇÃO DO
SIMULADOR BLIGHT NO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de março de 2001

Prof. Luiz A. Maffia
(Conselheiro)

Prof. Sérgio Zolnier
(Conselheiro)

Prof. Kiyoshi Matsuoka

Prof. Sérgio H. Brommonschenkel

Prof. Eduardo S. G. Mizubuti
(Orientador)

Aos meus tios Luiz e Neuza.

Aos meus pais Nilson e Terezinha.

Aos meus irmãos Jorge e Luciana.

Aos meus sobrinhos Guilherme, Thiago e Yasmim.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela capacidade de executar este trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro durante a execução deste trabalho.

Aos Professores Luiz A. Maffia e Sérgio Zolnier, pela amizade e pelas sugestões.

Ao Professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, pela amizade e orientação.

Aos amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JOSÉ MARCELO NOGUEIRA MAZIERO, filho de Nilson Maziero e Terezinha Nogueira Maziero, nasceu em 15 de janeiro de 1971, em Mirandópolis-SP.

Em maio de 1999, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras, em Lavras-MG.

Em abril do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia, pela Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 28 de março de 2001.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	
EFEITO DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE ESPORÂNGIOS DE <i>Phytophthora infestans</i> E DO BINÔMIO – TEMPERATURA E TEMPO DE MOLHAMENTO FOLIAR NA INTENSIDADE DA REQUEIMA.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1. Efeito da temperatura na germinação de esporângios de <i>Phytophthora infestans</i>	8
2.1.1. Isolados do patógeno	8
2.1.2. Produção de esporângios.....	8
2.1.3. Quantificação da germinação de esporângios	9
2.2. Efeito da combinação temperatura e tempo de molhamento foliar no número de lesões causadas por isolados das linhagens clonais US-1 e BR-1 de <i>Phytophthora infestans</i> em batata e tomate	10
2.2.1. Produção do inóculo	10
2.2.2. Inoculação	11
2.2.3. Avaliação.....	12
3. RESULTADOS.....	13

3.1. Efeito da temperatura na germinação dos esporângios.....	13
3.2. Efeito da temperatura e do tempo de molhamento foliar no número de lesões causadas por isolados das linhagens clonais US-1 e BR-1 em batata e tomate.....	15
4. DISCUSSÃO	19
CAPÍTULO 2	
EFEITO DA TEMPERATURA NOS COMPONENTES EPIDEMIOLÓGICOS DE ISOLADOS DAS LINHAGENS CLONAIIS US-1 E BR-1 DE <i>Phytophthora infestans</i>	22
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Isolados de <i>Phytophthora infestans</i> utilizados.....	25
2.2. Produção do inóculo	25
2.3. Efeito da temperatura no período de incubação, no período latente e na expansão de lesão	26
2.3.1. Período de incubação (PI).....	27
2.3.2. Período latente (PL).....	27
2.3.3. Crescimento de lesões (CL).....	28
2.3.4. Efeito da temperatura na esporulação	28
3. RESULTADOS.....	30
4. DISCUSSÃO	37
CAPÍTULO 3	
VALIDAÇÃO DO SIMULADOR BLIGHT NAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS DO BRASIL.....	41
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1. Instalação dos experimentos.....	44
2.2. Tratos culturais.....	44
2.3. Produção de inóculo	45
2.4. Inoculação	46
2.5. Tratamentos.....	46
2.6. Avaliação da intensidade da requeima	47
2.7. Simulação de epidemias	47
3. RESULTADOS.....	48
4. DISCUSSÃO	51

CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMO

MAZIERO, José Marcelo Nogueira, M.S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Influência da temperatura e do tempo de molhamento foliar nos componentes epidemiológicos de *Phytophthora infestans* e validação do simulador Blight no Brasil**. Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Conselheiros: Luiz Antonio Maffia e Sérgio Zolnier.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura e do tempo de molhamento foliar nos componentes epidemiológicos de isolados das linhagens clonais US-1 e BR-1 de isolados de *Phytophthora infestans* existentes no Brasil e a validação do simulador de epidemias de requeima Blight nas condições ambientais do País. Os componentes epidemiológicos avaliados neste estudo foram o período de incubação, o período latente, o crescimento das lesões, a esporulação e a germinação dos esporângios do patógeno. Estudou-se o efeito da temperatura na germinação dos esporângios, no período de incubação, no período latente, no crescimento das lesões e na esporulação do patógeno. As linhagens clonais US-1 e BR-1 foram afetadas de maneira diferenciada pelas variações de temperatura. Os isolados de US-1 e BR-1 apresentaram maior percentual de germinação indireta em temperaturas inferiores a 15°C. O maior percentual de germinação direta foi a 22°C, em ambas as linhagens. Os menores valores de período de incubação e de período latente ocorreram a 22°C em ambas

as linhagens. A essa temperatura, o período de incubação para US-1 foi de 66,7 h e, para BR-1, de 44,0 h, enquanto o período latente foi de 93,3 h para US-1 e de 68,0 h para BR-1. O crescimento das lesões também foi influenciado pela variação de temperatura entre 10 e 27°C, em ambas as linhagens clonais. Na avaliação da esporulação, em plantas de batata e tomate observou-se maior esporulação a 22°C. Na quantificação dos efeitos do binômio temperatura – tempo de molhamento foliar, a linhagem clonal BR-1 apresentou maior número de lesões no hospedeiro a 10°C com 24 horas de molhamento foliar, e a US-1, a 15°C, com o mesmo tempo de molhamento foliar. Na validação do simulador Blight, realizaram-se dois ensaios de campo, um no inverno e outro no período de primavera-verão, com a cultura da batata. Quantificou-se o progresso da doença nessas duas épocas, e com os dados climáticos coletados foram realizadas simulações. Houve boa correlação entre a epidemia observada no campo no período do inverno e a simulada. No segundo ensaio, o simulador subestimou a intensidade da doença. Para ser usado no Brasil, o simulador Blight necessitará de ajuste nas equações matemáticas que o compõem.

ABSTRACT

MAZIERO, José Marcelo Nogueira, Universidade Federal de Viçosa, March, 2001. **Influence of temperature and leaf wetness period on the epidemiological components of *Phytophthora infestans* and validation of Blight simulator in Brazil.** Advisor: Eduardo Seite Gomide Mizubuti. Committee members: Luiz Antonio Maffia and Sérgio Zolnier.

This study aimed at evaluating temperature and leaf-wetness period effect on the epidemiological components of clonal lines of *Phytophthora infestans* isolates US-1 and BR-1 present in Brazil and to validate the simulator of the late blight epidemic Blight under Brazilian environmental conditions. The isolates were affected differently by the temperature variation although maximum indirect and direct sporangial germination of both the isolates occurred at temperatures below 15°C and at 22°C, respectively. Both the isolates had the least incubation and latent period at 22°C, which was, respectively, 66.7 h and 93.3 h for US-1 and 44.0 h and 68.0 h for BR-1. In both the clonal lines, the lesion growth was also affected by the temperature variation between 10 to 27°C. The maximum sporulation on potato and tomato plants occurred at 22°C. Quantification of the combined effect of temperature and leaf-wetness period showed that the largest lesion, in 24 h, on the host was produced at 10°C by the BR-1 and at 15°C and by the US-1 lines with 24 h leaf-wetness period. The

Blight simulator was validated on the winter and spring-summer season potato crop . Simulations were done by quantifying the disease progress and using the climatic data of the crop period. While there was a good correlation between the observed epidemic and the simulation in the winter planting, the simulator underestimated the disease intensity in the spring-summer season. Therefore, the Blight simulator may require adjustments in the component mathematical equations for use in Brazil.

INTRODUÇÃO

Das culturas olerícolas produzidas no Brasil, a batata e o tomate apresentam significativa importância na produção nacional. A cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) ocupa uma área plantada de 133.725 ha, com produção anual de 2,2 milhões de toneladas. A cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ocupa uma área de 46.350 ha, e a produção anual é de 2,7 milhões de toneladas (IBGE, 2000). Essas culturas são afetadas por vários patógenos, e o mais destrutivo é *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, agente causal da requeima ou mela (FRY e GOODWIN, 1997; FRY e GOODWIN, 1997a). Como o patógeno pode ocasionar perdas totais de produção, um intenso programa de aplicação de fungicidas é utilizado na tentativa de controlá-lo.

Phytophthora infestans pertence ao reino Stramenopila ou Cromista e à classe Oomycetes (ERWIN e RIBEIRO, 1996). O patógeno é uma espécie heterotática, e para que a reprodução sexuada ocorra, é necessário o contato de isolados dos grupos de compatibilidade A1 e A2. Até há bem pouco tempo, somente no Vale do Toluca, no México, era possível encontrar isolados dos dois grupos de compatibilidade em condições de campo. Nos demais locais, as populações de *P. infestans* eram constituídas por isolados do grupo A1 (GOODWIN et al., 1994). Por muitos anos, a reprodução de *P. infestans* se deu apenas de modo assexuado, o que implicou a formação e o desenvolvimento de

uma linhagem clonal, isto é, uma população originada de modo assexuado, de um ou poucos genótipos (ANDERSON e KOHN, 1995). A linhagem clonal predominante, constituída por isolados pertencentes ao grupo de compatibilidade A1, foi denominada US-1 (GOODWIN et al, 1994).

A migração de novos genótipos de *P. infestans*, pertencentes aos grupos A1 e a A2, ocorreu na década de 70, com a importação de tubérculos de batata do México (SPIELMAN et al., 1991; Niederhauser, 1991; FRY et al. 1993). Assim, atualmente, isolados do grupo de compatibilidade A2 se encontram difundidos em vários países, por causa da migração do seu centro de origem para a Europa. Na década de 80, ocorreu nova migração de isolados do grupo A2, desta vez da Europa para várias partes do mundo, inclusive para o Brasil, via comércio de tubérculos-semente de batata.

Com a ocorrência, concomitante, no mesmo local de isolados A1 e A2, há possibilidade de reprodução sexuada. Esse fato teria consequências diretas na epidemiologia da doença, pois o oósporo resultante é estrutura de sobrevivência e pode se constituir em inóculo primário para epidemias de requeima, além de originar populações com maior variabilidade genética. Em populações com alta diversidade genética, é mais freqüente o surgimento de genótipos mais agressivos, resistentes a fungicidas, e até mesmo com capacidade de causar doença em condições de ambiente distintas daquelas consideradas favoráveis à requeima. Esses fatos levaram pesquisadores de vários países a analisarem os componentes epidemiológicos das populações locais do organismo. Em alguns países, como Estados Unidos e Canadá, ocorre número reduzido de linhagens clonais, com nítida predominância de algumas. Por essa razão, foi possível caracterizá-las individualmente e associar características epidemiológicas específicas que podem interferir diretamente no controle da requeima (MIZUBUTI e FRY, 1998).

Como as epidemias de doenças de plantas resultam da interação entre patógeno e hospedeiro, sob a influência do ambiente, o manejo da doença deve ser baseado na modificação de cada um desses fatores ou em suas interações (ZADOKS e SCHEIN, 1979). Quanto à requeima, no que concerne aos aspectos do

hospedeiro pouco há que se fazer, dada a não-disponibilidade de variedades resistentes. No entanto, alguns aspectos do patógeno e de ambiente podem ser modificados de modo a minimizar a intensidade da doença. As epidemias de requeima são altamente dependentes dos fatores abióticos (HARRISON, 1992). A interferência desses fatores é marcante em várias etapas do ciclo de vida de *P. infestans*, como na germinação de esporângios, na esporulação, na dispersão e na sobrevivência. O conhecimento desses fatores é primordial para estabelecimento de táticas de controle eficientes.

No Brasil, pouco se conhece acerca dos componentes epidemiológicos das linhagens clonais de *P. infestans* existentes. A linhagem US-1 está associada a epidemias de requeima em tomate, e a linhagem BR-1, a epidemias em batata (BROMMONSCHENKEL, 1988; GOODWIN et al., 1994; REIS et al., 2000). No entanto, não há informações detalhadas quanto aos efeitos de variáveis climáticas sobre os componentes epidemiológicos nessas linhagens, principalmente acerca dos efeitos da temperatura, da umidade relativa e do tempo de molhamento foliar. Esses estudos são necessários para gerar informações confiáveis sobre a ecologia do patógeno e epidemiologia da requeima, que, futuramente, subsidiarão estratégias de manejo da doença nas condições brasileiras.

Modelos de simulação e sistemas de previsão da epidemia baseados em variáveis climáticas são recursos úteis para avaliação e, ou, estabelecimento de táticas de controle da doença. Os modelos que têm como base as condições climáticas estão sendo usados em vários países para aumentar a eficiência de controle de doenças em várias culturas (CAMPBELL e MADDEN, 1990; SHTIENBERG, 2000).

Os objetivos deste trabalho foram: quantificar o efeito da temperatura na germinação de esporângios de *P. infestans* e do binômio temperatura - tempo de molhamento foliar no número de lesões; quantificar o efeito da temperatura no período de incubação, no período latente, na expansão das lesões e na esporulação de isolados das linhagens clonais US-1 e BR-1; e validar o simulador de requeima Blight nas condições ambientais do Brasil.

CAPÍTULO 1

EFEITO DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE ESPORÂNGIOS DE *Phytophthora infestans* E DO BINÔMIO – TEMPERATURA E TEMPO DE MOLHAMENTO FOLIAR NA INTENSIDADE DA REQUEIMA

1. INTRODUÇÃO

Depois de mais de cento e cinquenta anos da devastação nas lavouras de batata na Europa, a requeima, causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, continua reduzindo a produção de batata e tomate em todo o mundo (FRY e GOODWIN, 1997). No Brasil, ela é considerada a principal doença na cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) e do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), nos quais causa perdas expressivas, e o seu controle implica o aumento do custo de produção.

