



## **Estenfiliose na couve coração-de-boi**

**Piedade Maria Dinis Bernardes Bizarro**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Agronómica, Ramo Hortofruticultura e Viticultura

Orientador: Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego

Co-orientador: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

### **Júri:**

PRESIDENTE – Doutora Cristina Maria Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

VOGAIS - Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Licenciado José Agostinho Maurício Charola Saramago Natividade, na qualidade de especialista.

Lisboa, 2012

## **Agradecimentos**

À Investigadora Cecília Rego, orientadora deste trabalho, pela revisão crítica e sobretudo, por todo o incentivo prestado ao longo do mesmo, transmissão de conhecimento, disponibilidade, confiança e conforto que sempre me transmitiu.

Um Grande Obrigada.

À Doutora Mariana Mota pela orientação, pelos ensinamentos e conselhos, pelo apoio incondicional e disponibilidade ao longo da execução deste trabalho, pela indispensável ajuda na correcção do trabalho escrito e finalmente pela constante boa disposição e verdadeira amizade que sempre me concedeu.

Ao Mestre Pedro Reis, pela disponibilidade e ajuda em todos os ensaios efectuados no Instituto Superior de Agronomia.

Ao meu marido e colega de trabalho, pelo apoio, disponibilidade, transmissão de conhecimentos, ajuda nas observações de campo, paciência e consolo nas horas de maior angústia. A ele a minha eterna gratidão.

Aos meus três filhos, Tiago, André e David, pela alegria que trouxeram à minha vida.

À Direcção da Hortapronta e, em especial ao Presidente da Administração, Senhor José Artur, agradeço a compreensão e facilidades concedidas, em permitir que finalizasse este curso.

Aos agricultores da Hortapronta pela simpatia e prontidão com que transmitiram os seus conhecimentos e por sua vez aceitaram a implementação deste ensaio.

Obrigada à minha família, em especial a minha mãe, que sempre me apoiou neste percurso académico. Ao meu pai, à minha irmã, sobrinhas, e cunhado.

Desculpem aqueles que por esquecimento não referi, mas a quem ficarei sempre grata.

## Resumo

Este trabalho pretende contribuir para o diagnóstico da estenfiliose na couve coração-de-boi, clarificando os sintomas associados à doença e a sua evolução na fase final da cultura. Identificou-se o agente causal da doença como *Stemphylium* sp por métodos clássicos de micologia e sequenciação de fragmentos amplificados por PCR do DNA purificado de folhas de couve coração-de-boi com lesões, que revelaram homologias muito significativas com fungos do género *Stemphylium*.

Testou-se a eficácia biológica de seis fungicidas *in vitro* relativamente a *Stemphylium* sp. O crescimento micelial do fungo foi inibido com maior evidência pelos fungicidas piraclostrobina+boscalide, difenoconazol e piraclostrobina+dimetomorfe. Com base nestes resultados, seleccionaram-se a piraclostrobina+boscalide e o difenoconazol para avaliação da inibição da germinação de esporos. Dos fungicidas utilizados, o primeiro apresentou eficácia.

Avaliou-se a doença desde o seu aparecimento num campo em produção, em parcela sujeito ao esquema de tratamentos convencional e em parcela testemunha tratada com água e em condições de armazenamento. A doença manifestou-se uma semana antes da colheita na parcela tratada com água; ao longo do tempo a intensidade da doença foi maior na parcela tratada com fungicidas. O armazenamento à temperatura ambiente conduziu ao aparecimento de maior número de manchas do que na refrigeração.

Palavras-chave: Couve coração-de-boi; eficácia biológica; estenfiliose; fungicidas; PCR; *Stemphylium* sp;

## Abstract

This study aims to contribute to the diagnosis of brown spot of spitzkool cabbages, clarifying symptoms associated with the disease and its evolution in the final stage of field. We identified the causative agent of the disease as *Stemphylium* sp. by classical methods of mycology and sequencing fragments amplified by PCR of DNA purified from cabbage leaves with injuries, which has shown very significant homologies with the fungal genus *Stemphylium*.

We tested the biological efficacy of six fungicides for *Stemphylium* sp. in *in vitro* studies. The mycelial growth was inhibited by more evidence fungicide pyraclostrobin + boscalid, pyraclostrobin and difenoconazole + dimethomorph. Based on these results, were selected pyraclostrobin and boscalid + difenoconazole to assess inhibition of spore germination. The fungicide used the first showed efficacy.

We evaluated the disease from its onset in a field production, in field subjected to conventional treatments scheme and control field treated with water and refrigerated conditions. The disease was detectable one week before the harvest in the field treated with water, but over time disease developed in a stronger manner in the field treated with fungicides. During storage, room temperature conducted to the development of more spots in the cabbages that refrigeration conditions.

## Extended abstract

The culture of cabbage in the counties of Peniche and Lourinhã has been implemented for nearly five decades.

This study focuses on one disease, brown spot, which in recent years has affected the cabbage head of the spitzkool cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). The disease affects the culture in the final stages of development and thus far has been confused with other diseases such as mildew, anthracnose and alternaria.

The commercial consequences of the presence of brown spot in spitzkool cabbage are at the level of product recovery and disposal. For Hortapronta SA brown spot losses have been high over the past year because of complaints / returns made by customers. In this context, the first objective of this work was to facilitate the correct diagnosis of this disease by clarifying the symptoms associated with the disease and understanding the evolution of the disease throughout the culture.

Second, we sought to evaluate the biological efficacy of some fungicides *in vitro* for *Stemphylium* sp. and analyse *in vivo* the incidence and severity of disease, brown spot. The organism in the lesions of the disease was identified by classical methods and by sequencing fragments amplified by PCR of DNA purified from cabbage leaves of commercial spitzkool cabbage with injuries, which has shown very significant homologies with the fungal genus *Stemphylium*.

We evaluated the biological efficacy of six fungicides for *Stemphylium* sp. in *in vitro* conditions with regard to mycelial growth of the fungus; pyraclostrobin + boscalid, difenoconazole and pyraclostrobin + dimethomorph showed high capability of inhibition. Based on the results of the effectiveness of fungicides on mycelial growth, it was decided that only pyraclostrobin + boscalid and difenoconazole would be used to evaluate the inhibition of spores. Of the two fungicides used only pyraclostrobin + boscalid showed effectiveness.

In the observed field, plants in the plot treated with water showed spots earlier than those that had been subjected to fungicide spraying in the conventional programme. However, overtime, disease developed in a stronger manner in the plot treated with fungicides in the conventional programme. After harvest we observed the behavior of spitzkool cabbage plants at room temperature and in controlled condition. This observation was intended to simulate the period corresponding to the transport time delay before the product reaches the customer, verifying disease development after harvest. The symptoms in plants subjected to room temperature developed in a stronger manner than those in the plants at 0-3 ° C

The results obtained in this study allowed the Hortapronta to inform the Directorate General of Food and Veterinary (DGAV, old Directorate General for Agriculture and Rural

Development (DGADR) about the existence of the disease, brown spot of cabbage head and request an application for minor uses of pyraclostrobin + boscalid to fight it based on the results achieved in tests of fungicides.

## Índice

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>II</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>III</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>IV</b>
<b>Extended abstract.....</b>	<b>V</b>
<b>Índice Quadro .....</b>	<b>IX</b>
<b>Índice Figuras .....</b>	<b>X</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. A estenfiliose nas culturas hortícolas .....	3
1.2. Sintomas de estenfiliose em hortícolas.....	4
1.3. Características morfológicas e culturais de <i>Stemphylium</i> .....	5
1.4. Abordagem molecular no estudo dos fungos do género <i>Stemphylium</i> .....	7
1.5. Biologia e disseminação .....	7
1.6. Meios de luta.....	8
1.7. Caracterização dos fungicidas .....	11
1.7.1. Classificação dos fungicidas.....	11
1.7.2. Vias de penetração e modos de acção .....	11
<b>2. Material de Métodos .....</b>	<b>14</b>
2.1. Obtenção de isolados de <i>Stemphylium</i> spp. ....	14
2.2. Caracterização cultural .....	14
2.3. Técnicas moleculares .....	14
2.3.1. Cultura dos isolados para extracção do ADN genómico .....	14
2.3.2. Extracção de ADN genómico.....	15
2.3.3. Quantificação do ADN genómico por espectrofotometria.....	16
2.3.4. Amplificação por PCR de sequências específicas de fungos de couves- coração comerciais, de plantas de viveiro, de sementes e de isolados do fungo .....	16
2.3.4.1. Iniciadores específicos.....	16
2.3.4.2. Reacção PCR .....	16
2.3.4.3 Purificação do produto de PCR e sequenciação.....	16
2.4. Eficácia biológica de fungicidas em relação à estenfiliose.....	17
2.4.1. Inibição do crescimento micelial .....	19
2.4.2 Inibição da germinação de esporos.....	21
2.5. Observação da doença no contexto de produção.....	24
2.5.1. Avaliação de sintomas no campo .....	25
2.5.2. Avaliação de sintomas no armazenamento .....	25
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>26</b>
3.1 Sintomas de estenfiliose em couve.....	26
3.2. Caracterização cultural dos isolados.....	26
3.3 Identificação molecular de fungo presente nas couves comerciais .....	27

3.4 Análises moleculares a plantas de viveiro e sementes .....	27
3.5 Caracterização molecular do fungo em cultura pura.....	28
3.6 Comparação das diferentes sequências obtidas nos diferentes materiais vegetais e na cultura do fungo .....	28
3.7. Eficácia biológica de fungicidas em relação ao isolado ST4.....	31
3.7.1. Inibição do crescimento micelial .....	31
3.7.2. Inibição da germinação de esporos.....	34
3.8. Ensaio no contexto da produção.....	35
3.8.1 Avaliação de sintomas na cultura.....	35
3.8.2 Avaliação de sintomas no armazém .....	37
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>42</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>47</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>49</b>
<b>Anexo III.....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo IV .....</b>	<b>56</b>



## Índice Quadro

Quadro 1. Espécies de estenfiliose referenciadas em culturas hortícolas.....	3
Quadro 2. Principais características dos fungicidas homologados para combate da estenfiliose da cebola e da pereira em Portugal. ....	10
Quadro 3. Principais características dos fungicidas utilizados nos ensaios de eficácia biológica, relativamente a <i>Stemphylium</i> .....	18
Quadro 4. Datas de tratamento, doenças, substâncias activas, produtos comerciais e concentrações utilizadas no ensaio de campo.....	24
Quadro 5. Parâmetros de regressão linear ( $R^2$ e b) e valores de $CE_{50}$ registados nos ensaios <i>in vitro</i> de inibição do crescimento micelial, com 6 fungicidas, para o isolado de <i>Stemphylium</i> sp. em estudo.....	34
Quadro 6. Parâmetros de regressão linear ( $R^2$ e b) e valores de $CE_{50}$ registados nos ensaios <i>in vitro</i> de inibição da germinação de esporos, com 2 fungicidas, para o isolado de <i>Stemphylium</i> sp. em estudo. ....	35
Quadro 7. Resultados da avaliação de sintomas no campo: data de observação e nº de plantas com sintomas.....	36
Quadro 8. Avaliação do número de manchas (ou percentagem de área afectada) na amostra tratada com água e mantida à temperatura ambiente.....	37
Quadro 9. Avaliação do número de manchas na amostra tratada com fungicidas e mantida à temperatura ambiente .....	37
Quadro 10. Avaliação do número de manchas na amostra tratada com água e mantida à temperatura controlada .....	38
Quadro 11. Avaliação do número de manchas na amostra tratada com fungicidas e mantida à temperatura controlada .....	38

## Índice Figuras

Figura 1. Níveis de aceitação propostos para a existência de manchas de estenfiliose nas couves coração-de-boi: a e b, nível 1 e 2, aceitáveis; c e d: nível 3 e 4, não aceitáveis. ....	2
Figura 2. Sintomas de <i>Stemphylium vesicarium</i> em cebola (Nischwitz's, 2012). ....	5
Figura 3. Sintomas de <i>Stemphylium solani</i> em tomateiro (USDA, 2012). ....	5
Figura 4. Sintomas de <i>Stemphylium botryosum</i> em espinafre (Koike, 2001). ....	5
Figura 5. Sintomas de <i>Stemphylium vesicarium</i> em espargo (Hausbeck, 2009).....	5
Figura 6. Ciclo biológico da estenfiliose em couve.(adaptado de Llorente & Montesinos, 2002). ....	8
Figura 7. Esquema da preparação do meio tóxico, contendo fungicidas às concentrações 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01mg/L.....	20
Figura 8. Procedimento utilizado no ensaio da inibição da germinação de esporos de <i>Stemphylium sp.</i> .....	23
Figura 9. a) Couve coração-de-boi infectada com manchas de estenfiliose, b) Manchas de estenfiliose numa folha de couve, c) manchas de estenfiliose ampliada, verifica-se a ligeira depressão d) aspecto de uma couve infectada com estenfiliose. ....	26
Figura 10. Cultura de <i>Stemphylium sp.</i> , em meio de PDA (gelose de batata dextrosada), ao fim de 10 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 25°C, a) face superior; b) face inferior. ....	27
Figura 11. Alinhamento comparativo feito com recurso ao programa ClustalW das sequências <i>comerc</i> (obtida da couve comercial), <i>TP</i> e <i>BP</i> (obtida a partir de plantas dos viveiros Triplanta e Braz planta respectivamente), <i>sem</i> (obtida a partir das sementes), <i>ST4</i> (obtida a partir da cultura pura) e da acessão <i>AB693928</i> armazenada no GenBank.....	30
Figura 12. Eficácia de diferentes concentrações da mistura piraclostrobina + boscalide (Bellis) na inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de <i>Stemphylium sp.</i> . Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). ....	31
Figura 13. Eficácia de diferentes concentrações da mistura piraclostrobina + dimetomorfe (Cabrio Duo), na inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de <i>Stemphylium sp.</i> . Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). ....	32
Figura 14. Eficácia de diferentes concentrações da substância activa difenoconazol (Score), na inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de <i>Stemphylium sp.</i> . Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). ....	32
Figura 15. Eficácia de diferentes concentrações da mistura azoxistrobina + clortalonil (Ortiva Opti), na inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de <i>Stemphylium sp.</i> . Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). ....	33

Figura 16. Eficácia de diferentes concentrações da mistura azoxistrobina + difenoconazol (Ortiva Top), na inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de <i>Stemphylium sp.</i> . Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).....	33
Figura 17. Eficácia de diferentes concentrações da substância activa piraclostrobina + boscalide (Bellis), na inibição da germinação dos esporos (probit) de um isolado de <i>Stemphylium sp.</i> . Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). ....	35
Figura 18. Folhas do repolho onde as manchas de estenfiliose se manifestam.....	36
Figura 19. A caixa da esquerda apresenta couves coração tratadas com fungicidas e conservada pós colheita à temperatura ambiente. A caixa direita apresenta couves coração tratadas com fungicidas e conservadas em temperatura controlada. ....	39

## 1. Introdução

A cultura das couves nos concelhos de Peniche e Lourinhã foi implementada desde há cerca de cinco décadas. A vinha, os cereais, a batata e a pecuária eram os produtos de maior importância económica, por possuírem uma certa capacidade de conservação. Com o incremento das vias de transporte e o acesso à água, pela abertura de furos, a cultura das couves adquiriu importância cada vez maior nesta região. No passado, a couve mais cultivada era a couve – repolho branca, hoje em dia, pouco utilizada. Actualmente e com o aumento do escoamento do produto, outras variedades adquiriram maior destaque, nomeadamente a couve coração-de-boi (Bizarro, 2004).

Este trabalho incide sobre uma doença, a estenfiliose, que nos últimos anos tem vindo a afectar a couve de repolho: couve-coração-de-boi (*Brassica oleracea L. var. capitata*). Os sintomas desta doença aparecem há vários anos, no entanto, só no ano 2006 o departamento agrícola da Hortapronta enviou amostras de couves com sintomas para três laboratórios e colocou a hipótese de se tratar de doença causada por *Stemphylium* sp., hipótese essa que não se aprofundou, uma vez os resultados serem diferentes. A doença afecta a cultura na fase final do desenvolvimento e, até aqui, tem sido confundida com outras doenças tais como míldio, alternariose, antracnose e micose causada por *Mycosphaerella*.

As consequências comerciais da presença de manchas de estenfiliose na couve coração-de-boi surgem ao nível da valorização do produto e do seu escoamento. O destino final da couve coração-de-boi é definido consoante as especificações do cliente; estas especificações são transmitidas através das fichas técnicas que mencionam as características mínimas aceitáveis. Regularmente, o produto que se destina à exportação (países de destino: Alemanha, Inglaterra e Holanda) é de categoria superior, não podendo apresentar manchas de estenfiliose. No mercado nacional, as grandes superfícies são mais exigentes que os mercados abastecedores, no entanto são mais tolerantes que o mercado externo.

Para a Hortapronta, SA os prejuízos com estenfiliose têm sido elevados ao longo dos últimos anos devido às reclamações/devoluções efectuadas pelos clientes. Inicialmente, a única forma de contornar as reclamações/devoluções de uma grande cadeia de distribuição era retirar as folhas externas que apresentavam doença; contudo, ao efectuarmos esta prática, perdíamos a frescura do produto e aumentávamos os custos de embalagem. Em consequência, as vendas nas lojas baixaram e consequentemente a grande cadeia de distribuição só adquiria produto aos fornecedores que apresentassem couves sem manchas de estenfiliose. Confrontados com esta situação, pensou-se que a única forma de ultrapassar a quebra de vendas era propor níveis de aceitação para a existência de

manchas de estenfiliose, visto o produto com um reduzido número de manchas apresentar uma maior frescura do que sem folhas externas. Assim a Hortapronta, propôs quatro níveis de aceitação, nas couves com manchas de estenfiliose, sendo os níveis 1 e 2 aceitáveis e os restantes não aceitáveis (Figura 1). Esta proposta foi aceite e colocada em prática, reduzindo assim o número de reclamações.



Figura 1. Níveis de aceitação propostos para a existência de manchas de estenfiliose nas couves coração-de-boi: a e b, nível 1 e 2, aceitáveis; c e d: nível 3 e 4, não aceitáveis.

Neste contexto, o primeiro objectivo deste trabalho é contribuir para melhor conhecimento desta doença, clarificando os sintomas e o organismo associados à doença, bem como perceber a evolução da doença ao longo da cultura.

Em segundo lugar, pretendeu-se avaliar a eficácia biológica de alguns fungicidas *in vitro* relativamente ao organismo causador da doença e observou-se em campo de produção, sujeito a esquemas de tratamentos convencional, a incidência e severidade da doença, a estenfiliose.

### 1.1. A estenfiliose nas culturas hortícolas

Após uma pesquisa intensa sobre a estenfiliose em couves verificou-se que não existia referências acerca do aparecimento deste fungo em couve coração-de-boi. Por esse motivo efectuou-se uma pesquisa mais ampla em culturas hortícolas. As espécies referenciadas em culturas hortícolas estão mencionadas no Quadro 1.