Epidemias de requeima estão associadas com umidade relativa do ar elevada e temperaturas moderadas (HIRST e STEDMAN, 1960; HARRISON, 1992; ERWIN e RIBEIRO, 1996; FRY e MIZUBUTI, 1998). No campo, sob condições favoráveis, mesmo que a severidade inicial da doença seja baixa, pode

haver destruição total da parte aérea das plantas em poucos dias, devido ao rápido progresso da doença. No intuito de controlar a doença, fungicidas protetores e sistêmicos são aplicados freqüentemente. No entanto, o controle da doença tem se tornado menos eficiente (KATO et al., 1997; JOHNSON et al., 1997) e maior quantidade de fungicida tem sido usada para assegurar a produção. Esse fato pode estar relacionado com mudanças na população do patógeno (FRY et al., 1993; FRY e GOODWIN, 1997) e com a dispersão e predominância de isolados mais agressivos e resistentes ao fungicida metalaxyl (FRY e GOODWIN, 1997a).

Duas populações de *P. infestans* ocorrem no Brasil, uma associada ao tomate – US-1 e outra associada à batata – BR-1. Essas populações têm grande especificidade por hospedeiro e, por causa da estrutura clonal, são denominadas linhagens clonais (REIS et al., 2000). A linhagem US-1 é mais “antiga” e, aparentemente, antes de meados da década de 70, encontrava-se dispersa por todas as regiões do mundo, causando requeima em batata e em tomate (GOODWIN et al., 1994). A linhagem BR-1, mais “nova”, causa requeima em batata e foi introduzida mais recentemente no Brasil, possivelmente como resultado de migrações de isolados de *P. infestans* do seu centro de origem/diversidade (Vale do Toluca, região central do México) para a Europa (SPIELMAN et al., 1991) e deste continente, via batata-semente, para o Brasil. Em outros países, onde há predominância de novas linhagens clonais de *P. infestans*, estas possuem características epidemiológicas distintas, quanto à influência de fatores climáticos, principalmente temperatura, daquelas conhecidas para os isolados de US-1 (MIZUBUTI e FRY, 1998). Como as epidemias de requeima são altamente influenciadas por fatores climáticos (HARRISON, 1992), a quantificação do efeito desses fatores pode resultar em informações aplicáveis ao manejo da doença.

A temperatura influencia diversos eventos no ciclo de vida de *P. infestans*. Do ponto de vista epidemiológico, os efeitos da temperatura de maior interesse seriam na esporulação do patógeno (SUJKOWSKI, 1987), na infecção e expansão das lesões (HARTILL et al., 1990), na sobrevivência de

propágulos (MINOGUE e FRY, 1981) e na germinação de esporângios (MIZUBUTI e FRY, 1998). Os esporângios de *P. infestans* podem germinar de modo direto ou indireto, dependendo da temperatura (CROSIER, 1934). A germinação direta consiste na formação do tubo germinativo e é favorecida por temperaturas acima de 20°C (CROSIER, 1934; SATO, 1994b). A germinação indireta é caracterizada pela formação e liberação de zoósporos e ocorre em temperaturas iguais ou menores que 12°C (CROSIER, 1934; SATO, 1994a). Os efeitos da temperatura na germinação de esporângios tem implicações diretas no manejo da requeima. Os principais sistemas de previsão de ocorrência da doença são baseados em fatores climáticos, que, em última análise, influenciam a germinação/infecção.

Outra variável climática importante no processo de infecção do patógeno é a umidade. A presença de água no estado líquido e o tempo de molhamento foliar são essenciais para que os esporângios germinem e para que se estabeleça a infecção (DE WEILLE, 1964; HARTILL et al., 1990; HARRISON, 1992). A umidade também pode influenciar a esporulação (HARRISON e LOWE, 1989; HARRISON, 1992) e sobrevivência do patógeno (MINOGUE e FRY, 1981). Conhecer o tempo mínimo de molhamento foliar e a temperatura ótima requeridos para que a infecção se estabeleça e os efeitos da temperatura na germinação direta ou indireta dos esporângios das linhagens clonais existentes no país é de extrema importância.

É possível que as linhagens clonais US-1 e BR-1 apresentem características diferentes quanto aos requerimentos de temperatura para germinação de seus esporângios. A determinação dessas possíveis diferenças é de fundamental importância para o controle mais racional da requeima. Os resultados obtidos com o estudo dos componentes epidemiológicos do patógeno poderão servir de suporte a sistemas de previsão da requeima nos campos de produção de batata e tomate do Brasil, além de constituírem informação importante para definição de metodologias em trabalhos de melhoramento, entre outros.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de quantificar o efeito da temperatura na germinação dos esporângios e o efeito da temperatura e do tempo de molhamento foliar no número de lesões de *P. infestans*, em folíolos de batata e tomate.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Efeito da temperatura na germinação de esporângios de *Phytophthora infestans*

2.1.1. Isolados do patógeno

Os isolados utilizados nos experimentos foram selecionados da coleção de *P. infestans* do Laboratório de Epidemiologia – Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Como critério de seleção foi utilizada a representatividade geográfica das principais regiões produtoras de tomate e batata do Brasil (Quadro 1).

2.1.2. Produção de esporângios

Os isolados foram cultivados em meio de cultura centeio-ágar-B (CAB) (CATEN e JINKS, 1968), mantidos a 18°C, com fotoperíodo de 16 horas. Após 14 dias, foram adicionados 10 ml de água destilada esterilizada (ADE) a cada placa, e os esporângios foram removidos com auxílio de um pincel de cerdas finas. Foram obtidas suspensões, cujas concentrações foram ajustadas para

Quadro 1 - Características dos isolados de duas linhagens clonais de *Phytophthora infestans* utilizados nos experimentos

Isolados	Linhagem Clonal	Hospedeiro	Grupo de Compatibilidade	Estado de Coleta	Sensibilidade ao metalaxyl
Pib- 4	BR-1	Batata	A2	SC	Intermediário
Pib- 193	BR-1	Batata	A2	MG	Resistente
Pib-198	BR-1	Batata	A2	MG	Resistente
Pib- 214	US-1	Tomate	A1	SC	Sensível
Pib- 239	US-1	Tomate	A1	MG	Sensível
Pib-256	US-1	Tomate	A1	SP	Sensível

10^4 esporângios/ml, com auxílio de hemacitômetro. Folíolos de batata da cultivar Bintje ou de tomate da cultivar Kada, coletados de plantas cultivadas em casa de vegetação, com idade entre cinco e seis semanas, foram levados para o laboratório e colocados em caixa tipo gerbox com papel-filtro esterilizado e umedecido com ADE, para criar condição de câmara úmida. Foram utilizados quatro gerbox para cada isolado de BR-1 ou de US-1.

Próximo à parte central de cada folíolo, foi depositada uma gota de 20 µl da suspensão de esporângios. Após a inoculação, os gerbox contendo os folíolos inoculados foram levados para uma incubadora a 18°C, sob luz difusa e contínua, onde permaneceram por até 10 dias.

2.1.3. Quantificação da germinação de esporângios

Após os 10 dias de incubação, foram selecionados os folíolos que apresentavam lesão com esporulação abundante. Com um pedaço de papel-filtro

(1 x 1 cm), umedecido em ADE, foram tocadas as lesões por dois segundos e, em seguida, tocou-se a superfície do meio ágar-água (1,5%) contido nas placas de Petri, para transferir os esporângios. Após a transferência, as placas foram levadas para incubadoras a 10, 15, 22 ou 27°C, na ausência de luz. Após 12 horas, selecionou-se uma área de 4 cm² na superfície do meio de cultura que continha esporângios. Uma porção de meio compreendida nessa área foi cortada com auxílio de um escalpelo, e a fatia, transferida para uma lâmina de vidro. Sobre a fatia foi depositada uma gota de lactofenol e, sobre esta, uma lamínula para observação microscópica (100x). Avaliaram-se as germinações direta e indireta de, no mínimo, 300 esporângios por lâmina.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (temperatura x linhagens clonais), com cinco repetições para cada isolado e temperatura. Cada placa de Petri contendo esporângios constituiu uma repetição. O experimento foi realizado duas vezes, e utilizou-se estatística descritiva para análise dos dados.

2.2. Efeito da combinação temperatura e tempo de molhamento foliar no número de lesões causadas por isolados das linhagens clonais US-1 e BR-1 de *Phytophthora infestans* em batata e tomate

2.2.1. Produção do inóculo

Foram utilizados os isolados Pib – 214 e Pib – 256 (linhagem clonal US-1) e os isolados Pib – 4 e Pib – 198 (linhagem BR-1). Suspensões de esporângios provenientes de culturas puras desses isolados foram obtidas e aplicadas em folíolos destacados de batata ou tomate, conforme metodologia descrita em 2.1.2.

Plantas de batata foram inoculadas com os isolados da linhagem clonal BR-1, e as plantas de tomate, com os isolados da linhagem clonal US-1. Para isso, em cada planta atomizou-se suspensão de inóculo ajustada para 3×10^4 esporângios/ml, por atomização, com auxílio de um pulverizador manual

da marca HOME® (Home Hardware Stores Limited, St. Jacobs, Ontario, Canadá). Em seguida, essas plantas foram envoltas com sacos de polietileno umedecidos com água destilada e deixadas em local sombreado por 24 horas. Após esse período, os sacos de polietileno foram retirados e durante sete dias, em intervalos de oito horas, atomizou-se água destilada nas plantas, para evitar ressecamento das lesões.

Sete dias após a inoculação, as plantas foram novamente envoltas pelos sacos de polietileno umedecidos, a fim de estimular a esporulação do patógeno. Após 24 horas, os sacos plásticos foram retirados, os folíolos que apresentavam lesões esporulantes foram coletados, os esporângios das lesões foram retirados com auxílio de um estilete e prepararam-se suspensões na concentração de 10^3 esporângios/ml para cada isolado.

2.2.2. Inoculação

Foram utilizadas plantas de batata e de tomate com, em média, 40 folíolos e com idade de 40 dias após a emergência ou semeadura. As plantas foram inoculadas com a atomização da suspensão de inóculo preparada em 2.2.1., com o auxílio de um atomizador manual da marca HOME®. Após a inoculação, as plantas foram envoltas por saco de polietileno (MALTESE EVOLA et al., 1995; PEDERSEN e MORRALL, 1994; HARTILL et al., 1990) e levadas para câmaras de crescimento mantidas a 10, 15, 22 ou 27°C, com fotoperíodo de 14 horas. Transcorridas 6, 12, 18 ou 24 horas de molhamento foliar, retiraram-se os sacos de polietileno, as plantas receberam um jato de ar, com auxílio de um ventilador, para interromper o molhamento foliar, e foram mantidas em suas respectivas câmaras de crescimento.

2.2.3. Avaliação

Após quatro dias, contou-se o número de lesões em 40 folíolos de cada vaso, em cada combinação temperatura – tempo de molhamento. Na câmara de crescimento a 10°C, a contagem das lesões ocorreu aos oito dias após a inoculação.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por isolado em cada tempo de molhamento foliar e temperatura, em que cada planta consistia de uma repetição. O ensaio foi realizado duas vezes.

Como uma estatística para integração dos efeitos da temperatura e do tempo de molhamento foliar sobre o número de lesões, foi calculado o volume abaixo da superfície de resposta (VASR) para os isolados de US-1 e de BR-1.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito da temperatura na germinação dos esporângios

A temperatura influenciou de maneira desigual a germinação dos esporângios dos isolados das linhagens clonais US-1 e BR-1. Ambas as linhagens apresentaram maior percentual de germinação indireta a 10°C (Figura 1). Com o aumento da temperatura, ocorreu decréscimo da germinação indireta de esporângios dos isolados das duas linhagens clonais. Maior percentual de germinação indireta foi observado para a linhagem BR-1. A 22°C, houve germinação indireta dos isolados da linhagem clonal BR-1, mas o mesmo não ocorreu para os isolados de US-1. Não se constatou germinação indireta de esporângios de isolados de ambas as linhagens clonais a 27°C (Figura 1).

Observou-se maior germinação direta dos esporângios para ambas as linhagens clonais, a 22°C (Figura 2). Esporângios de isolados de ambas as linhagens não germinaram diretamente a 10°C. A 15°C, na linhagem US-1 ocorreu maior percentual de germinação direta. Por outro lado, a 27°C, verificou-se maior germinação direta de isolados de US-1. Em geral, os isolados da linhagem clonal US-1 apresentaram maior percentual de germinação direta que os isolados de BR-1 (Figura 2).

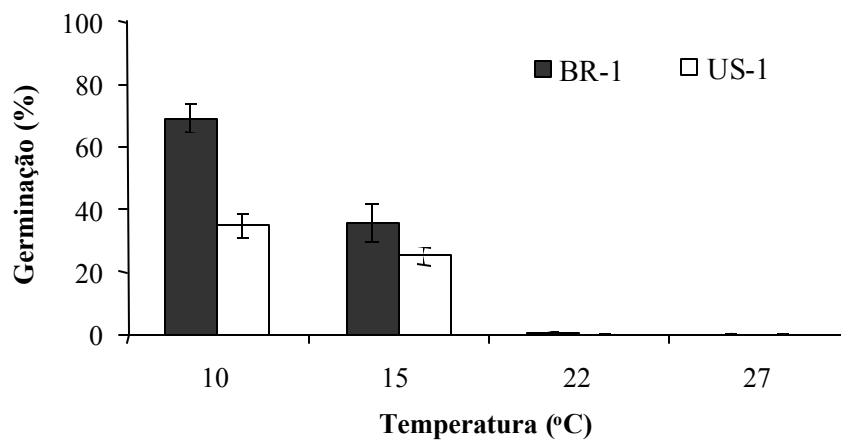


Figura 1 - Germinação indireta de esporângios de isolados de *Phytophthora infestans* pertencentes às linhagens clonais BR-1 e US-1, em função da temperatura. Média de dois ensaios. As barras verticais indicam o erro-padrão das médias.