**Quadro 1.** Espécies de estenfiliose referenciadas em culturas hortícolas.

ESPÉCIE	CULTURAS HORTÍCOLAS	PAÍS	REF. BIBLIOGRÁFICA
<i>Stemphylium solani</i>	alho seco ( <i>Allium sativum</i> )	China	Zheng <i>et al</i> , 2008
	tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Brasil	Reis & Boiteux , 2006
<i>Stemphylium vesicarium</i> (Wallr.) E. Simmons	alho seco ( <i>Allium sativum</i> )	Brasil	Boiteux <i>et al.</i> , 1994
	cebola ( <i>Allium cepa</i> )	Índia	Rao & Pavgi, 1975
		Egipto	Hassan <i>et al.</i> , 2007
		África do Sul	Aveling, 1993
		Portugal	Tomaz & Lima, 1986
	cebolinho chinês ( <i>Allium tuberosum</i> Roth.)	Coreia	Chang <i>et al.</i> , 2000
	espargo ( <i>Asparagus officinalis</i> )	Portugal	Lopes & Simões, 2007
		Nova Zelândia	Menzies <i>et al.</i> , 1992
	tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Índia	Chary <i>et al.</i> , 1980
<i>Stemphylium botryosum</i>	alho seco ( <i>Allium sativum</i> )	Índia	Rao & Pavgi, 1975
	cebola ( <i>Allium cepa</i> )	Espanha	Vásquez & Zumelzú, 1982
	espargo ( <i>Asparagus officinalis</i> )	Japão	Suzui, 1973
	espinafre ( <i>Spinacia olerace</i> )	Califórnia	Koike & Henderson, 2001
	tomateiro ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Austrália do Sul	Samuel, 1930

## 1.2. Sintomas de estenfiliose em hortícolas

Em 2004, as plantas de cebola (*Allium cepa* cv. 'Giza 6') em vários campos comerciais no norte do Egipto (Assiut), apresentaram sintomas de *Stemphylium vesicarium* (Wall.) Simmons nas folhas e na haste floral (Ellis, 1971). Os sintomas manifestam-se através de manchas em depressão, inicialmente amarelas e acastanhadas. Com o evoluir da doença as manchas alongam-se, ficam com contorno irregular ou oval e margens um pouco difusas, tornando-se por vezes rosadas (Figura 2). O centro da mancha vai adquirindo uma coloração acastanhada ou acinzentada, contrastando com o castanho mais escuro das margens ou zonas mais recentemente atacadas. Mais tarde as manchas acabam por coalescer e as folhas adquirem um aspecto necrosado com consistência seca (Lopes & Simões, 2007).

As manchas de estenfiliose causadas por *Stemphylium solani* Weber, ocorrem em praticamente todas as regiões onde se cultiva o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), afectando a cultura em diferentes estádios de desenvolvimento. É de importância relativa, porque os estragos causados dependem da susceptibilidade das cultivares plantadas. Os prejuízos são resultantes da redução da área foliar e do potencial produtivo da porção apical das plantas, uma vez que a incidência é maior em folhas mais novas (Kurosawa & Mussi, 1995). A doença começa a manifestar-se durante a germinação de sementes infectadas: os cotilédones apresentam pontuações negras, irregulares, medindo 2 a 3 mm. Com o desenvolvimento da planta a infecção passa para as folhas mais novas, que ficam cloróticas (Figura 3), secam e caem. O ataque severo provoca intensas necroses nas folhas e das hastes. Algumas manchas apresentam fendilhamento no centro das lesões. Os frutos não apresentam sintomas. É provável que o ataque do fungo seja mais intenso próximo da época da colheita devido à dificuldade em prosseguir com programa de tratamentos com fungicidas e ao desenvolvimento natural das plantas. Lesões nos pecíolos e tecidos tenros do caule só ocorrem sob condições muito favoráveis (Reis & Boiteux, 2006).

No início de 1997, uma nova doença do espinafre foi diagnosticada no Vale Salinas, Monterey County, Califórnia. Os sintomas iniciais eram manchas nas folhas com 2 - 5 mm de diâmetro, circulares e de cor cinzenta esverdeada (Figura 4). Com a evolução da doença as manchas adquiriam maiores dimensões e os tecidos das folhas adquiriam uma textura seca e fina assemelhando-se a uma fitotoxicidade de produtos fitofarmacêuticos (Koike *et al*, Henderson 2001).

Nos espargos os sintomas da estenfiliose começam pelo aparecimento de pequenas pontuações negras nas escamas secas que se encontram na base dos caules principais da planta. Estas pontuações evoluem para manchas circulares ou ovaladas, com um Ø entre 2 a 6 mm e cujo centro adquire uma coloração castanha acinzentada, que por sua vez fica limitada por um halo de cor violácea (Figura 5). A planta fica afectada em diferentes fases,

tornando-se clorótica de início, degenerando em seguida em colorações escuras, finalizando o processo pela perda de gomos (Lopes & Simões, 2007).



Figura 2. Sintomas de *Stemphylium vesicarium* em cebola (Nischwitz's, 2012).



Figura 3. Sintomas de *Stemphylium solani* em tomateiro (USDA, 2012).



Figura 4. Sintomas de *Stemphylium botryosum* em espinafre (Koike, 2001).



Figura 5. Sintomas de *Stemphylium vesicarium* em espargo (Hausbeck, 2009).

### 1.3. Características morfológicas e culturais de *Stemphylium*

O género *Stemphylium* Walbroth (teleomorfo *Pleospora*) inclui cerca de 50 espécies (Kirk *et al.*, 2004) que apresentam conídios muriformes, geralmente pigmentados, que são produzidos por um poro apical do conidióforo. Os conidióforos bem diferenciados podem ter a parede lisa ou rugosa e um intumescimento acompanhado por um escurecimento na zona apical, sendo apenas um conídio produzido na extremidade. Os conídios maduros podem ter uma forma esférica, ovóide, obovóide a largamente elipsoidal. A coloração destes conídios pode variar entre o sub-hialino até variadas tonalidades de castanho (Simmons, 1967).



As colónias de *Stemphylium* têm cor cinzenta, castanha, castanha olivácea ou preto e aspecto aveludado ou cotonoso; apresentam um aspecto difuso, são constituídas por hifas ramificadas e variadamente septadas, que podem estar imersas ou ligeiramente à superfície (Ellis, 1971).

No género *Stemphylium*, as espécies *S. vesicarium* e *S. botryosum* encontram-se referenciadas como causadoras de doenças em hortícolas um pouco por todo o mundo (Quadro 1).

O fungo *S. vesicarium* em meio gelose de batata glucosada (PDA), na obscuridade, desenvolve colónias cinzentas a castanho acinzentado, com micélio aveludado ou hirsuto (Tomaz & Lima, 1986; Chang *et al.*, 2000). O micélio aéreo é filamentoso, esparso e hialino (Llorente & Montesinos, 2006). Os conidióforos, simples ou ocasionalmente ramificados, são erectos ou variadamente curvos e cilíndricos, alargando apicalmente na zona de produção do conídio, com a célula apical intumescida. Apresentam 1- 4 septos e medem de 33 - 47 x 5 - 8 µm. A cor pode variar entre um amarelo acastanhado diluído até um verde acastanhado, escurecendo para um castanho dourado na zona intumescida no ápice. Os conídios, castanho dourados a um verde acastanhados, são oblongos, largamente ovais e às vezes inequilaterais e medem entre 25 - 42 µm de comprimento e entre 12 - 22 µm de largura; apresentam uma relação do comprimento *versus* largura da ordem de 1,5 – 2,7. Ao nível da coloração, podem variar desde um castanho dourado, médio a diluído, a um verde acastanhado (Simmons, 1969).

O fungo *S. botryosum*, em PDA apresenta de início um micélio branco, desenvolvendo mais tarde, pigmentos escuros esverdeados. Na face inferior da colónia, o fungo é castanho-escuro ou negro (Smith, 1940). Tem micélio septado com cerca de 5 µm de diâmetro que dá origem a um estroma pulvinado (convexo) ou a grupos de células, de onde surgem cerca de 10 a 15 conidióforos. Os conidióforos podem ser erectos ou variadamente decumbentes; Apresentam uma forma cilíndrica e lisa, com 1-7 septos e dimensões na ordem dos 20 - 72 x 4 - 6 µm. Os conídios podem ser oblongos, largamente ovóides a subdoliformes. Apresentam 1 - 3 septos transversais com constrição ao nível do septo mediano e raramente nos outros septos, e 1 - 3 (-4) septos longitudinais, que podem ser completos ou quase completos. Têm um poro basal e as paredes conspícuas mas eventualmente verrugosas ou densamente equinuladas (Simmons, 1967; 1985). Os conídios apresentam colorações que podem variar desde um diluído a um forte verde acastanhado e medem em média entre 33 - 35 µm de comprimento e entre 24 - 26 µm de largura. A relação média entre o comprimento e a largura é da ordem dos 1,0 – 1,5, observando-se que muitos dos esporos são quase tão largos quanto longos (Simmons, 1985).

Apesar das semelhanças morfológicas e biométricas que estas duas espécies de fungos apresentam, Simmons (1969) apontou os principais aspectos morfológicos distintivos ao

nível do conidióforos, dos conídios e da relação comprimento *versus* largura dos conídios. Porém, permanece difícil a distinção das espécies entre si com base nas características morfológicas e culturais.