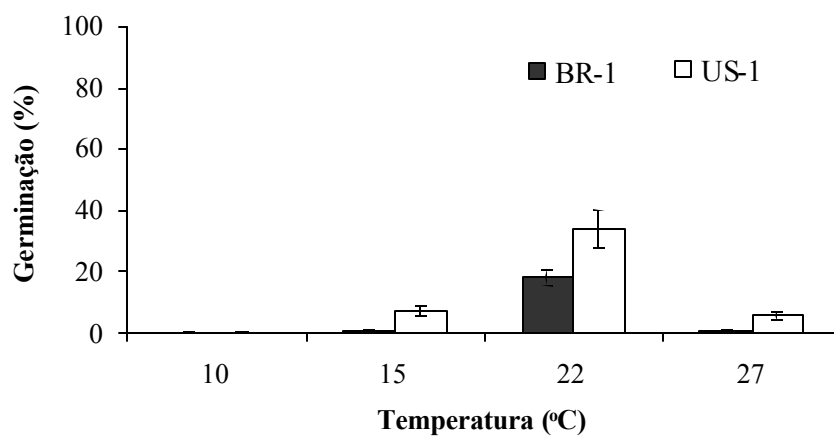


Figura 2 - Germinação direta de esporângios de isolados de *Phytophthora infestans* pertencentes às linhagens clonais BR-1 e US-1, em função da temperatura. Média de dois ensaios. As barras verticais indicam o erro-padrão das médias.

3.2. Efeito da temperatura e do tempo de molhamento foliar no número de lesões causadas por isolados das linhagens clonais US-1 e BR-1 em batata e tomate

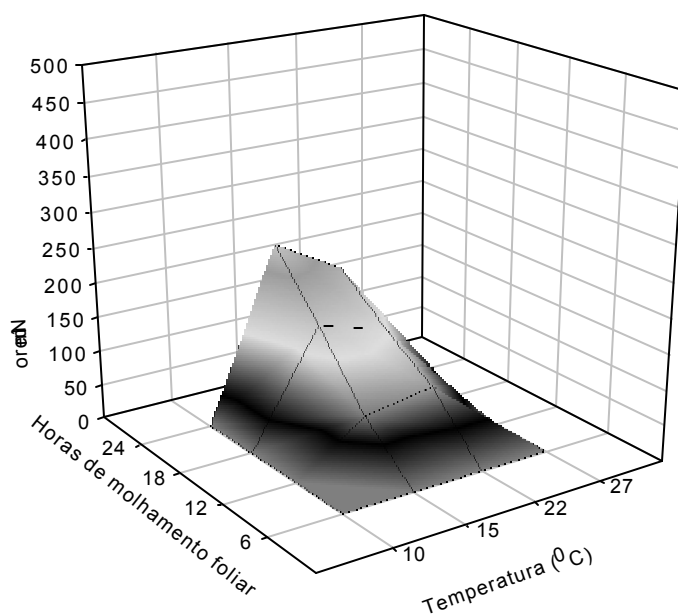
A temperatura e o tempo de molhamento foliar influenciaram diferencialmente o número de lesões causadas por isolados de US-1 e BR-1 nos respectivos hospedeiros.

Para a linhagem US-1, não se observaram lesões em plantas de tomate, em toda a faixa de temperatura, com seis horas de molhamento foliar (Figura 3). Analogamente, não houve desenvolvimento de lesões a 10°C mesmo com 24 horas de molhamento foliar. No entanto, a 15 ou a 22°C, ocorreu aumento do número de lesões com o aumento do tempo de molhamento foliar. Maior número de lesões foi observado a 15°C e 24 horas de molhamento foliar (Figura 3). A 27°C, observou-se menor número de lesões, as quais somente ocorreram em plantas em que o tempo de molhamento foliar foi de 24 horas.

Para os isolados da linhagem clonal BR-1, maior número de lesões foi observado a 10 e 15°C, após 12 horas de molhamento foliar (Figura 4). O número máximo de lesões, na temperatura ótima de 10°C, ocorreu com 24 horas de molhamento foliar. A 22°C, o número de lesões diminuiu, sendo o seu maior número verificado em plantas submetidas a 24 horas de molhamento foliar. A 27°C, não se detectaram lesões em plantas de batata, mesmo com 24 horas de molhamento foliar (Figura 4).

Na avaliação do volume abaixo da superfície de resposta, a linhagem clonal BR-1 apresentou maior volume total, em relação à linhagem clonal US-1, nos dois ensaios realizados (Quadro 2).

A



B

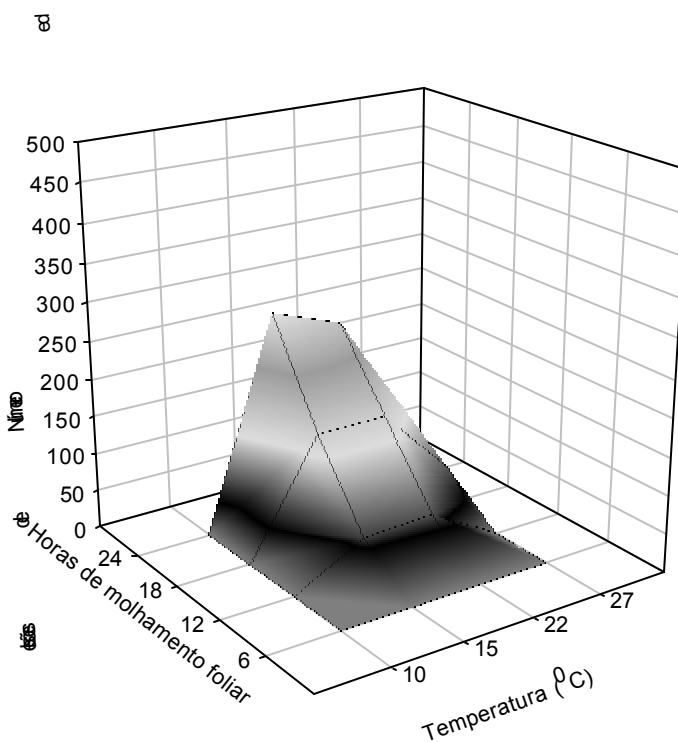


Figura 3 - Efeito da temperatura e da duração do molhamento foliar no número de lesões causadas por isolados da linhagem clonal US-1, de *Phytophthora infestans*, quando inoculados em folíolos de tomate. A - ensaio 1; B - ensaio 2.

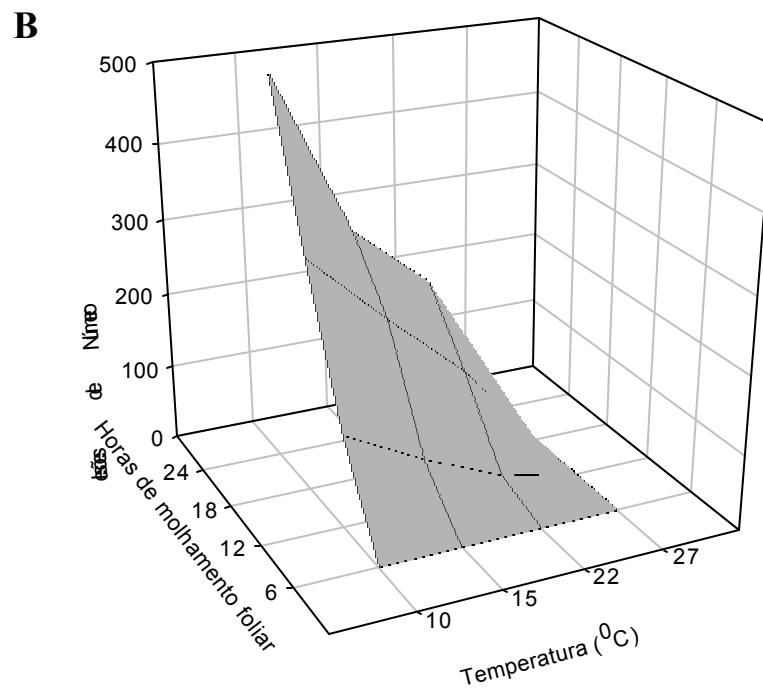
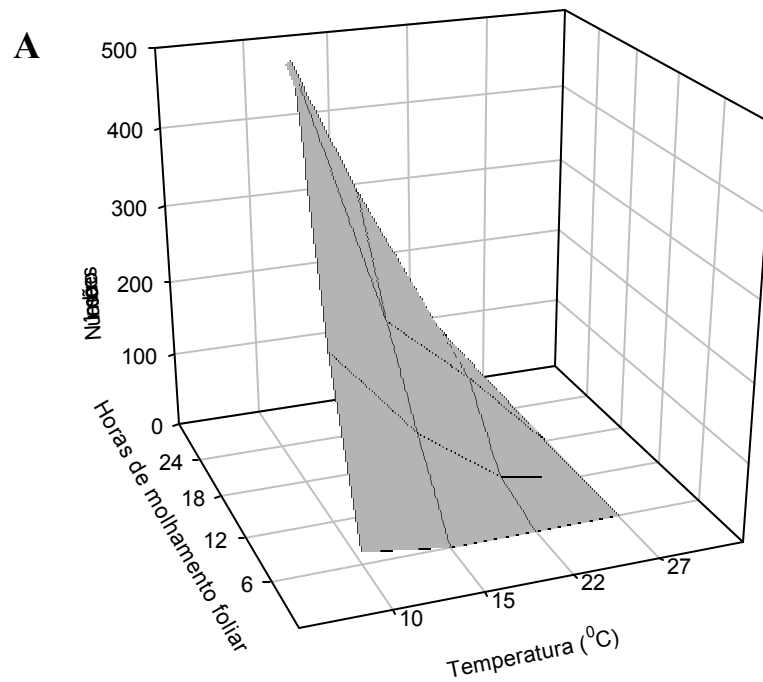


Figura 4 - Efeito da temperatura e da duração do molhamento foliar no número de lesões causadas por isolados da linhagem clonal BR-1, de *Phytophthora infestans*, quando inoculados em folíolos de batata. A - ensaio 1; B - ensaio 2.

Quadro 2 - Volume abaixo da superfície de resposta do número de lesões (lesão.h.°C) para isolados das linhagens clonais de *Phytophthora infestans* (US-1 e BR-1)

Linhagem clonal	Ensaio 1	Ensaio 2
US-1	24.446 ^a	25.059
BR-1	38.665	34.107

^aMédias dos volumes de cada linhagem clonal, originadas das médias dos isolados.

4. DISCUSSÃO

A temperatura interferiu de modo diferenciado na germinação dos esporângios de isolados das linhagens clonais US-1 e BR-1 de *P. infestans* existentes no Brasil. Essa diferença também foi observada entre os três isolados que representavam cada linhagem clonal, porém esses isolados apresentam tendências e características distintas para cada linhagem clonal. Na linhagem clonal US-1, a germinação indireta foi maior a 10°C e praticamente nula a 22 e 27°C, resultados semelhantes aos observados por CROSIER (1934). Por se tratar da linhagem US-1, esperava-se não haver grandes discrepâncias com os resultados de outros autores que trabalharam com isolados do grupo de compatibilidade A1, desta linhagem clonal. Para os isolados da linhagem clonal BR-1, do grupo de compatibilidade A2, a germinação indireta foi maior em temperaturas mais baixas e praticamente nula em temperaturas acima de 20°C - esta praticamente não ocorreu. Esses resultados foram observados por MIZUBUTI e FRY (1998) para as linhagens clonais US-7 e US-8 (grupo A2), existentes no Estados Unidos.

Isolados das duas linhagens clonais apresentaram maior percentual de germinação direta a 22°C. A 27°C, praticamente não houve germinação, direta ou indireta, de esporângios de isolados de BR-1. A 15°C, ocorreu baixa germinação direta para isolados de BR-1, mas alto percentual de germinação indireta. Essa

aparente “limitação” imposta pela faixa de temperatura mais estreita pode ser compensada pelo aumento do número de zoósporos, pela maior velocidade de germinação de esporângios e, ou, pela maior frequência de infecção. Esporângios de isolados das novas linhagens clonais de *P. infestans* (US-7 e US-8) germinaram mais rapidamente que isolados de US-1 a 15°C, temperatura considerada ótima para as três linhagens clonais (MIZUBUTI e FRY, 1998). As demais possibilidades levantadas ainda não foram testadas. Nada se sabe sobre o tempo mínimo requerido para a germinação dos esporângios das linhagens clonais existentes no País.

Ao analisar o efeito isolado da temperatura sobre a germinação de esporângios de BR-1, pode-se questionar sobre a ocorrência de epidemias de requeima em batata em clima tropical. As áreas de produção de batata no Brasil estão localizadas em regiões altas e de clima ameno, condições favoráveis à germinação de esporângios da linhagem BR-1. Em locais mais quentes, é possível haver germinação de esporângios de isolados de BR-1, desde que no período noturno haja condições favoráveis.

À semelhança do discutido para o efeito da temperatura, há dúvidas acerca do efeito de umidade relativa e molhamento foliar na germinação de propágulos. Seguramente, pode-se generalizar que condições de alta umidade favorecem a germinação de propágulos de *P. infestans* (DUNIWAY, 1983; MINOGUE e FRY, 1981; HARRISON, 1992) e que são necessárias, no mínimo, três horas de molhamento foliar para que haja germinação – infecção (ROTEM et al., 1978). Sob temperaturas favoráveis, 10°C para BR-1 e 15°C para US-1, foram observadas poucas lesões com o menor tempo de molhamento foliar investigado neste estudo: seis horas.

Ao se considerar o binômio temperatura – tempo de molhamento foliar, a temperatura parece ser o fator que exerce maior influência sobre o número de lesões. Para as duas linhagens foram necessárias, no mínimo, 12 horas de molhamento foliar para que houvesse grande número de lesões. No entanto, mesmo com 24 horas de molhamento foliar, a temperatura limitou o desenvolvimento de lesões de modo diferenciado. O não-desenvolvimento de

lesões de BR-1 a 27°C pode ser atribuído ao baixo percentual de germinação de esporângios; porém, a mesma argumentação não é válida para o não-desenvolvimento de lesões por isolados de US-1 a 10°C, pois houve germinação nesta temperatura. É possível que a 10°C o patógeno não se estabeleça nos tecidos do hospedeiro, ou, se estabelecer, a taxa de crescimento é lenta. Em geral, as temperaturas mais adequadas ao desenvolvimento de epidemias de requeima estão entre 16 e 23°C (HARRISON, 1992). Apesar de haver relatos controversos com relação ao ótimo das condições ambientais para o desenvolvimento de epidemias, é consenso que a doença não se desenvolve com taxas expressivas em temperaturas abaixo de 7°C (HYRE, 1954) ou acima de 28°C (ROTEM et al., 1971). Considerando-se apenas o efeito da temperatura sobre o número de lesões, os resultados obtidos para os isolados de US-1 são coerentes com os mencionados anteriormente. A linhagem US-1 apresentou maior número de lesões quando a temperatura foi de 15°C e o tempo de molhamento foliar foi de 24 horas. Supostamente, esse fato ocorreu devido à germinação indireta dos esporângios.

As linhagens clonais de *P. infestans* existentes no Brasil apresentam características epidemiológicas diferentes. Essa diferença pode interferir diretamente no manejo da requeima. Por exemplo, o uso de sistemas de previsão desenvolvidos com base nos efeitos da temperatura sobre a germinação de esporângios da linhagem US-1 pode não ser adequado para prever a ocorrência de requeima em batata. Esse fato também pode ocorrer devido à alta especificidade dos isolados das linhagens clonais existentes no País por seus hospedeiros. A linhagem clonal US-1 apresenta isolados associados à cultura do tomate, e a linhagem BR-1, à cultura da batata. Assim, a implementação direta e sem validação adequada desses sistemas pode comprometer o manejo da doença.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA TEMPERATURA NOS COMPONENTES EPIDEMIOLÓGICOS DE ISOLADOS DAS LINHAGENS CLONAIIS US-1 E BR-1 DE *Phytophthora infestans*

1. INTRODUÇÃO

A requeima, causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, é considerada a doença mais importante das culturas de batata e tomate. Sob condições climáticas favoráveis, alta umidade relativa (acima de 90%) ou chuva e temperaturas entre 15 e 21°C (HARRISON, 1992), as epidemias da doença podem ocasionar grandes perdas de produção. Como o patógeno está distribuído nas principais regiões produtoras de batata e tomate do Brasil e as cultivares mais plantadas são suscetíveis a *P. infestans*, as condições ambientais determinam a ocorrência da doença e sua intensidade.

Vários estádios do ciclo de vida de *P. infestans* são influenciados por variáveis climáticas, principalmente a temperatura e a umidade (HARRISON, 1992). Do ponto de vista epidemiológico, os efeitos da umidade seriam mais restritos às fases de germinação/infecção, esporulação e sobrevivência; já a

temperatura influencia os processos biológicos que ocorrem nas diferentes fases do ciclo de vida do patógeno.

No estágio da germinação, a temperatura determina o modo de germinação dos esporângios (MELHUS, 1915; CROSIER, 1934) e, por conseguinte, interfere na frequência de infecção (HARTILL et al., 1990). Uma vez no interior da planta, a colonização (HARTILL et al., 1990) dos tecidos e a multiplicação/esporulação do patógeno são afetadas pela temperatura (HARRISON, 1992; HARTILL et al., 1990). Os esporângios são formados em períodos com temperaturas entre 18 e 22°C e alta umidade relativa (90 a 100%) (HARRISON, 1992; HARTILL et al., 1990). Em temperaturas acima de 22°C, a produção de esporângios é reduzida a 28°C e não há esporulação (SUJKOWSKI, 1987). Maior quantidade de esporângios é dispersa em dias quentes (até 35°C) e secos (ROTEM e COHEN, 1974). O principal efeito da temperatura na fase de sobrevivência é na viabilidade tanto de esporângios (DE WEILLE, 1963; MINOGUE e FRY, 1981) quanto de oósporos (FAY e FRY, 1997; MEDINA e PLATT, 1999; DRENTH et al., 1995).

Diferentes populações de um mesmo patógeno podem ser afetadas de modo diferenciado pela temperatura. Em locais onde *P. infestans* se reproduz de modo assexuado, as populações são constituídas por linhagens clonais (ANDERSON e KOHN, 1995). Nos Estados Unidos, demonstrou-se que a germinação de esporângios de isolados das linhagens clonais "novas" US-7 e US-8 foi limitada por temperaturas acima de 20°C, o que não ocorreu com a germinação de esporângios de isolados da linhagem clonal "antiga" US-1 (MIZUBUTI e FRY, 1998). Não se observaram diferenças quanto ao efeito da temperatura no período de incubação, na área lesionada e na esporulação destas linhagens (MIZUBUTI e FRY, 1998).

No Brasil, há duas linhagens clonais de *P. infestans*: US-1 e BR-1. A linhagem US-1, mais antiga, é composta por isolados do grupo de compatibilidade sexual A1 e está associada a epidemias de requeima em tomate. A linhagem BR-1, descrita recentemente por GOODWIN et al. (1994), é composta por isolados do grupo A2 e causa requeima em batata. Como as

populações de US-1 ocorrem no País há muito tempo, possivelmente elas tenham se adaptado às condições tropicais ou subtropicais. Dessa forma, as informações disponíveis sobre o efeito da temperatura em componentes epidemiológicos de *P. infestans* geradas em países de clima temperado, provavelmente, não são válidas para as condições do Brasil. É possível que alguns componentes epidemiológicos das linhagens clonais US-1 e BR-1 de *P. infestans* existentes no Brasil sejam influenciados de modo diferenciado pela temperatura. O conhecimento do efeito da temperatura nos componentes epidemiológicos das linhagens clonais aqui existentes poderá ser útil para entender melhor a epidemiologia da requeima e poderá subsidiar racionalmente a implementação de sistemas de previsão da requeima no Brasil.

O objetivo deste estudo foi quantificar o efeito da temperatura no período de incubação, no período latente, na esporulação e no crescimento de lesão de isolados de *Phytophthora infestans* das linhagens clonais US-1 e BR-1, em folíolos de tomate e batata, respectivamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados de *Phytophthora infestans* utilizados

Os isolados utilizados nos experimentos foram selecionados da coleção de *P. infestans* do Laboratório de Epidemiologia – Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Como critério de seleção foi utilizada a representatividade geográfica das principais regiões produtoras de tomate e batata do Brasil (Quadro 1).

2.2. Produção do inóculo

De colônias de *P. infestans* cultivadas em meio de cultura centeio-sacarose-ágar-B (CAB) (CATEN e JINKS, 1968) foi preparada uma suspensão de inóculo, cuja concentração foi ajustada para 3×10^4 esporângios/ml, com auxílio de um hemacitômetro. Folíolos de batata “Bintje” e de tomate “Kada”, coletados de plantas cultivadas em casa de vegetação, foram colocados com a face abaxial voltada para cima, em caixa tipo gerbox, contendo papel-toalha esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada (ADE), para criar condições de câmara úmida.

Quadro 1 - Características dos isolados de duas linhagens clonais de *Phytophthora infestans* utilizados nos experimentos

Isolados	Linhagem Clonal	Hospedeiro	Grupo Compatibilidade	Estado de Coleta	Sensibilidade ao metalaxyl
Pib- 4	BR-1	Batata	A2	SC	Intermediário
Pib- 193	BR-1	Batata	A2	MG	Resistente
Pib-198	BR-1	Batata	A2	MG	Resistente
Pib- 214	US-1	Tomate	A1	SC	Sensível
Pib- 239	US-1	Tomate	A1	MG	Sensível
Pib- 256	US-1	Tomate	A1	SP	Sensível

Próximo à parte central de cada folíolo, foi depositada uma gota de 20 µl da suspensão de inóculo. Após a inoculação, os gerbox contendo os folíolos inoculados foram levados para uma câmara climatizada a 18°C, sob luz difusa. Transcorridos 10 dias, recortaram-se as lesões que apresentavam esporulação abundante, e as porções recortadas foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo ADE e submetidos à agitação em um agitador tipo vórtex. Posteriormente, para cada isolado, foi preparada uma suspensão de inóculo na concentração de 10⁴ esporângios/ml, a qual foi utilizada nos ensaios de período de incubação, período latente, expansão das lesões e esporulação de isolados das linhagens clonais.

2.3. Efeito da temperatura no período de incubação, no período latente e na expansão de lesão

Folíolos de batata “Bintje” e de tomate “Kada”, coletados de plantas cultivadas em casa de vegetação, com idade entre cinco e seis semanas, foram

levados para o laboratório e colocados em câmara úmida, conforme descrito em 2.2. Foram utilizados quatro gerbox para cada isolado de batata ou de tomate; cada gerbox continha três folíolos e constituiu uma repetição. Próximo à parte central de cada folíolo foi depositada uma gota de 50 µl da suspensão de inóculo, com auxílio de um pipetador automático. Os isolados de batata e os de tomate foram inoculados nos folíolos dos hospedeiros respectivos. Após a inoculação, os gerbox contendo os folíolos inoculados foram levados para incubadoras a 10, 15, 22 ou 27°C, com fotoperíodo de 14 horas.

2.3.1. Período de incubação (PI)

O período de incubação foi estimado com base em avaliações visuais de sintomas nos folíolos, os quais foram observados em diferentes intervalos de tempo: 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 92, 100, 108 e 116 horas após a inoculação. O período de incubação foi considerado concluído quando os sintomas se manifestaram em dois dos três folíolos de cada gerbox.

2.3.2. Período latente (PL)

Para estimar o período latente, observou-se cada lesão com o auxílio de um microscópio estereoscópico, nos mesmos intervalos de tempo adotados para determinar o PI (item 2.3.1). O período latente foi considerado concluído quando as lesões em dois dos três folíolos de cada gerbox apresentavam sinais, isto é, esporangióforos e, ou, esporângios do patógeno.

2.3.3. Crescimento de lesões (CL)

A área de cada lesão, em cada folíolo, foi determinada diariamente, a partir de 36 horas após a inoculação (HAI), e estendeu-se até 180 HAI. As lesões foram fotografadas com uma câmara digital, e as imagens, processadas com auxílio do programa ImageTool. Os dados obtidos (área de lesão, em cm²) foram plotados em função do tempo (HAI) para estimar o crescimento das lesões.

Para integrar os efeitos da temperatura e do tempo (idade da lesão) sobre o valor da área de lesões, foi calculado o volume abaixo da superfície de resposta (VASR) para isolados de US-1 e de BR-1.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (temperatura x linhagem clonal), e conduzido por duas vezes. Com os dados, foram calculadas estatísticas descritivas.

2.3.4. Efeito da temperatura na esporulação

Este ensaio foi realizado com plantas inteiras de batata “ Bintje ” e de tomate “ Kada ”, produzidas em casa de vegetação, com idade de 40 dias após a emergência ou transplântio, respectivamente. O inóculo foi produzido como descrito no item 2.2, utilizando os isolados Pib-4, Pib-198, Pib-214 e Pib-256.

De cada planta foram inoculados 15 folíolos, depositando-se, na região central, face abaxial, uma gota com volume de 50 µl com o auxílio de um pipetador automático. Os isolados de batata e tomate foram inoculados em plantas dos hospedeiros respectivos.

Imediatamente após a inoculação, as plantas foram envoltas por sacos de polietileno borrifados com água destilada, para criar a condição de câmara úmida, e transferidas para câmaras de crescimento a 10, 15, 22 ou 27°C, com fotoperíodo de 14 horas. Após 24 horas, os sacos plásticos foram retirados.

Diariamente, em intervalos de oito horas, atomizou-se água destilada nas plantas, a fim de evitar o ressecamento das lesões. Transcorridos sete dias para as

plantas nas câmaras a 15, 22 ou 27°C e 10 dias para as plantas a 10°C, atomizou-se água destilada nas plantas, e estas foram novamente envoltas por sacos de polietileno por 24 horas, para estimular a esporulação do patógeno.

Em cada planta, com o auxílio de uma régua, mediram-se o maior comprimento e a maior largura de 12 lesões, para posterior estimativa da área lesionada pelo patógeno. Em seguida, as lesões foram recortadas dos folíolos e transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo 2 ml de solução de preservação (2,5 ml de água destilada e 2,5 ml de 0,04 M CuSO_4 /0,2M acetato de sódio/ácido acético, pH 5,4). Os tubos foram agitados por 20 segundos em agitador tipo vórtex, para desprendimento dos esporângios, e armazenados a 4°C; num período de 144 horas, realizou-se a contagem dos esporângios, usando-se um hemacitômetro.

O número de esporângios produzido por unidade de área da lesão foi determinado multiplicando-se o total de esporângios determinado no hemacitômetro pelo volume da solução de preservação e dividindo pela área total da lesão. Para o cálculo da área das lesões, utilizaram-se as seguintes equações: área da lesão em batata = $-2,331 + 1,703 \times \text{comprimento} + 1,117 \times \text{largura}$ ($R^2 = 0,88$ para folíolos de batata); e área da lesão em tomate = $-2,09 + 1,213 \times \text{comprimento} + 1,634 \times \text{largura}$ ($R^2 = 0,85$ para folíolos de tomate).

Para gerar uma equação que permitisse a estimativa de área de lesões, mediram-se o maior comprimento e a maior largura de 100 lesões, de diferentes tamanhos, em folíolos de batata e 100 lesões em folíolos de tomate. Em seguida, a área de cada lesão foi determinada com o auxílio do programa ImageTool. Os valores das áreas foram submetidos à análise de regressão em função do maior comprimento e da maior largura, para obtenção das equações.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (temperatura x linhagem clonal), com três repetições por isolado e temperatura. Cada planta, em um vaso, constituiu uma unidade experimental. Este ensaio foi realizado duas vezes.

3. RESULTADOS

Os menores valores de PI foram registrados a 22°C, para isolados de ambas as linhagens clonais de *P. infestans* (Figura 1). A 22°C, o PI para US-1 foi de 66,7 h e, para BR-1, de 44 h. A 10 e 15°C, o PI para US-1 foi de 134,6 h e 96,7 h, respectivamente, enquanto para BR-1 os valores foram de 86,7 e 64,7 h. A 27°C, o PI da linhagem clonal US-1 (74,0 h) foi menor que o da BR-1 (96,7 h). As duas linhagens clonais apresentam tendência quadrática dentro da faixa de temperatura avaliada para o período de incubação (Figura 1).

Os isolados da linhagem clonal US-1 e os de BR-1 a 27°C não esporularam (Figura 2). Para as duas linhagens, os menores valores de PL foram a 22°C, com 93,3 h para US-1 e 68,0 h para BR-1. O PL diminuiu com o aumento da temperatura para BR-1. Para US-1 a 15°C, observou-se PL maior que o de BR-1, e a 27°C o PL foi de 127,3 h. Os isolados da linhagem clonal BR-1 apresentaram tendência linear dentro da faixa de temperatura avaliada para o período latente, e os isolados da linhagem US-1, tendência quadrática (Figura 2).