#### **1.4. Abordagem molecular no estudo dos fungos do género *Stemphylium***

A par do estudo de características culturais, têm sido desenvolvidas ferramentas moleculares que contribuem para a identificação de fungos ao nível do género, espécie e, por vezes, até estirpe. A identificação de sequências genéticas características dos organismos e que permitem distingui-los de organismos semelhantes tem vindo a ser progressivamente mais utilizada para complementar os chamados estudos clássicos. As sequências mais utilizadas para estes estudos são sequências de duas regiões génicas de ADN ribossomal, a ITS1 e a ITS2 (espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal, “Internal Transcribed Spacer Regions of ribossomal DNA”), de genes codificadores de  $\beta$ -tubulina ou de *gpd* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, “eglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”), ou o EF1 (factor de alongamento 1 $\alpha$ , “elongation factor 1 $\alpha$ ”). Estudos já realizados envolvendo fungos do género *Stemphylium* apresentam os isolados de *S. herbarum*, *S. vesicarium* e *S. alfalfae* agrupados com um maior nível de semelhança e *S. botryosum* formando um único grupo (Câmara *et al.*, 2002). No primeiro grupo enquadram-se também três novas espécies descritas por Pei *et al.* (2011) com base em caracteres morfológicos e análise filogenética combinada de dados provenientes das regiões ITS e fragmentos *gpd*, *S. luffae*, isolada de *Luffa cylindrica*, *S. lycii*, isolada de *Lycium chinense* e *S. cucumis* isolada de *Cucumis melo*. Os fragmentos de sequências de ITS apresentam menor poder discriminante ao nível da estirpe mas são muito conservados ao nível do género/espécie.

#### **1.5. Biologia e disseminação**

Os fungos do género *Stemphylium* hibernam sob a forma de pseudotecas nas folhas caídas no solo. Ao aparecimento das primeiras folhas, com a maturação das pseudotecas, ocorre a libertação de ascósporos, que vão infectar e colonizar folhas, originando as contaminações primárias. Daqui resulta a formação de conídios, responsáveis pelas contaminações secundárias (Llorente & Montesinos, 2002). Na Figura 6 apresenta-se uma adaptação para couve do ciclo biológico da estenfiliose.

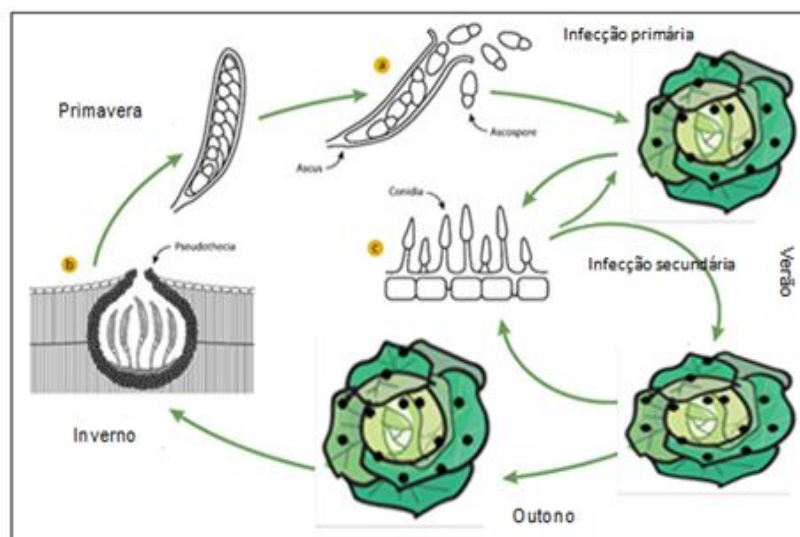


Figura 6. Ciclo biológico da estenfiliose em couve.(adaptado de Llorente & Montesinos, 2002).

Estudo realizados em peras permitiram concluir que, para que ocorra a germinação, os conídios necessitam de períodos de humectação de 4 a 5 horas. Os esporos germinam facilmente na presença de água e a temperatura elevada. O fungo desenvolve-se rapidamente na planta, estimando-se que o período de incubação (aparecimento de sintomas) seja de 48 a 96 horas. Nas folhas surgem manchas castanhas, que podem ser colonizadas posteriormente por *Alternaria sp*, acelerando a sua decomposição (Llorente & Montesinos, 2002).

O principal agente de disseminação do fungo é o vento, embora também possa ocorrer disseminação através de sementes infectadas e por insectos. Por norma, as folhas infectadas são as que estão voltadas para os ventos predominantes (Hernández, 1999).

Noutros países, a doença desenvolve-se com temperaturas óptimas entre os 24 e 28°C (Prados-Ligero *et al.* 2003). Em Portugal, na região Oeste, a doença desenvolve-se na cultura das couves com temperaturas entre 1 e 25°C. Condições de humidade elevada favorecem o desenvolvimento da doença. O orvalho, a precipitação e a água de rega (aspersão) favorecem o desenvolvimento da doença (Llorente & Montesinos, 2002). A doença desenvolve-se em todos os tipos de solo, com pH variáveis.

## 1.6. Meios de luta

Relativamente à estenfiliose, as estratégias de protecção a adoptar são essencialmente de carácter preventivo, especialmente no que se refere ao aparecimento e controlo das infecções primárias.

Os meios de luta culturais têm como objectivo reduzir e dificultar a sobrevivência do patógeno através da criação de condições desfavoráveis à ocorrência de infecção e ao seu desenvolvimento.

A utilização de sementes sãs é de primordial importância para evitar o aparecimento da doença.

Em viveiro, a detecção precoce de estenfiliose é da maior importância pois irá garantir a posterior viabilidade da cultura no campo. No campo, os meios de luta cultural preconizados para a redução do inoculo associado a micoses são de diversas ordens, nomeadamente:

- efectuar uma adubação racional;
- evitar solos húmidos e mal drenados;
- enterrar as folhas atacadas e aplicar produtos que favoreçam a decomposição das folhas como por exemplo a ureia;
- plantar as plantas em compassos mais alargados de modo a favorecer o arejamento;
- efectuar rotações de culturas e
- evitar rega por aspersão e optar por rega gota a gota.

Quanto aos meios de luta química, não existe fungicidas homologados para combater esta doença, dado que a estenfiliose da couve não está referenciada em Portugal.

Para a cultura da cebola em Portugal a única substância activa homologada é azoxistrobina (DGARD, 2012). Na Califórnia, as substâncias activas utilizadas para o controlo do *Stemphylium vesicarium* são: fenamidona, piraclostrobina, clortalonil e mancozebe. Para o controlo de estenfiliose da pereira em Portugal, quando as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento da doença utiliza-se os fungicidas tirame, o cresoxime-metilo, tebuconazol e trifloxistrobina. No Quadro 2 apresentam-se as principais características destes fungicidas.

**Quadro 2.** Principais características dos fungicidas homologados para combate da estenfiliose da cebola e da pereira em Portugal.

Substância activa	Produto Comercial	Empresa	Grupo químico	Modo de acção	Concentração da s.a	Tipo de formulação (código internacional)	Classificação toxicológica e ambiental
azoxistrobina	Ortiva	Syngenta	estrobilurina	sistémico de mobilidade translaminar e lateral	250 g/l ou 23,1% (p/p)	Suspensão concentrada (SC)	Irritante e Perigoso para o ambiente (Xi; N)
tirame	Fernide	Sip_Quimagro	ditiocarbamato	Contacto	80% (p/p)	Pó molhável (WP)	Nocivo e Perigoso para o ambiente (Xn; N)
cresoxime-metilo	Stroby	BASF	estrobilurina	sistémico de mobilidade translaminar e lateral	50%	Grânulos dispersíveis em água (WG)	Nocivo e Perigoso para o ambiente (Xn; N)
tebuconazol	Libero top	Bayer	triazol	sistémico de mobilidade translaminar e lateral	25%	Grânulos dispersíveis em água (WG)	Nocivo e Perigoso para o ambiente (Xn; N)
trifloxistrobina	Flint	Bayer	estrobilurina	sistémico de mobilidade translaminar e lateral	50%	Grânulos dispersíveis em água (WG)	Irritante e Perigoso para o ambiente (Xi; N)

## **1.7. Caracterização dos fungicidas**

### **1.7.1. Classificação dos fungicidas**

Os fungicidas utilizados na protecção das culturas podem ser divididos em dois grandes grupos, o dos produtos de contacto que, basicamente, ficam perto do local onde foram depositados e o grupo dos sistémicos, que penetram no interior da planta, através das raízes ou das folhas, e são transportados dentro da mesma pela corrente floémica ou xilémica (Croxall *et al.*, 1964).

Um fungicida que actue por contacto pode parar o crescimento do micélio de um fungo e limitar a produção de estruturas de reprodução. Tal acção retarda ou impede os patógenos de se disseminarem para plantas sãs, próximo da infectada, embora a maioria dos fungicidas não sistémicos seja mais eficiente em tratamento preventivos. Mesmo assim, têm a desvantagem de serem facilmente arrastados das superfícies tratadas, por acção da chuva, de não oferecerem protecção aos crescimentos da planta iniciados após o tratamento, e de serem pouco específicos (Silva Fernandes, 1990).

Nos fungicidas, o termo sistémico não implica necessariamente absorção altamente eficiente através das folhas. Alguns fungicidas sistémicos podem penetrar em certa extensão nas folhas onde são aplicados. Depois podem translocar-se em direcção às margens das folhas, mas há muito pouca translocação para fora da folha tratada. Portanto, a acção não poderá ser considerada como verdadeiramente sistémica (Moore, 1967).

### **1.7.2. Vias de penetração e modos de acção**

As paredes das células dos fungos possuem cargas negativas e são compostas por lípidos, fibras de quitina, proteínas e polissacáridos.. Provavelmente, a maioria dos fungicidas não catiónicos passa rapidamente através da parede celular, sendo mais difícil atravessar a membrana de lipoproteína que dela faz parte. Em algumas espécies de fungos as paredes dos esporos podem ser menos permeáveis e mais rígidas do que as células do micélio, sendo os lípidos componentes importantes, que provavelmente constituem uma barreira física à penetração. Apesar destas características, normalmente durante a formação do tubo germinativo, os esporos tornam-se mais susceptíveis (Silva Fernandes, 1990).