Os isolados da linhagem clonal BR-1 causaram lesões maiores a 22°C, enquanto os da linhagem US-1, a 27°C (Figuras 3 e 4). Não houve desenvolvimento de lesões causadas por isolados de US-1 a 10°C, nem por isolados de BR-1 a 27°C.

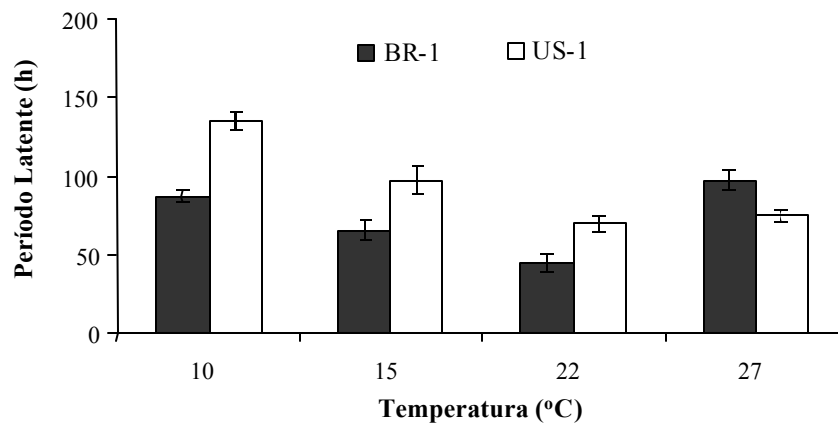


Figura 1 - Período de incubação de isolados de *Phytophthora infestans* das linhagens clonais BR-1 e US-1 em diferentes temperaturas, em folíolos de batata e tomate, respectivamente. Médias de dois ensaios. As barras verticais representam o erro-padrão da média.

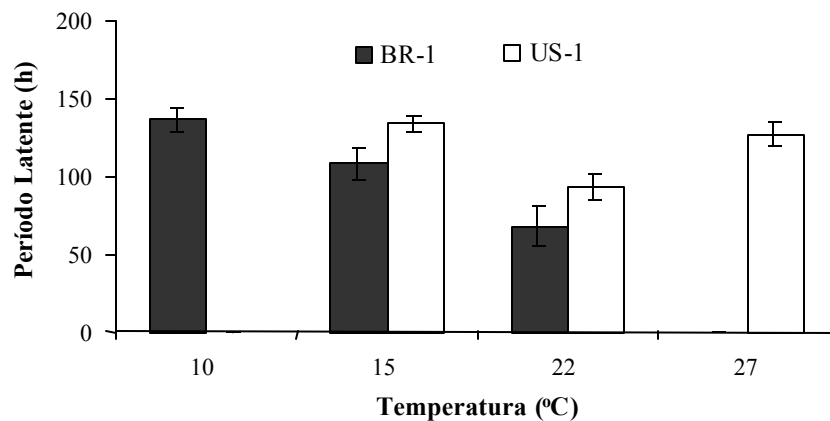


Figura 2 - Período latente de isolados de *Phytophthora infestans* das linhagens clonais BR-1 e US-1 em diferentes temperaturas, em folíolos de batata e tomate, respectivamente. Médias de dois ensaios. As barras verticais representam o erro-padrão da média.

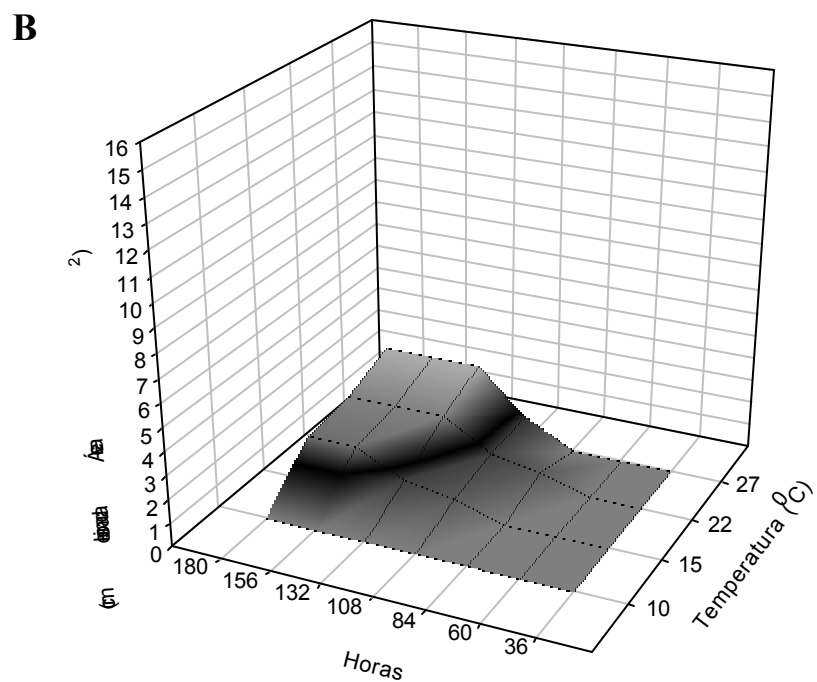
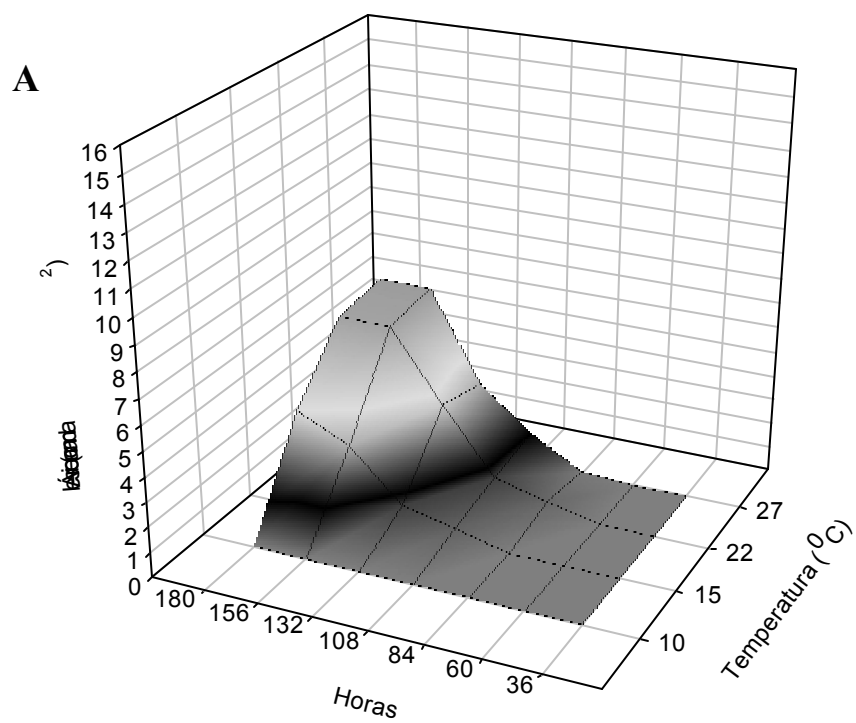


Figura 3 - Efeito da temperatura e do tempo no crescimento das lesões de isolados da linhagem clonal US-1 de *Phytophthora infestans* em folíolos de tomate. A - ensaio 1; B - ensaio 2.

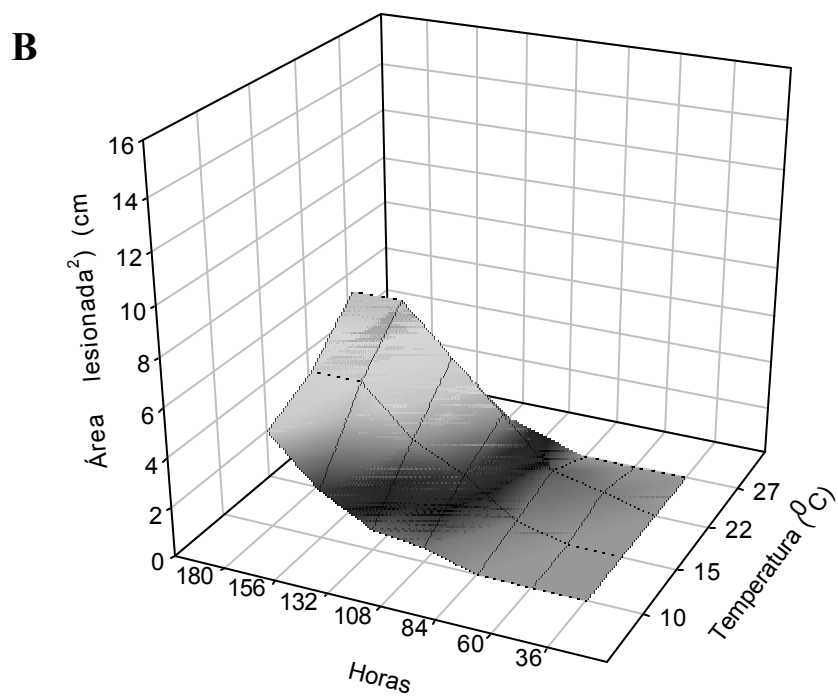
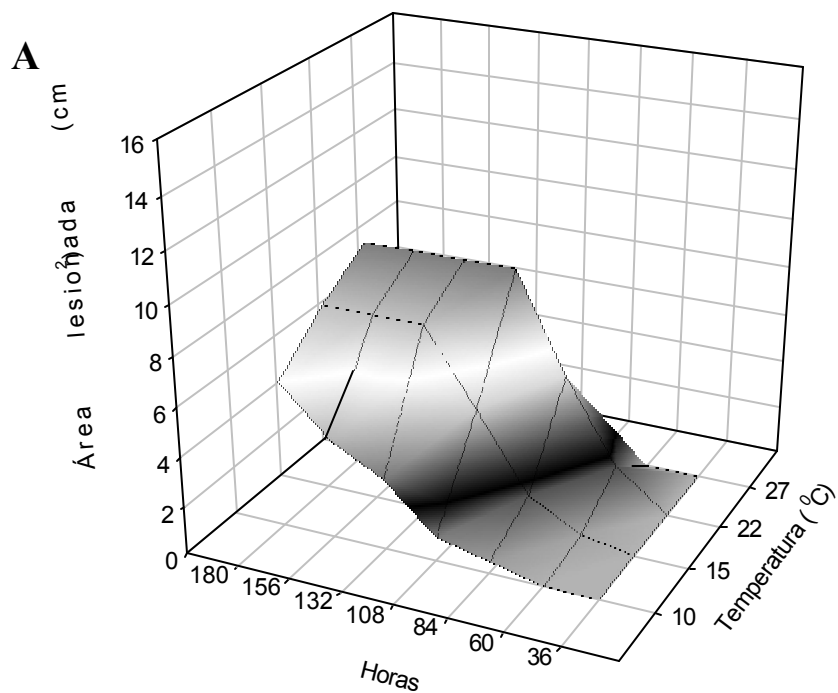


Figura 4 - Efeito da temperatura e do tempo no crescimento das lesões de isolados da linhagem clonal BR-1 de *Phytophthora infestans* em folíolos de batata. A - ensaio 1; B - ensaio 2.

Isolados da linhagem clonal US-1 apresentaram maior média de esporângios produzidos por área quando as plantas foram mantidas a 22°C (Quadro 2). Para os isolados da linhagem BR-1, verificou-se maior média de esporulação nas temperaturas de 15 e 22°C (Quadro 2). A 10°C, as lesões causadas por isolados de US-1 não esporularam. Para lesões causadas por isolados de BR-1, não houve esporulação quando as plantas foram mantidas a 27°C. Com aumento da temperatura entre 10 e 22°C, ocorreu aumento da produção de esporângios por área lesionada para BR-1 (Figura 6).

Quadro 2 - Esporulação por unidade de área lesionada (esporângios/cm²) de quatro isolados de *Phytophthora infestans* das linhagens clonais US-1 e BR-1 em diferentes temperaturas, em plantas de tomate e batata

Temperatura (°C)		Linhagem clonal	
		US-1 (Tomate)	BR-1 (Batata)
Ensaio 1	10	0	4624 ^a
	15	6724	21424
	22	20271	23514
	27	8169	0
Ensaio 2	10	0	3214
	15	10767	20224
	22	22132	22005
	27	8149	0

^a Média de esporângios produzidos por área lesionada, calculada com os dados originais de cada temperatura.

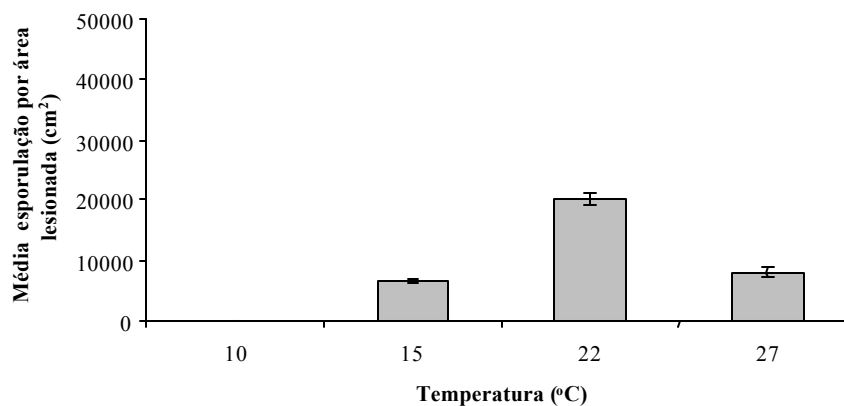


Figura 5 - Efeito da temperatura na esporulação por unidade de área de isolados da linhagem clonal US-1 de *Phytophthora infestans* em plantas de tomate. As barras verticais representam o erro-padrão da média.

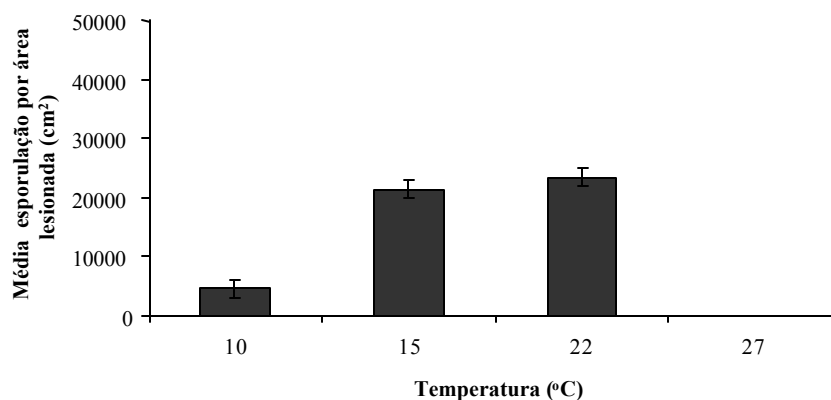


Figura 6 - Efeito da temperatura na esporulação por unidade de área de isolados da linhagem clonal BR-1 de *Phytophthora infestans* em plantas de batata. As barras verticais representam o erro-padrão da média.

No estudo da área lesionada pelo patógeno em função da temperatura, foi observado que a linhagem clonal BR-1 apresentou maior volume abaixo da superfície de resposta (Quadro 3). Em relação a US-1, a linhagem clonal BR-1 apresentou maior capacidade de crescimento das lesões na variação de temperatura avaliada.

Quadro 3 - Volume abaixo da superfície de resposta do crescimento de lesões, sob efeito da temperatura ($\text{cm}^2\cdot\text{h}\cdot^\circ\text{C}$), de isolados de *Phytophthora infestans* das linhagens clonais US-1 e BR-1

	Linhagem clonal	
	BR-1	US-1
Ensaio – 01	4716 ^a	3059
Ensaio – 02	4755	2128

^a Média de cada repetição de três isolados de cada linhagem clonal.

4. DISCUSSÃO

A temperatura influenciou de modo diferenciado os componentes epidemiológicos das linhagens clonais US-1 e BR-1. Os efeitos mais marcantes foram sobre o período latente e a esporulação, possivelmente os mais diretamente associados à taxa de progresso da doença no campo.

De modo geral, não houve efeito diferenciado da temperatura sobre o componente PI. Em ambas as linhagens, observou-se tendência de redução do PI com o aumento da temperatura até atingir a temperatura ótima (menor PI), seguida de aumento do PI com aumento da temperatura. Os isolados de ambas as linhagens clonais apresentaram menor PI e PL a 22°C. O PI de uma doença é determinado em grande parte pela reação do hospedeiro e, em geral, é expresso tão logo a infecção seja estabelecida. Assim, é possível que a temperatura tenha pouca influência e que não seja capaz de interferir de modo diferenciado nas duas linhagens clonais. Por outro lado, o PL é um componente associado a características do hospedeiro e do patógeno (PARLEVLIET, 1979) e, em geral, demanda maior tempo de interação patógeno-hospedeiro. Se de fato as linhagens clonais são afetadas de modo diferencial pela temperatura, esse efeito tem mais chance de ser detectado com o componente PL do que com o PI.

O PL das linhagens clonais de *P. infestans* foi afetado de modo diferenciado pela temperatura. Para a linhagem BR-1, houve esporulação em

temperatura baixa (10°C). Estudar os efeitos da temperatura sobre o crescimento de *P. infestans* no hospedeiro é difícil; em um dos poucos trabalhos realizados em tecidos do hospedeiro, foi relatado maior crescimento, medido como aumento da massa de hifas, em folíolos mantidos a 17°C do que a 13°C (HARRISON et al., 1990). Estes trabalhos foram realizados com isolados de *P. infestans* do grupo de compatibilidade A1 e, possivelmente, da linhagem US-1. Ainda não há relatos sobre os efeitos da temperatura no crescimento de isolados das novas linhagens clonais de *P. infestans*, mas, com base nos resultados do presente estudo, há evidências de que os efeitos sejam distintos daqueles em US-1.

Apesar de não ter havido esporulação de US-1 a 10°C e de BR-1 a 27°C, os folíolos foram colonizados e o patógeno estava vivo. Após 15 dias de incubação a 10°C, os folíolos inoculados com US-1, que não apresentavam lesões com esporulação, foram transferidos para incubadora a 20°C. Após 12 horas de incubação nesta temperatura, observou-se esporulação abundante nas lesões. O mesmo procedimento foi realizado para folíolos inoculados com BR-1, depois de oito dias de incubação a 27°C. Esse fato evidencia que os isolados das linhagens clonais podem sobreviver em condições adversas e que, havendo condições favoráveis, podem se tornar ativos e contribuir para o desenvolvimento da epidemia. Supostamente, esse fato pode contribuir para a sobrevivência das linhagens clonais em condições tropicais.

Os maiores valores de área lesionada causados por isolados de US-1 e BR-1 ocorreram em temperaturas distintas. À semelhança do observado para período latente, houve limitação de crescimento dos isolados de BR-1 a 27°C e de US-1 a 10°C. Os maiores valores de AL ocorreram quando os folíolos inoculados com BR-1 e US-1 foram mantidos a 22 e 27°C, respectivamente. O efeito da temperatura sobre a AL deve ser visto considerando-se o efeito da temperatura sobre o patógeno e sobre o hospedeiro. Assim como para o PL, o crescimento de AL resulta de uma interação relativamente duradoura entre patógeno e hospedeiro e, portanto, mais sujeita a efeitos diferenciais da temperatura. Observou-se que a AL parece estar diretamente relacionada ao

período latente. Espera-se que lesões que possuam menor período latente apresentem maiores áreas.

A temperatura ótima para esporulação de isolados das duas linhagens clonais foi de 22°C. Pelo fato de o componente esporulação ter sido quantificado nos mesmos folíolos que os demais componentes, houve alta correlação deste componente com o PL e a AL. Por essa razão, não houve esporulação de US-1 a 10°C e de BR-1 a 27°C. O efeito diferencial da temperatura na esporulação pode ser explicado como uma diferença intrínseca das linhagens clonais em resposta à temperatura. Outra possível explicação pode estar associada ao binômio temperatura – umidade relativa (UR). Em condições de UR elevada, como foi o caso neste trabalho, a formação de esporângios é favorecida por temperaturas na faixa de 18 a 22°C (DUNIWAY, 1983; MALTESE EVOLA et al., 1995). Para haver esporulação em temperaturas muito baixas ou muito altas, são necessários longos períodos de UR elevada. Os esporângios não são formados quando a umidade relativa é menor que 91% (DE WEILLE, 1964) e são formados em pequeno número a 97% (CROSIER, 1934). No presente trabalho, os folíolos foram mantidos durante todo o experimento em ambiente “supostamente” com alta UR. Entretanto, não se pode assegurar que a UR foi mantida constante e próxima a 100%. A combinação temperatura desfavorável e pequena alteração na UR pode ter resultado em supressão de esporulação.

O efeito diferencial da temperatura sobre os componentes revela que as populações de *P. infestans* no Brasil possuem atributos epidemiológicos distintos. Há evidências de que os isolados de BR-1 podem causar doenças em locais onde a temperatura média é inferior à adequada para US-1. No Brasil, o cultivo de batata é realizado em regiões mais altas e de temperaturas amenas. Nessas condições, haveria maior favorecimento aos isolados de BR-1 do que aos de US-1. O tomate é cultivado em vários locais, mas, geralmente, ocupa regiões com temperaturas mais altas que as de regiões produtoras de batata. Nessas condições, os isolados de US-1 encontrariam melhores condições para causar epidemias. O fato de US-1 ser capaz de se desenvolver em condições de clima mais quente sugere que os isolados desta linhagem clonal no Brasil tenham se

adaptado às condições tropicais. Assim, é provável que os efeitos da temperatura sobre os componentes epidemiológicos de isolados de *P. infestans* das linhagens clonais US-1 e BR-1 contribuam de alguma forma para a alta especificidade de hospedeiro dessas populações no Brasil.

Outra implicação do efeito diferencial da temperatura sobre as linhagens clonais seria na utilização de sistemas de previsão de ocorrência da requeima. Diferenças entre as linhagens clonais quanto ao efeito da temperatura devem ser levadas em consideração na utilização desses sistemas. Portanto, a validação e, se necessário, a adaptação desses sistemas para as condições brasileiras são de grande importância.

CAPÍTULO 3

VALIDAÇÃO DO SIMULADOR BLIGHT NAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS DO BRASIL

1. INTRODUÇÃO

O controle da requeima, doença causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, é altamente dependente de aplicações de fungicidas, pois não há variedades comerciais resistentes e outros métodos de controle são pouco eficientes. As epidemias, sob condições favoráveis, têm alta taxa de progresso e, se medidas de controle não forem tomadas, perdas totais de produção podem ocorrer (FRY e GOODWIN, 1997).

Para aumentar a eficiência do uso de fungicidas e, possivelmente, reduzir a quantidade aplicada, recursos como simuladores de doença vêm sendo utilizados. Essas ferramentas, desenvolvidas com base na estreita relação existente entre o desenvolvimento da requeima e os fatores ambientais, são exemplos de recursos que integram as relações ambiente-doença capazes de contribuir para o manejo da doença (SHTIENBERG, 2000). O primeiro modelo

de simulação da requeima, implementado em computador, o EPIDEM, surgiu em 1969 (WAGGONER e HORSFALL, 1969). Com a maior disponibilidade de recursos computacionais e dados meteorológicos, incrementou-se o interesse de utilização de simuladores.

A simulação de doenças é bastante útil em estudos epidemiológicos e de manejo de doenças de plantas. Por meio de simulação, é possível estabelecer táticas de manejo mais coerentes, diminuir o uso de fungicidas, reduzir custo, ganhar tempo e não contaminar o meio ambiente. Mesmo que um modelo de simulação não represente a realidade completamente, os resultados podem servir para indicar potenciais estratégias eficazes. Assim, simulação de epidemias em computador permite a análise de diferentes situações, como variações de condições climáticas, diferentes tratamentos fungicidas (produtos, dose, intervalo de aplicação, misturas etc.), eficiência da resistência das cultivares, entre outras (SHTIENBERG e FRY, 1990).

Entre os modelos de simulação de requeima, o simulador Blight (BRUHN e FRY, 1981) tem sido um dos poucos cuja utilização resultou em medidas práticas de controle da doença no campo (SHTIENBERG et al., 1994). O Blight simula o efeito do clima, da resistência de cultivares e de dois fungicidas, o clorotalonil e o metalaxyl, em epidemias da requeima. Ele foi utilizado para responder perguntas ou testar hipóteses relativas ao manejo da requeima em batata. Com base no simulador, foi desenvolvido um sistema de previsão da requeima conhecido como SIMCAST (FRY et al., 1983; GRÜNWALD et al., 2000). O simulador foi também utilizado para responder algumas perguntas básicas referentes a aspectos metodológicos, como estudo da distribuição espacial da requeima (MINOGUE e FRY, 1983), para quantificação da magnitude da interferência entre parcelas em ensaios de campo (PAYSSOUR e FRY, 1983) e como um meio de avaliação quantitativa das condições climáticas favoráveis ao progresso da requeima (MICHAELIDES, 1985). Questões mais elaboradas, como o manejo da resistência de *P. infestans* a metalaxyl, foram também abordadas com o simulador (MILGROOM e FRY, 1988). No entanto, aparentemente, os resultados de simulação de maior aplicação prática foram os

obtidos por SHTIENBERG et al. (1994), para estabelecer um calendário de pulverização ajustado para a resistência da cultivar.

O Blight foi desenvolvido para requeima da batata em condições ambientais do estado de Nova York, Estados Unidos (BRUHN e FRY, 1981). Os parâmetros das equações utilizadas no simulador foram estimados com dados experimentais de campo obtidos para isolados de *P. infestans* da linhagem clonal US-1. Essa linhagem clonal se encontrava distribuída em todo o mundo e causava epidemias de requeima em tomate e batata. Atualmente, novas linhagens clonais de *P. infestans* se encontram distribuídas em vários países, inclusive no Brasil (GOODWIN et al., 1994), e algumas têm características epidemiológicas distintas das dos isolados da linhagem US-1 (MIZUBUTI e FRY, 1998). Portanto, para que o simulador possa ser utilizado para fins de manejo da requeima, é imperativo submetê-lo à validação nas condições locais.

O simulador Blight ainda não foi validado para as condições tropicais ou subtropicais, como as do Brasil. Nas condições de clima temperado onde foi desenvolvido, o simulador é acurado em simular epidemias de requeima em batata (DOSTER et al., 1990). No entanto, no Brasil, as condições climáticas são bastante distintas e variáveis ao longo do ano. Adicionalmente, a linhagem clonal que causa requeima em batata é a BR-1. Do ponto de vista epidemiológico, é importante validar o simulador para as condições brasileiras, pois este seria um recurso útil na investigação de vários aspectos da epidemia de requeima em batata. Assim, o objetivo deste trabalho foi validar o simulador Blight nas condições ambientais do Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Instalação dos experimentos

Realizaram-se dois ensaios em um campo experimental localizado no município de Teixeiras, MG (20° 35' latitude sul e 42° 52' longitude oeste). Nas proximidades, não havia campos de produção de batata ou de tomate. O primeiro ensaio foi instalado em 04/05/2000, e o segundo, em 31/08/2000.

Nos dois ensaios foram utilizadas batatas-semente certificadas, cultivar Bintje, suscetível à requeima. As parcelas tinham 16 m² (4 m de largura x 4 m de comprimento). O espaçamento foi de 1,0 m entre linhas e 0,50 m entre plantas, resultando em 64 plantas por parcela. As parcelas foram espaçadas de 4 m entre si, na linha, e 3 m entre linhas de parcelas. Esse desenho foi adotado para reduzir a interferência entre parcelas durante a condução do ensaio.

2.2. Tratos culturais

No plantio, aplicaram-se 500 g de N-P-K por metro linear de sulco, na fórmula 4-14-8, e trinta dias após a emergência das plantas realizou-se a

amontoa juntamente com a adubação de cobertura, com 500 g da mesma fórmula, por metro linear.