As partículas com carga têm dificuldade na penetração da membrana plasmática, de constituição lipoproteica, sendo a entrada destas partículas no citoplasma facilitada pela sua conversão temporária em forma não iónica. Portanto, os ácidos e as bases fracas apenas atravessam a membrana plasmática na forma não dissociada, e os catiões fracos podem formar quelatos metálicos. Dentro da célula, os fungicidas são provavelmente transportados no interior da mesma, através da corrente protoplasmática. A distribuição interna, entre os

diversos componentes celulares, varia com a espécie dos fungos e com o tipo de fungicidas (Silva Fernandes, 1990).

O processo de entrada dos fungicidas no interior da célula é rápido, por vezes observa-se em pouco tempo a remoção total do tóxico diluído na solução circundante.

Em contraste com a rapidez com que os fungicidas entram nos fungos, a velocidade de saída é muito inferior, tendo-se observado que a ocorrência deste processo é gradual (Silva Fernandes, 1990).

De seguida, apresentam-se as substâncias activas estudadas neste trabalho, nas respectivas famílias químicas e de acordo com os respectivos modos de acção. Actualmente não existe em Portugal nenhuma substância activa homologada para estenfilose na cultura das couves. Por isso, a selecção dos fungicidas utilizados neste estudo não seguiu qualquer critério oficial. Apenas se seguiu como princípio a eficácia de fungicidas homologados para esta doença noutras culturas hortícolas.

### **Substancias activas homologados para o combate de estenfilose noutras culturas azoxistrobina**

Família química: estrobilurinas

A azoxistrobina afecta o processo de respiração mitocondrial, inibindo a redução do citocromo b, ao qual se liga num local específico. Tem uma acção duradora e controla um largo espectro de fungos patogénicos (Godet *et al*, 1997). Este fungicida é capaz de controlar a alternariose das couves. É um produto selectivo relativamente à maioria dos auxiliares.

### **boscalide**

Família química: estrobilurinas

O boscalide inibe a respiração do fungo, actuando ao nível da cadeia de transporte de electrões (na mitocôndria), sobre o complexo succinato desidrogenase (SDH), também conhecido por Complexo II, do ciclo de Krebs. O complexo II, para além de produzir electrões para a obtenção de energia, também integra uma estrutura essencial onde os componentes do ciclo de Krebs participam na construção de aminoácidos e lípidos.

O boscalide é a primeira molécula que utiliza esta dupla função para controlar um número importante de fungos. Ao actuar num local diferente na cadeia de transporte de electrões, os riscos de resistência cruzada com outras estrobilurinas estão minimizados (BASF, 2012).

### **difenoconazol**

Família química: triazol

O difenoconazol inibe a biossíntese da ergosterol, ao impedir a desmetilação dos esteróis. Este modo de acção interfere com as funções da membrana celular e com o crescimento micelial do fungo, mas pouco influencia a germinação dos conídios e o desenvolvimento dos haustórios. O perfil ecotoxicológico desta substância activa é favorável, controla eficazmente diversas espécies de fungos, entre elas a *Alternaria* spp., na cultura das couves.(Tomlin, 1994).

### **dimetomorfe**

Família química: morfolina

O dimetomorfe é um produto derivado do ácido cinâmico (grupo CAA) dotado de acção preventiva, curativa sobre as infecções do míldio na sua fase inicial e anti-esporulante, que aplicado em pulverização foliar penetra através da cutícula difundindo-se no interior da folha. É eficaz sobre todos os estádios de desenvolvimento do míldio, excepto na formação, libertação e mobilidade dos zoósporos (BASF, 2012).

### **piraclostrobina**

Família química: estrobilurinas

A piraclostrobina é uma substância activa pertencente ao grupo químico das estrobilurinas (inibidor da respiração em Qo->QoI), com mobilidade translaminar, dotada de acção preventiva e curativa, através da inibição da germinação dos esporos e desenvolvimento do micélio dos fungos. Inibe o transporte de electrões nas mitocôndrias das células dos fungos, inibindo a formação de ATP, essencial nos processos metabólicos dos fungos (BASF, 2012).



## **2. Material de Métodos**

### **2.1. Obtenção de isolados de *Stemphylium* spp.**

A prospecção da doença foi efectuada em diversos campos de cultura localizados no concelho de Peniche, região Oeste.

O isolamento microbiológico foi feito pelo seguinte método: após a observação cuidada do material vegetal doente procedeu-se à sua fragmentação em pequenos segmentos e posterior desinfecção superficial, por imersão durante um minuto numa solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) seguida de uma lavagem em água destilada e esterilizada e secagem em papel de filtro esterilizado. Utilizou-se o método de isolamento a partir de tecido infectado, em placas de Petri contendo 15 ml de gelose de batata glucosada (PDA) adicionada de cloranfenicol (250 mg/litro). A incubação decorreu em estufa, à temperatura de  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , na obscuridade, até se verificar crescimento micelial (Agrios, 2005)

Decorrido o período de incubação, seleccionaram-se as culturas com características culturais idênticas às descritas para fungos do género *Stemphylium*. Estas foram então purificadas, pelo método de hifa única e mantidas em tubo inclinado, em micoteca, tendo-se obtido um conjunto de quatro isolados de *Stemphylium* sp. (Lima, 1989). Os estudos de fungicidas realizados incidiram apenas sobre um isolado que se obteve por isolamento microbiológico a partir de folhas de couve com sintomas da doença.

### **2.2. Caracterização cultural**

A caracterização dos isolados foi efectuada para crescimentos obtidos a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , ao fim de dez dias na obscuridade. Findo o período de incubação, observaram-se as características culturais (frente e verso): aspecto cultural, densidade da colónia, coloração (Rayner, 1970), frente de crescimento, zonagem e aspecto à transparência.

### **2.3. Técnicas moleculares**

#### **2.3.1. Cultura dos isolados para extracção do DNA genómico**

O isolado foi repicado para placas de Petri contendo PDA, de forma a promover o crescimento micelial. Após dez dias retirou-se, por raspagem, o micélio para balões Erlenmeyer com 50 mL de capacidade, contendo 25 mL de meio líquido de batata glucosada (PDB, Difco). Após inoculação, os balões foram mantidos a uma temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , na obscuridade, sob agitação recíproca e contínua (70 lances/minuto) (agitador Edmund Brühl) durante 4-5 dias.

### 2.3.2. Extracção de DNA genómico

A metodologia usada para a extracção de DNA genómico seguiu o procedimento de Doyle & Doyle (1990) com pequenas alterações. Para a extracção de ADN a partir de material vegetal (sementes, folhas de plantas de viveiro e de plantas adultas), para cada amostra moeu-se um pedaço de folha (aproximadamente 500 mg) ou sementes (100 mg) em almofariz esterilizado com auxílio de azoto líquido e transferiu-se o pó para um microtubo contendo 1 ml de tampão de extracção 2xCTAB e 1 % de  $\beta$ -ME, previamente aquecido a 65°C. Procedeu-se a uma incubação a 65°C durante 30 minutos, arrefecendo-se o extracto depois à temperatura ambiente. Realizou-se uma extracção de proteínas com um volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v), agitando-se os tubos manualmente e centrifugando a 13000 rpm durante dez minutos à temperatura ambiente. Recuperou-se o sobrenadante para novos microtubos e fez-se uma digestão com RNase (concentração final 10  $\mu$ g/ml), durante 30 min a 37° C. Repetiu-se a extracção com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) nas condições mencionadas anteriormente.

Adicionou-se  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  pH 5,2 3M (um décimo do volume de extracto) e precipitou-se o ADN com um volume de isopropanol, invertendo-se o microtubo suavemente até se observar a precipitação do DNA genómico. Recolheu-se o ADN para um novo microtubo, já com tampão de lavagem (etanol 76% + 10 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ) e procedeu-se à lavagem com agitação à temperatura ambiente durante pelo menos 2 horas. Recuperou-se o ADN por centrifugação durante dois minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente, drenou-se a solução de lavagem e deixou-se o precipitado secar ao ar. O ADN genómico foi dissolvido em TE, num volume entre 50  $\mu$ l a 100  $\mu$ l e armazenado a 4° C.

Para a extracção de ADN do isolado em cultura líquida pura, após os 4 a 5 dias de crescimento micelial, filtrou-se o meio de cultura através de um funil forrado com papel de filtro esterilizado e o micélio recuperado foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada, rolando-se seguidamente em papel de filtro esterilizado até não se ver manchas de humidade no papel. Moeu-se o micélio (aproximadamente 1 g) em almofariz esterilizado com auxílio de azoto líquido e transferiu-se o micélio em pó para microtubos contendo 1 ml de tampão de extracção 2xCTAB e 10  $\mu$ l de  $\beta$ -ME (300 mg/tubo), previamente aquecidos a 65°C, incubando-se o extracto durante 2 horas a 65°C. O restante procedimento foi igual ao referido para o material vegetal.

Para os isolados mantidos em tubo inclinado, recuperou-se o micélio por liquefacção do meio e procedeu-se como descrito.

### **2.3.3. Quantificação do DNA genómico por espectrofotometria**

Determinou-se a concentração do DNA genómico, medindo-se a A260nm de cada amostra (diluída 1:50) num espectrofotómetro GeneQuant<sup>pro</sup> RNA/DNA calculator, tendo em atenção que uma unidade de A260 corresponde a 50 µg/ml de ADN.