No primeiro ensaio, pulverizaram-se fungicidas para impedir infecções de requeima, antes da inoculação artificial das parcelas. Foram feitas quatro pulverizações com clorotalonil (Dacostar 750) (0,75 kg i.a/ha) em intervalos de sete dias e duas pulverizações com metalaxyl + mancozeb (Ridomil Mancozeb BR) (0,08 kg i.a/ha) em intervalos quinzenais. Para controle de pragas, foram realizadas duas pulverizações com o inseticida paration metílico (Folidol 600) (0,06 kg i.a/ha). No segundo ensaio, foram realizadas apenas uma pulverização com clorotalonil e uma com metalaxyl. Imediatamente após o plantio, foi aplicado o herbicida metribuzim (Sencor 480) (0,48 kg i.a/ha).

2.3. Produção de inóculo

Selecionou-se o isolado Pib-102 da linhagem clonal US-1 (grupo de compatibilidade A1), obtido de plantas na região de Viçosa e sensível ao metalaxyl. De uma cultura pura do isolado em placas, retiraram-se os esporângios por meio da adição de água destilada esterilizada e com auxílio de pincel de cerdas macias. A suspensão de esporângios foi coletada em um béquer, a concentração foi ajustada para 3×10^4 esporângios/ml e colocada a 4°C, durante uma hora, para estimular a liberação de zoósporos.

Folíolos de batata 'Bintje', de plantas com seis a oito semanas após plantio, foram inoculados por meio da atomização da suspensão de esporângios. Após a inoculação, as plantas foram envoltas com sacos de polietileno umedecidos com água destilada e levadas para câmara de crescimento a 22°C, para garantir condições favoráveis à germinação e infecção.

Após 24 horas, os sacos de polietileno foram retirados e durante sete dias, a intervalos de oito horas, atomizou-se água destilada nas plantas, para evitar o ressecamento dos folíolos inoculados. No sétimo dia de incubação, as plantas inoculadas foram envoltas novamente com os sacos de polietileno

umedecidos com água destilada, a fim de estimular a esporulação do patógeno. Após 24 horas coletaram-se as lesões e preparou-se uma suspensão com 500 esporângios/ml, a qual foi mantida a 4°C por cinco horas, antes da inoculação, para estimular a liberação de zoósporos.

2.4. Inoculação

No primeiro ensaio, realizaram-se duas inoculações: a primeira em 21/07/2000 e a segunda em 28/07/2000. Antes das inoculações, as parcelas foram irrigadas por aspersão, para assegurar microclima favorável à infecção. Todas as plantas de cada parcela foram inoculadas no início da noite (19 horas), com o auxílio de um pulverizador costal manual. No segundo ensaio, realizaram-se também duas inoculações: a primeira em 23/10/2000, em todas as plantas das parcelas, e a segunda em 28/10/2000, apenas nas plantas das parcelas dos blocos situados na extremidade da área experimental. Esse procedimento foi necessário, em razão do insucesso da primeira inoculação. Os demais procedimentos foram conforme descrito para o primeiro ensaio.

2.5. Tratamentos

Foram avaliados quatro tratamentos: 1 – aplicação do fungicida protetor clorotalonil, a 1,13 kg i.a/ha (Dacostar 750), em intervalos semanais; 2 – aplicação do fungicida sistêmico metalaxyl + mancozeb (0,2 kg i.a/ha) (Ridomil Mancozeb BR), em intervalos quinzenais; 3 – aplicações alternadas, em intervalos semanais, de fungicida protetor com sistêmico (clorotalonil + metalaxyl), nas dosagens descritas nos tratamentos 1 e 2, respectivamente; e 4 – testemunha, aplicação de água em intervalos semanais. As pulverizações com os fungicidas foram iniciadas aos sete dias após a segunda inoculação (DOSTER et al., 1990; SHTIENBERG e FRY, 1990).

2.6. Avaliação da intensidade da requeima

A severidade da requeima nas parcelas foi estimada visualmente por dois avaliadores, a cada três dias, até o final da epidemia. Para isso, foi utilizada uma chave diagramática (JAMES et al., 1971), modificada por FRY et al. (1979). Adicionalmente, em ambos os ensaios, avaliaram-se os seguintes componentes epidemiológicos: Y_7 – severidade da doença aos sete dias após a inoculação e $Y_{\max}$ – severidade máxima observada ao final da epidemia.

Os ensaios foram montados em blocos casualizados, com quatro repetições e quatro tratamentos.

2.7. Simulação de epidemias

Durante a condução dos experimentos, registraram-se os valores das variáveis climáticas temperatura (Model-108 Temperature Probe), umidade relativa (237- Leaf Wetness Sensor) e precipitação (TE – 525 Tipping Bucket Rain), com o auxílio de um coletor automático de dados (CR-10X Campbell Scientific®). Todos os sensores foram amostrados em intervalos de um minuto. Os dados registrados foram utilizados para estimar valores médios de cada variável climática, em intervalos de 15 minutos.

Para a simulação, foram utilizados como entrada de dados no modelo os valores de precipitação acumulada diariamente, temperatura média do dia, número de horas em que o valor de umidade relativa foi maior ou igual a 90% e temperatura média durante o período em que o valor de umidade relativa esteve maior ou igual a 90%. O início e o final da epidemia foram considerados como o dia da segunda inoculação e 90 dias após a emergência, respectivamente. A epidemia foi simulada em uma cultivar suscetível “Bintje” inoculada com um isolado sensível ao metalaxyl. A quantidade de inóculo inicial foi estabelecida como seis lesões por parcela, observadas aos sete dias após a inoculação.

3. RESULTADOS

No primeiro ensaio, não foi observado o progresso da epidemia. A inoculação foi bem sucedida, pois, após um período latente, havia de seis a oito lesões por parcela, originadas da inoculação, porém a epidemia não se desenvolveu durante o ensaio. Usando os dados relativos às condições climáticas e a quantidade de inóculo inicial presente no ensaio de campo em 28/07/00, o resultado da simulação foi o não-desenvolvimento da doença, similarmente ao observado no campo.

No segundo ensaio, houve rápido desenvolvimento das epidemias de requeima nas parcelas. A severidade final $Y_{\text{máx}}$ foi de 100% e ocorreu aos 70 dias após a emergência. Não houve efeito dos tratamentos com fungicidas (Figura 1). Em todos os tratamentos, o nível de severidade máxima ocorreu na mesma época, supostamente devido ao alto índice pluviométrico registrado na época (Figura 3), que acelerou a degradação dos fungicidas aplicados sobre as parcelas.

A simulação, com os dados climáticos registrados durante a época em que o segundo ensaio foi conduzido, resultou em uma epidemia de requeima (Quadro 1). Na simulação, a epidemia iniciou-se 15 dias após a observada no campo (Figura 2). Quando a severidade da doença observada no campo atingiu 100%, a simulada pelo Blight foi de 42%. A severidade segundo o modelo de simulação atingiu 100% dez dias após a que foi observada no campo.

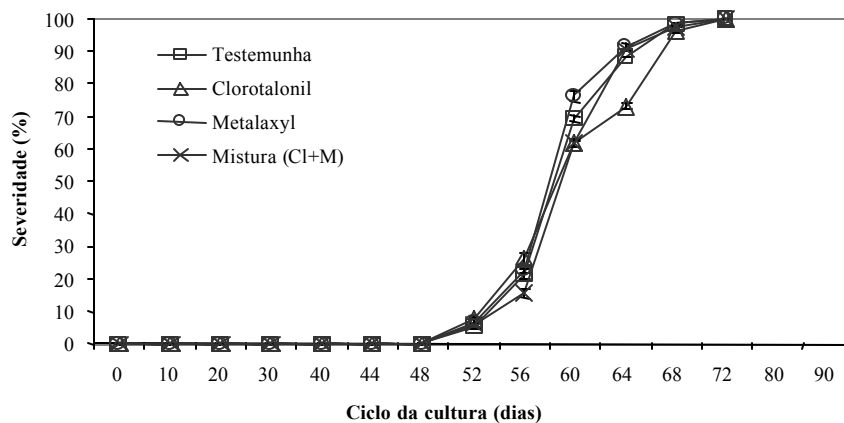


Figura 1 - Progresso da requeima em parcelas de batata causado por *Phytophthora infestans*, nas quais foram aplicados diferentes tratamentos para controle da doença. Ensaio 2. As barras verticais representam o erro-padrão das médias.

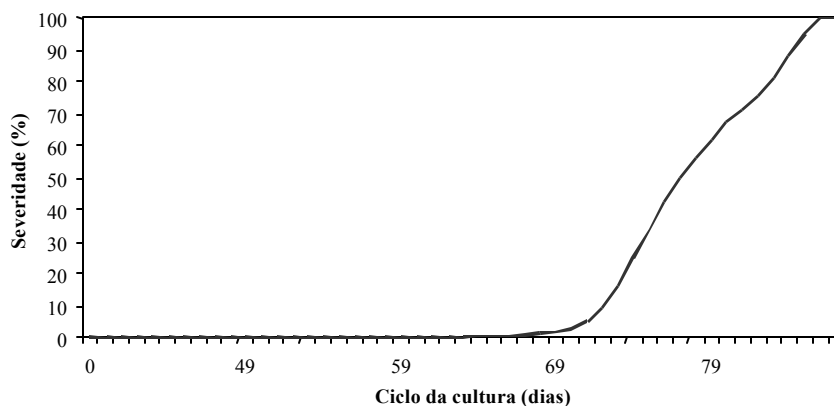


Figura 2 - Progresso da requeima segundo o simulador Blight. Epidemia em uma cultivar suscetível e em parcelas de batata nas quais não foram aplicados fungicidas. Ensaio 2.

Quadro 1 - Média das variáveis climáticas obtidas durante a condução dos ensaios 1 e 2

Variáveis climáticas	Ensaio 1	Ensaio 2
Temperatura média	15°C	21,6°C
Média do número de horas em que a umidade relativa do ar foi maior ou igual a 90%	8 horas	14 horas
Média da temperatura durante o período em que a umidade relativa do ar esteve maior ou igual a 90%	12°C	20°C
Média de umidade relativa do ar	56,8%	80%
Precipitação média / dia	0,7 mm	9 mm

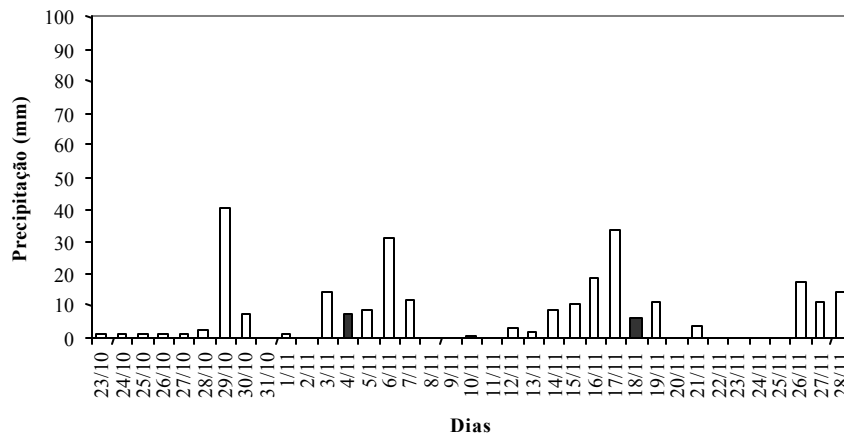


Figura 3 - Precipitação diária durante o ensaio 2. As setas representam o dia em que os fungicidas foram aplicados.

4. DISCUSSÃO

O progresso das epidemias da requeima foi afetado de modo marcante pelas condições climáticas. No primeiro ensaio, conduzido durante os meses de junho a setembro, a intensidade de precipitação pluviométrica praticamente foi zero, a média diária da umidade relativa, de 50%, e a temperatura média no período, de 15°C. Essas condições climáticas não foram favoráveis ao progresso da requeima. O isolado da linhagem clonal US-1 utilizado requer valores mais altos de umidade para se estabelecer. Segundo o observado nos capítulos 1 e 2, a temperatura mais adequada para o desenvolvimento de isolados de US-1 foi em torno de 22°C. De acordo com os dados apresentados no capítulo 2, não ocorreu esporulação de isolados de US-1 a 10°C. No experimento de campo, a temperatura média durante o período em que a umidade foi maior ou igual a 90% foi de 12°C, muito próxima da temperatura que limita o desenvolvimento do patógeno.

A umidade, na forma de umidade relativa do ar, de precipitação ou de irrigação, também limitou a epidemia no primeiro ensaio. Apesar de se ter irrigado por aspersão, a quantidade de água não foi suficiente para permitir rápido progresso da doença. O pequeno número de horas com umidade igual ou superior a 90% (oito horas em média) pode ter resultado em menor número de lesões formadas, conforme demonstrado no capítulo 2. Em condições semi-

áridas, a baixa umidade relativa do ar dificulta o progresso de uma epidemia de requeima (EASTON, 1982; JOHNSON et al., 1996). Uma combinação de baixa temperatura e baixa umidade parece ser a explicação mais provável para o não-desenvolvimento da requeima no experimento de inverno.

As simulações realizadas com os dados climáticos do primeiro ensaio resultaram em não-desenvolvimento da epidemia, similarmente ao observado. A não-favorabilidade das condições climáticas foi simulada adequadamente pelo Blight. Durante o primeiro ensaio de campo realizado no inverno não foi observado o progresso da epidemia de requeima. Assim, nas condições da Zona da Mata de Minas Gerais, é possível manejar a requeima com menor número de pulverizações de fungicidas, ou utilizando produtos menos eficientes, como, por exemplo, cúpricos, mas de menor custo e menos tóxicos.

No segundo ensaio, realizado durante a primavera e o início do verão, houve severa epidemia de requeima. Nessa época, a média de precipitação diária (chuva + irrigação) foi de 9 mm, a média diária da umidade relativa, de 80%, e a temperatura média, de 21,6°C. O número de horas diárias médio com umidade relativa do ar maior ou igual a 90% foi de 14 horas. Nessas condições ambientais, o patógeno é capaz de ocasionar severa epidemia, destruindo a cultura em poucos dias (MICHAELIDES, 1985). Os resultados obtidos no campo corroboraram aqueles obtidos em laboratório, onde o bom desenvolvimento de isolados de US-1 (maior número de lesões, menor período latente, maior área lesionada e maior esporulação) ocorreu em temperaturas próximas a 22°C e longo período de molhamento foliar.