### **2.3.4. Amplificação por PCR de sequências específicas de fungos de couves-coração comerciais, de plantas de viveiro, de sementes e de isolados do fungo**

#### **2.3.4.1. Iniciadores específicos**

Recorreu-se a iniciadores específicos para fungos do género *Stemphylium* anteriormente desenhados pelo grupo de trabalho. Foram eles o STEMITS-F (5' TGTCTTTTGCGCACTTCTTG 3') e o STEMITS-R (5' ATGCTCAACCAAGGCTGATT 3' ) (Thompson *et al.*, 1997),.

#### **2.3.4.2. Reacção PCR**

As reacções de amplificação por PCR foram realizadas num volume total de 25 µl contendo 50 a 100 ng de DNA genómico, Tampão *Dream Taq* 1x da Fermentas, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer e 0,5 U/reacção de *Dream Taq* DNA polimerase. A reacção de PCR foi incubada num termociclador Biometra UNO, programado para um passo inicial de desnaturação de 3 min a 94°C, 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C, e um passo final de extensão de 5 min a 72°C. Os produtos amplificados foram analisados por electroforese em gel de 2% agarose em 1 x TAE (Sambrook *et al.*, 1989), preparados com o reagente fluorescente *Greensafe* (2,5µL/100mL de gel) da nzytech® que permite visualizar o ADN corado sobre uma lâmpada de luz UV, já que se liga à molécula. Os géis foram então visualizados sob luz ultravioleta. Optimizadas as quantidades de ADN a utilizar na reacção de amplificação, repetiram-se as reacções nas condições óptimas num volume final de 100 µl.

#### **2.3.4.3 Purificação do produto de PCR e sequenciação**

Os produtos de PCR das reacções de 100 µl foram purificados recorrendo ao kit QIAGEN PCR Purification Kit (QIAGEN), eluindo-se o DNA em 30 µl. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados com os iniciadores específicos (ambas as cadeias) pela empresa STABVida (Caparica).

A análise de sequências obtidas foi realizada com recurso ao programa Chromas (<http://www.techneysium.com.au/chromas.html>) para visualização das curvas de sequenciação, ao programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para análise de homologias com sequências já armazenadas em bases de dados e ao programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para comparação de sequências.

#### **2.4. Eficácia biológica de fungicidas em relação à estenfiliose**

A eficácia biológica dos fungicidas usados neste estudo foi avaliada através de ensaios biológicos, conduzidos em laboratório (*in vitro*). O objectivo foi seleccionar fungicidas eficazes no combate ao patógeno responsável pela estenfiliose na couve coração-de boi. Nos ensaios de eficácia biológica utilizou-se isolado st4 de *Stemphylium* que se encontrava em tubo de ensaio contendo PDA inclinado, à temperatura de  $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e sob condições de obscuridade. A cultura usada no ensaio foi obtida por repicagem para placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo 15ml de PDA, após incubação em estufa, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , em condições de obscuridade, durante 10 dias. As características dos fungicidas testados nos ensaios encontram-se reunidas no Quadro 3.

**Quadro 3.** Principais características dos fungicidas utilizados nos ensaios de eficácia biológica, relativamente a *Stemphylium*.

Substância activa	Produto Comercial	Empresa	Grupo químico	Modo de acção	Concentração da s.a	Tipo de formulação (código internacional)	Classificação toxicológica e ambiental
azoxistrobina	Ortiva	Syngenta	estrobilurina	sistémico de mobilidade translaminar e lateral	250 g/l ou 23,1% (p/p)	Suspensão concentrada (SC)	Irritante e Perigoso para o ambiente (Xi; N)
difenoconazol	Score 250 EC	Syngenta	triazol	sistémico	250g L <sup>-1</sup> ou 23,6% (p/p)	Concentrado por emulsão(EC)	Nocivo e Perigoso para o ambiente (Xn; N)
azoxistrobina + clortalonil	Ortiva Opti <sup>1</sup>	Syngenta	estrobilurina + nitrilo	sistémico de mobilidade translaminar e lateral + contacto	-----	-----	-----
azoxistrobina + difenoconazol	Ortiva Top	Syngenta	estrobilurina + triazol	sistémico de mobilidade translaminar e lateral + sistémico	200g/l+125g/l	Suspensão concentrada (SC)	Irritante e Perigoso para o ambiente (Xi; N)
piraclostrobina + boscalide	BASF 51607F (Bellis)	BASF	estrobilurina + carboxamida	sistémico com acção preventiva e curativa	25,2%+12,8%	Grânulos dispersíveis em água WG	Nocivo e Perigoso para o ambiente (Xn; N)
piraclostrobina + dimetomorfe	BASF 53601F (Cabrio Duo)	BASF	estrobilurina + morfolina	sistémico com acção preventiva, curativa e erradicante	72g/l+40g/l	Concentrado por emulsão (EC)	Nocivo e Perigoso para o ambiente (Xn; N)

<sup>1</sup> - Produto não homologado em Portugal

### 2.4.1. Inibição do crescimento micelial

No estudo da inibição do crescimento micelial de *Stemphylium* foi utilizada a técnica do meio tóxico (Tomaz, 1958). Esta técnica baseia-se na existência de uma relação linear entre o crescimento das colónias do fungo e o tempo. A avaliação da eficácia do fungicida faz-se comparando as medidas do crescimento do fungo em meio gelosado contendo fungicidas e as medidas de crescimento do fungo em meio gelosado, na ausência de fungicida.

O meio de cultura seleccionado para a execução dos ensaios *in vitro* foi o PDA, por ser favorável ao crescimento micelial do fungo (Montesinos & Vilardell, 1992). Testou-se um fungicida por ensaio e, em cada um deles, utilizaram-se seis concentrações diferentes de fungicidas, reportadas à concentração de substância activa, mais uma testemunha em que não foi adicionado fungicida ao meio de cultura. As concentrações escolhidas foram as seguintes: 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01mg/L.

Preparou-se uma suspensão-mãe de fungicida, com uma concentração equivalente a 10 mg de substância activa por L, num balão volumétrico de 1000 mL. Seguidamente, através do método das diluições sucessivas, obtiveram-se as seis concentrações já referidas. Cada uma das diluições de fungicidas foi adicionada e homogeneizada ao meio de cultura esterilizado e previamente arrefecido em banho-maria, à temperatura de 45°C - 50°C (Figura 7). O meio gelosado foi preparado de modo a que se obtivessem as concentrações de fungicidas pretendidas e que a concentração de PDA no meio fosse sempre a mesma, 3,9 g por 100 mL. Posteriormente, para cada concentração de fungicida a mistura foi distribuída assepticamente por seis placas de Petri de poliestireno, à razão de 15 mL por placa. Nas placas testemunha foi utilizada água destilada e esterilizada, em substituição das diluições de fungicidas, e a concentração de PDA no meio foi também de 3,9 g por 100 mL. Após a solidificação do meio, procedeu-se à inoculação das placas com os isolados de *Stemphylium*, colocando um disco micelial de 3mm de diâmetro no centro de cada uma. Os discos foram retirados da periferia de culturas com oito dias de crescimento em estufa de incubação regulada para a temperatura de 25°C± 1°C, em condições de obscuridade. As placas, após inoculação, foram colocadas sob condições de obscuridade, à temperatura de 25°C, durante 10 dias. Os ensaios realizaram-se em duas séries, com intervalo de 15 dias, para minimizar qualquer erro ou variação de sensibilidade do fungo aos produtos ensaiados. Ao fim de 10 dias de incubação, calculou-se a percentagem de inibição do crescimento micelial (I) através da fórmula de Bateman e Vicent,  $I = 100 \times (C-T) / C$ , em que C representa o crescimento micelial da testemunha, em mm e o T, o crescimento micelial nas placas tratadas, em mm (Horsfall, 1956).

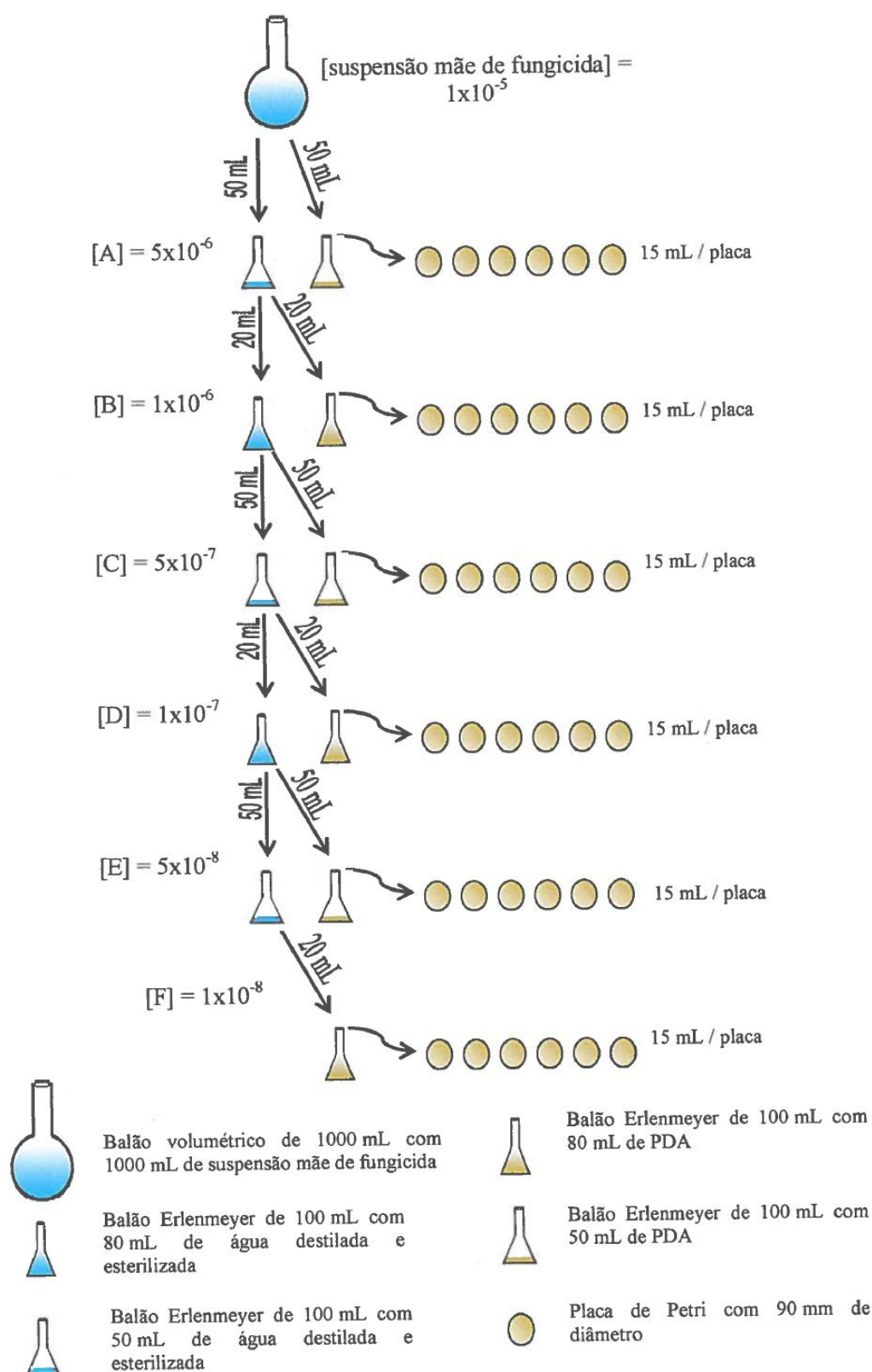


Figura 7. Esquema da preparação do meio tóxico, contendo fungicidas às concentrações 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01mg/L.

Na análise dos valores da percentagem da inibição do crescimento micelial, utilizou-se a transformação “probit”. Os “probits” são unidades de probabilidade dispostas numa escala de 10, imaginada por Bliss (1934), derivadas de “desvios equivalentes normais”, tendo por

unidade o desvio padrão (Shepard, 1951). Os valores transformados colocados em relação com o logaritmo da concentração de fungicidas, permitem transformar numa recta, a curva sigmóide que originalmente relaciona a percentagem de inibição com a concentração. Para evitar valores negativos de logaritmos, multiplicaram-se os valores das concentrações por um factor constante ( $1 \times 10^8$ ). Assim, consegue-se determinar a recta de regressão, isto é a relação linear existente entre as transformadas das concentrações do fungicida ensaiado e das percentagens de inibição obtidas. Foi utilizado o programa EXCEL (XP) na análise de regressão linear e sua representação gráfica. Para cada recta de regressão foram determinados o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), a equação da recta ( $Y = a + bX$ ), em que  $b$  representa o declive da mesma, e o valor de  $CE_{50}$ .

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é uma medida de precisão da recta de regressão e, quanto mais próximo o seu valor se encontrar da unidade, melhor adaptados estão os resultados do ensaio a este modelo. Os valores de  $CE_{50}$  e de  $b$  permitem comparar os fungicidas usados, sendo o primeiro utilizado para comparação da eficácia, enquanto que o segundo se emprega para comparar o modo de acção do fungicida (Tomaz, 1958). O valor  $CE_{50}$  é a abcissa do ponto que tem por ordenada o valor de 50% de inibição, ou seja, “probit” igual a 5. O declive da recta de regressão ( $b$ ) é uma estimativa de  $1/\sigma$ , sendo  $\sigma$  o desvio padrão. Mede-se pelo aumento de unidades em ordenadas, “probits”, correspondentes ao aumento de uma unidade em abcissas, logaritmo da concentração (Finney, 1951). Declives baixos mostram uma escassa variação de susceptibilidade do indivíduo, enquanto declives elevados evidenciam uma grande variação de susceptibilidade. Por tal facto, o declive da recta é considerado como um indicador do mecanismo da susceptibilidade do fungo ao fungicida. Porém, a simples circunstância de ser igual para dois produtos, quando ensaiados com o mesmo fungo, não permite concluir que estes tenham um mecanismo de acção idêntico (Horsfall, 1956).

#### **2.4.2 Inibição da germinação de esporos**

A técnica utilizada na realização deste ensaio foi baseada no método das diluições sucessivas em tubos de ensaio, descrito por Tomaz (1958), tendo-se introduzido algumas alterações com base em ensaios elaborados por Olaya & Koller (1999).

Os esporos são incorporados em várias diluições do fungicida. Antes da aplicação da técnica foi necessário fazer alguns ensaios para a determinação do período de incubação. Considerou-se que a germinação era atingida quando pelo menos 80% dos esporos apresentavam emissão do tubo germinativo (Olaya & Koller, 1999). Verificou-se que o isolado de *Stemphylium* atingia cerca de 80% da germinação ao fim de duas horas. Para



estudar a inibição da germinação de esporos, as gotas da suspensão de fungicida contendo os esporos são então colocados em placas de poliestireno e incubadas a temperatura de 25°C na obscuridade, por um período de duas horas. Observam-se depois as percentagens de esporos germinados e não germinados

Foi testado um fungicida por ensaio e as concentrações de fungicidas, reportadas à concentração de substância activa, foram iguais às referidas para a inibição do crescimento micelial, mais uma testemunha. Para minimizar qualquer erro ou variação de sensibilidade do fungo aos produtos, os ensaios realizaram-se em duas séries, com um intervalo de 15 dias, tal como no ensaio de inibição de crescimento micelial.

As concentrações escolhidas foram as seguintes: 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01mg/L. Na preparação das concentrações referidas, utilizou-se o método das suspensões-diluições. Para o efeito, foi preparada uma suspensão mãe com o dobro da concentração pretendida ( $1 \times 10^{-5}$  g de substância activa por L), bem como as restantes concentrações, visto posteriormente haver uma diluição de 1:2, causada pela adição da suspensão conidial (150 µL da diluição de fungicida mais 150 µL da suspensão conidial, o que perfaz um volume total de 300 µL).

Para obtenção das suspensões de esporos, referentes ao isolado de *Stemphylium* em estudo, utilizaram-se culturas com cerca de 10-12 dias de idade, que haviam crescido em placas de Petri (90 mm de diâmetro) com 15 mL de PDA, à temperatura de 25°C, na obscuridade. A cada uma das culturas adicionaram-se 10 mL de água destilada esterilizada e, com o auxílio de uma ansa de plástico, procedeu-se à raspagem do micélio, para desprendimento dos esporos (Montesinos & Vilardell, 1992). A suspensão obtida foi transferida para um tubo de ensaio esterilizado, agitada em Vortex, para efectivar a libertação dos conídios e filtrada (filtro para esporos de malha nº 1) para eliminar restos de micélio. Por fim, fizeram-se diluições sucessivas das suspensões conidiais, para que contivessem 100 a 120 esporos por campo microscópico, à ampliação de 160X. Retirou-se 150 µL de cada uma das suspensões conidiais obtidas, que se adicionou-se a 150 µL de cada concentração de fungicida, contidos em tubos de Eppendorf de 1 mL, perfazendo um volume total de 300 µL. Todos os tubos foram agitados em Vortex, para a mistura ficar homogénea e, de cada um, retiraram-se quatro gotas de 30 µL, que foram colocadas em zonas diametralmente opostas na superfície de poliestireno de placas de Petri, com 90 mm de diâmetro. Sobre cada gota, foi colocada uma lamela de vidro de 22x22 mm. Na testemunha foi utilizada água destilada esterilizada, em substituição das diluições de fungicidas. Optou-se por placas de poliestireno e não por lâminas de vidro, como recomendado por Tomaz (1958), visto que as propriedades físicas do poliestireno são bastantes similares às da superfície cuticular das folhas (Kuo & Hoch, 1996), tornando assim mais reais as condições do ensaio.