As simulações realizadas com os dados climáticos do segundo ensaio resultaram em epidemia severa no tratamento testemunha, mas com atraso de 15 dias em relação ao início da epidemia “real” observada no campo. Não houve epidemias severas quando se simularam os efeitos dos tratamentos com fungicidas. Entretanto, no campo, as epidemias das parcelas tratadas foram tão severas quanto as das parcelas testemunhas. Provavelmente, os altos valores de precipitação pluviométrica no período reduziram a eficácia dos tratamentos fungicidas. Existem relatos de que a alta pluviosidade diminui os resíduos do

fungicida clorotalonil sobre o hospedeiro (ELLIOT e SPURR, 1993) e causa declínio de resíduos de metalaxyl (MILGROOM et al., 1988).

É importante destacar que, quando se planeja utilizar um modelo de simulação, é imprescindível executar sua validação. Essa validação deve ser realizada com os dados climáticos do local em que se deseja simular a epidemia, considerando que o simulador está sendo testado em local diferente daquele em que foi programado e validado. Assim, qualquer modelo de simulação de epidemias de requeima que venha a ser implementado no Brasil deve ser validado. Com a validação do simulador de epidemias de requeima, poder-se-á dispor de uma estratégia adicional para testar várias táticas de manejo da doença. Assim, será possível executar um controle mais racional das epidemias de requeima ocorridas no País.

CONCLUSÕES

Os componentes epidemiológicos das linhagens clonais US-1 e BR-1 são influenciados de maneira distinta pela temperatura. Essa diferença foi observada nos seguintes componentes epidemiológicos: período de incubação, período latente, expansão da lesão e esporulação do patógeno. Além desses efeitos, foi observado que a temperatura afeta de modo diferenciado a germinação de esporângios de *P. infestans* das linhagens US-1 e BR-1. Esse efeito diferencial mostra que as linhagens clonais de *P. infestans* existentes no País possuem atributos epidemiológicos distintos. Portanto, essa diferença deve ser levada em consideração no manejo da doença; em temperaturas mais altas a linhagem clonal US-1 associada à cultura do tomate é favorecida, e em temperaturas amenas, a linhagem BR-1 em batata.

No estudo da temperatura e do tempo de molhamento foliar, observou-se que a temperatura e a umidade são importantes variáveis climáticas que interferem no desenvolvimento de uma epidemia de requeima. Assim, essas diferenças epidemiológicas entre as linhagens clonais podem interferir diretamente no controle da requeima e deverão ser consideradas se se pretender utilizar sistemas de previsão de ocorrência da requeima.

O simulador de epidemia de requeima Blight não simulou com precisão epidemias de requeima quando as condições ambientais foram muito favoráveis à

doença. Assim, novos ensaios em várias épocas do ano e em anos diferentes são necessários. Pelos resultados preliminares observados, as equações matemáticas que compõem o simulador necessitarão de ajustes para poder simular com precisão epidemias de requeima desenvolvidas no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.B., KOHN, L. M. Clonality in soilborne, plant-pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology** 33: 369 - 391, 1995.

BROMMONSCHENKEL, S.H. Patogenicidade, compatibilidade, citogenética e padrões isoenzimáticos de isolados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary do Brasil. Viçosa-MG : UFV, (Tese), 1988.

BRUHN, J.A., FRY, W.E. Analysis of potato late blight epidemiology by simulation modeling. **Phytopathology** 71: 612 - 616, 1981.

CAMPBELL, C.L., MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. Edited by John Wiley e Sons, Inc., 1990, 552 p.

CATEN, C.E., JINKS, J.L. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans* I. Cultural variation. **Canadian Journal of Botany** 46: 329 - 348, 1968.

CROSIER, W. **Studies in biology of *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary**. Cornell Univ. Exp. Stn. Mem. 155 : 40pp. 1934.

DE WEILLE, G.A. **Forecasting crop infection by the potato blight fungus**. Mededelingen en Verhandelingen 82: 1-144, 1964.

DE WEILLE, G.A. Laboratory results regarding potato blight and their significance in the epidemiology of blight. **European Potato Journal** 6: 121-130, 1963.

- DOSTER, M.A., MILGROOM, M.G., FRY, W.E. Quantification of factors influencing potato late blight suppression and selection for metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*: a simulation approach. **Phytopathology** 80: 1190 -1198, 1990.
- DRENT, A., JANSSEN, E.M., GOVERS, F. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. **Plant Pathology** 44: 86-94. 1995.
- DUNIWAY, J. M. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and H. Tsao (Ed.) *Phytophthora. Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. St. Paul. **The American Phytopathological Society** . pp. 175-187, 1983.
- EASTON, G.D. Late blight of potatoes and prediction of epidemics in arid central Washington state. **Plant Disease** 66: 452 - 455, 1982.
- ELLIOT, V.J., SPURR, H.W. Jr. Temporal dynamics of chlorotalonil residues on peanut foliage and the influence of weather factors and plant growth. **Plant Disease** 77: 455 - 460, 1993.
- ERWIN, D.C., RIBEIRO, O.K. *Phytophthora* disease worldwide. **The American Phytopathological Society Press**, St. Paul, Minnesota. 1996. 562 p.
- FAY, J.C., FRY, W.E. Effects of hot and cold temperatures on the survival of oospores produced by United States strains of *Phytophthora infestans*. **American Potato Journal** 74: 315-323. 1997.
- FRY, W.E., APPLE, A.E. e BRUHN, J.A. Evaluation of potato late blight forecasts modified to incorporate host resistance and fungicide weathering. **Phytopathology** 73: 1054-1059. 1983.
- FRY, W.E., GOODWIN, S.B. Re- emergence of potato and tomato late blight in the United States. **Plant Disease** 81: 1349 - 1357, 1997a.
- FRY, W.E., GOODWIN, S.B. Resurgence of the irish potato famine fungus. **BioScience** 47: 363 - 371, 1997.
- FRY, W.E., GOODWIN, S.B., DYER, A.T., MATUSZAK, J.M., DRENT, A., TOOLEY, P.W., SUJKOWSKI, L.S., KOH, Y.J., COHEN, B.A., SPIELMAN, L.J., DEAHL, K.L., INGLIS, D.A., SANDLAN, K.P. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. **Plant Disease** 77: 653 – 661, 1993.
- FRY, W.E., MIZUBUTI, E.S.G. Potato late blight. In: **The Epidemiology of Plant Diseases**. Edited by D. Gareth Jones, 371 - 388, 1998.

- FRY, W.E., BRUCK, R.I., MUNDT, C.C. Retardation of potato late blight epidemics by fungicides with eradicator and protective properties. **Plant Disease Report** 63: 970-974, 1979.
- GOODWIN S.B., COHEN, B.A., FRY, W.E. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 91: 11591 - 11595, 1994.
- GRÜNWALD, N.J., RUBIO-COVARRUBIAS, O.A., FRY, W.E. Potato late-blight management in the Toluca Valley: Forecasts and resistant cultivars. **Plant Disease** 84: 410-416, 2000.
- HARRISON, J.G. Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage - a review. **Plant Pathology** 41: 384-416, 1992.
- HARRISON, J.G., BARKER, H., LOWE, R., REES, E.A. Estimation of amounts of *Phytophthora infestans* mycelium in leaf tissues by enzyme-linked immunosorbent assay. **Plant Pathology** 39: 274-277, 1990.
- HARRISON, J.G., LOWE, R. Effects of humidity and air speed on sporulation of *Phytophthora infestans* on potato leaves. **Plant Pathology** 38: 585-591, 1989.
- HARTILL, W.F.T., YOUNG, K., ALLAN, D.J., HENSHALL, W.R. Effects of temperature and Leaf wetness on the potato late blight. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science** 18: 181-184, 1990.
- HIRST, J.M., STEDMAN, O.J. The epidemiology of *Phytophthora infestans* - II. The source of inoculum. **Annals of Applied Biology** 48: 489 - 517, 1960.
- HYRE, R.A. Progress in forecasting late blight of potato and tomato. **Plant Disease Reporter** 38: 245-253, 1954.
- IBGE – Site : www.ibge.gov.br/ Anuário de produção agrícola do Brasil de 2000.
- JAMES, W. C., CALLBECK, L.C., HODGRON, W.A., SHIH, C.S. Evaluation of a method used to estimate loss in yield of potatoes caused by late blight. **Phytopathology** 61: 1471-1476, 1971.
- JOHNSON, D.A., ALLDREDGE, R., VAKOCH, D. L. Potato late blight forecasting models for the semiarid environment of south-central Washington. **Phytopathology** 86: 480-484, 1996.
- JOHNSON, D.A., CUMMINGS, T.F., HAMM, P.B., ROWE, R.C., MILLER, J.S., THORNTON, R.E., PELTER, G.Q., SORENSEN, E.J. Potato late blight in the Columbia basin: An economic analysis of the 1995 epidemic. **Plant Disease** 81: 103-106, 1997.

- KATO, M., MIZUBUTI, E.S., GOODWIN, S.B., FRY, W.E. Sensitivity to protectant fungicides and pathogen fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. **Phytopathology** 87: 973-978, 1997.
- MALTESE EVOLA, C., CONIGLIARO, G., SHAW, D.S. The development of sporangia of *Phytophthora infestans*. **Mycological Research** 99: 1175-1181, 1995.
- MEDINA, M.V., PLATT, H.W. Viability of oospores of *Phytophthora infestans* under field conditions in northeastern North America. **Canadian Journal of Plant Pathology** 21: 137-143, 1999.
- MELHUS, I.E. Germination and infection with the fungus of the late blight of potato (*Phytophthora infestans*). **Agricultural Experiment Station of the University of Wisconsin Research Bulletin** 37: 1-64, 1915.
- MICHAELIDES, S.C. A simulation model of the fungus *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. **Ecological Modelling** 28: 121-137, 1985.
- MILGROOM, M.G., FRY, W.E. A model for the effects of metalaxyl on potato late blight epidemics. **Phytopathology** 78: 559-565, 1988.
- MILGROOM, M.G., McCULLOCH, C.E., FRY, W.E. Distribution and temporal dynamics of metalaxyl in potato foliage. **Phytopathology** 78: 555-559, 1988.
- MINOGUE, K.P., FRY, W.E. Effect of temperature, relative humidity, and rehydration rate on germination of dried sporangia of *Phytophthora infestans*. **Phytopathology** 71: 1181-1184, 1981.
- MINOGUE, K.P., FRY, W.E. Models for the spread of disease: some experimental results. **Phytopathology** 73: 1173-1176, 1983.
- MIZUBUTI, E.S.G., FRY, W.E. Temperature effects on developmental stages of isolates from three clonal lineages of *Phytophthora infestans*. **Phytopathology** 88: 837-843, 1998.
- NIEDERHAUSER, J.S. *Phytophthora infestans*. The Mexican connection. In LUCAS, J.A., SHATOCK, R.C., SHAW, D.S., COOKE, L.R. (Eds.). **Phytophthora**: Cambridge, Mycological Society by Cambridge University. p.25-45, 1991.
- PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology** 17: 203-222, 1979.

- PAYSOUR, R.E., FRY, W.E. Interplot interference: A model for planning field experiments with aerially disseminated pathogens. **Phytopathology** 73: 1014-1020, 1983.
- PEDERSEN, E.A., MORRALL, R.A.A. Effects of cultivar, leaf wetness duration, temperature, and growth stage on infection and development of Ascochyta blight of lentil. **Phytopathology** 84: 1024-1030, 1994.
- REIS, A., SMART, C.D., MAFFIA, L.A., FRY, W.E., MIZUBUTI, E.S.G. A população de *Phytophthora infestans* no Brasil continua clonal e apresenta alta especialização por hospedeiro. **Fitopatologia Brasileira** 25 (suplemento 217), 2000.
- ROTEM, J., COHEN, Y. Epidemiological patterns of *Phytophthora infestans* under semi-arid conditions. **Phytopathology** 64: 711-714, 1974.
- ROTEM, J., COHEN, Y., BASHI, E. Host and environmental influences on sporulation *in vivo*. **Annual Review of Phytopathology** 16: 83-101. 1978.
- ROTEM, J., COHEN, Y., BASHI, E. Relativity of limiting and optimum inoculum loads, wetting duration, and temperatures for infection by *Phytophthora infestans*. **Phytopathology** 61: 275-278, 1971.
- SATO, N. Effect of sporulating temperature on the limit temperature of indirect germination of the sporangia of *Phytophthora infestans*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, 60: 60-65, 1994a.
- SATO, N. Effect of water temperature on direct germination of the sporangia of *Phytophthora infestans*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, 60: 162-166, 1994b.
- SHTIENBERG, D. Modelling: the basis for rational disease management. **Crop protection** 19: 747-752, 2000.
- SHTIENBERG, D., FRY, W. E. Quantitative analysis of host resistance, fungicide and weather effects on potato early and late blight using computer simulation models. **American Potato Journal** 67: 277-286, 1990.
- SHTIENBERG, D., RAPOSO, R., BERGERON, S.N., LEGARD, D.E., DYER, A.T., FRY, W.E. Incorporation of cultivar resistance in reduced-sprays strategy to suppress early and late blight on potato. **Plant Disease** 78: 23-26, 1994.

- SPIELMAN, L.J., DRENTH, A., DAVIDSE, L.C., SUJKOWSKI, L.S., GU, W., TOOLEY, P.W., FRY, W.E. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? **Plant Pathology** 40: 422-430, 1991.
- SUJKOWSKI, L.S. The influence of temperature on *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. **Journal of Phytopathology** 120: 271-275, 1987.
- WAGGONER, P.E., HORSFALL, J.G. EPIDEM. A simulator of plant disease written for a computer. **Bulletin of the Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven** No. 698: 1969.
- ZADOKS, J.C., SCHEIN, R.D. **Epidemiology and plant disease management**. New York. Oxford University Press, 427 p., 1979.