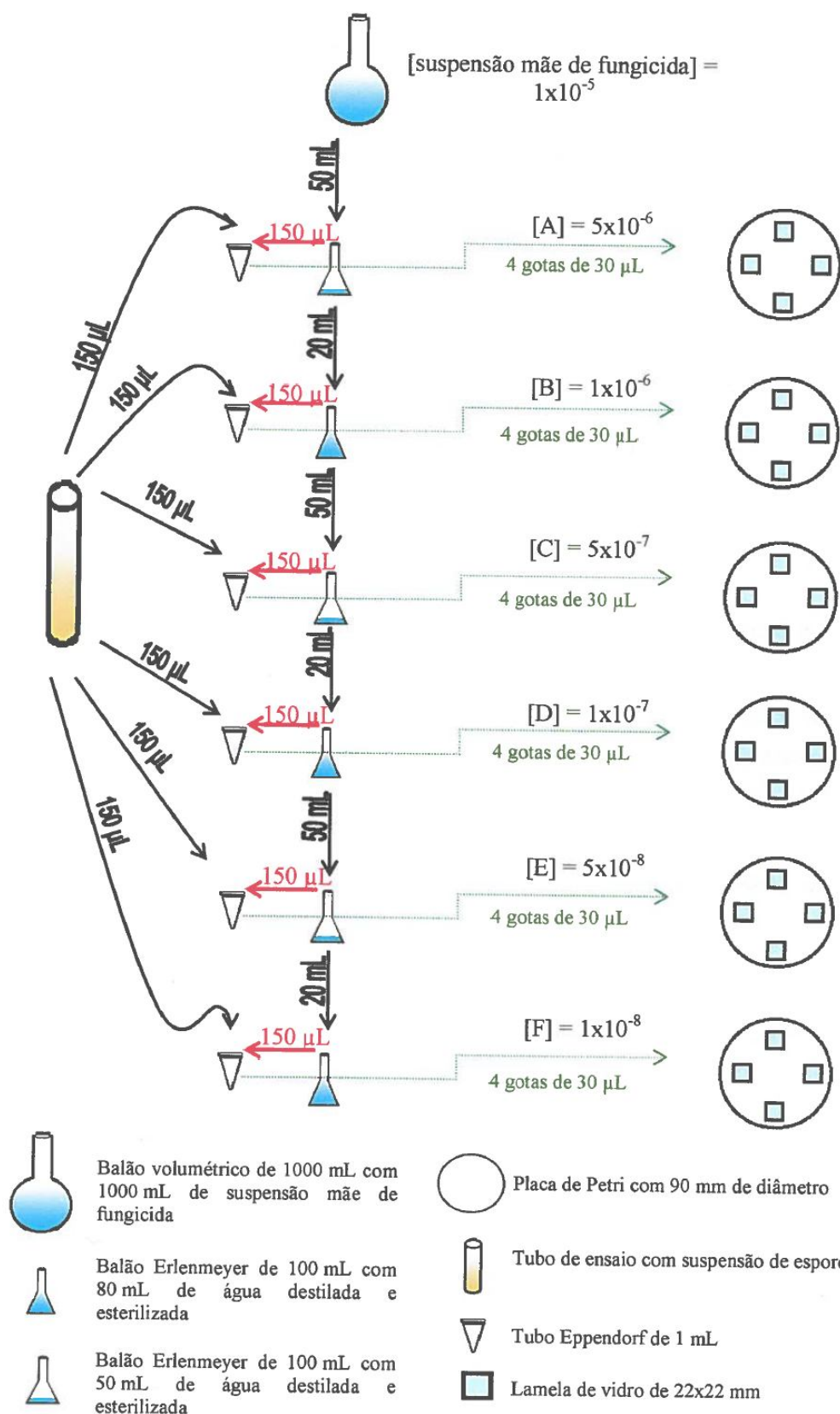


Figura 8. Procedimento utilizado no ensaio da inibição da germinação de esporos de *Stemphylium sp.*

Após duas horas de incubação, contou-se o número de esporos germinados, num total de 50 esporos por lamela. Obteve-se a percentagem corrigida de inibição da germinação através da fórmula de ABBOT (Horsfall, 1956)

$I = 100 - (E - T) / (T - A) \times 100$ , em que I é a percentagem da inibição corrigida; A, o número de esporos germinados antes da incubação na testemunha; T, o número de esporos germinados depois da incubação na testemunha e E, o número de esporos germinados depois da incubação, em cada concentração de fungicida ensaiado.

A análise dos resultados foi análoga à referida para a técnica do meio tóxico.

## 2.5. Observação da doença no contexto de produção

O campo escolhido para as observações foi instalado em 29 de Novembro de 2010 numa parcela situado em Cezaredas, concelho da Lourinhã. A plantação do campo foi efectuada manualmente, com um compasso de 25 x 30 cm, em camalhão. O sistema de rega utilizado foi rega por aspersão. Na modalidade testemunha efectuaram-se tratamentos com água, nas restantes plantas efectuaram-se tratamentos segundo as previsões ou aparecimento de micoses. Não foram aplicados produtos fitossanitários para a estenfiliose porque não existe nenhum produto homologado em Portugal. No Quadro 4 apresentam-se as datas que foram realizados tratamentos, para que finalidade, substâncias activas, produtos comerciais e concentrações utilizadas no ensaio de campo e as data de aplicação de água na modalidade testemunha.

**Quadro 4.** Datas de tratamento, doenças, substâncias activas, produtos comerciais e concentrações utilizadas no ensaio de campo

Modalidades	Data de tratamento	Doença	Substância Activa	Produto Comercial	Concentração utilizada
Tratada com fungicidas	22/12/2010	Míldio	mancozebe	Mancozebe sapec	200 g/hl
	15/01/2011	Alternariose	difenoconazol	Score 250 EC	50 ml/hl
	02/02/2011	Alternariose	azoxistrobina + enxofre	Ortiva + Stulln	80 ml/hl 200g/hl
	25/02/2011	Míldio	clortalonil + enxofre	Bravo 500 + Stulln	250 ml/hl 200g/hl
Tratada com água	22/12/2010	Controlo	_____	_____	_____
	15/01/2011	Controlo	_____	_____	_____
	02/02/2011	Controlo	_____	_____	_____
	25/02/2011	Controlo	_____	_____	_____

### **2.5.1. Avaliação de sintomas no campo**

A avaliação dos sintomas no campo foi efectuada através da observação visual das plantas. Demarcou-se uma área quadrangular no centro da parcela com um total de 126 plantas tratadas com fungicida e uma outra com 126 plantas tratadas com água (testemunha). Periodicamente foram efectuadas observações e registo de resultados nas plantas em ensaio.

### **2.5.2. Avaliação de sintomas no armazenamento**

Em 4 de Março, colheram-se 20 plantas que foram acondicionadas em caixas devidamente identificadas. Foram feitas observações individuais e avaliou-se o número total de manchas em cada planta. Após esta observação colocaram-se 10 unidades à temperatura ambiente (5 plantas tratadas com fungicida e 5 tratadas com água) e 10 plantas (5 plantas tratadas e 5 não tratadas) em câmara frigorífica a uma temperatura entre 0°C - 3°C. Quatro dias após a colheita, observaram-se novamente as amostras contabilizando o aparecimento de novos sintomas da doença em todas as amostras. Esta observação teve como objectivo simular o período correspondente ao tempo de transporte que o produto demora até chegar ao cliente. A última observação das amostras efectuou-se 7 dias após a colheita, simulando a data de entrega ao consumidor final, tendo sido contabilizado novamente o aparecimento de novos sintomas nas plantas.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Sintomas de estenfiliose em couve

Os sintomas consistem em pequenas manchas negras, com ligeiras depressões, que surgem nas folhas da cabeça da couve quando esta está formada e, praticamente, pronta a colher (Figura 9). É de salientar que esta doença pode aparecer em conjunto com outras doenças (Alternariose e a doença causada por *Mycosphaerella*), tornando difícil a sua identificação. Nas observações efectuada, verificou-se ser uma doença que se desenvolve não só no campo mas também no transporte e armazenamento.



Figura 9. a) Couve coração-de-boi infectada com manchas de estenfiliose, b) Manchas de estenfiliose numa folha de couve, c) manchas de estenfiliose ampliada, verifica-se a ligeira depressão d) aspecto de uma couve infectada com estenfiliose.

#### 3.2. Caracterização cultural dos isolados

As características culturais observadas em quatro isolados de *Stemphylium* sp., em meio de PDA, após 10 dias a 25 °C, na obscuridade permitiram descrever o micélio como feltroso, e de densidade média e com coloração verde olivácea a acinzentado. A frente de crescimento era regular e a cultura apresentava-se homogénea. A face inferior apresentava-se

semelhante à superior variando na coloração que era acastanhada com o centro cinzento-escuro a negro.

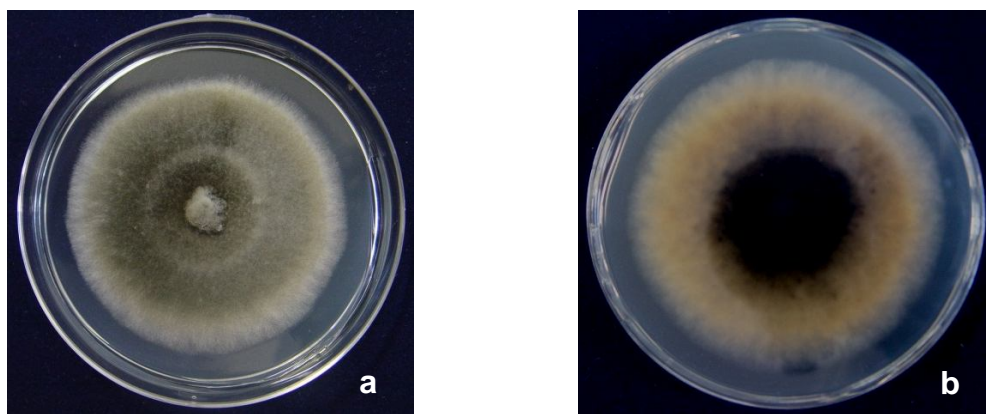


Figura 10. Cultura de *Stemphylium* sp., em meio de PDA (gelose de batata dextrosada), ao fim de 10 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 25°C, a) face superior; b) face inferior.

### 3.3 Identificação molecular de fungo presente nas couves comerciais

A sequência obtida para o fragmento amplificado por PCR do DNA purificado de folhas de couve coração-de-boi comerciais com lesões (Figura 9) tem 398 nt e encontra-se apresentada no Anexo 1. A sua análise, feita com recurso ao programa Blast e também apresentada no Anexo 1, revelou homologias muito significativas com fungos do género *Stemphylium*, em particular com a acessão AB693928, atribuída a *Stemphylium solani* genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S RNA, partial and complete sequence (E value=0.0, identidade: 397/398 nt). O tamanho do fragmento sequenciado, já representativo para a região ITS (tamanho total aproximadamente de 550 nt) e a homologia que apresenta só com sequências classificadas como pertencentes a *Stemphylium* sp. (Anexo 1) sugerem que o fungo presente nestas lesões seja de facto do género *Stemphylium*. Também porque as próprias sequências da base de dados em muitos casos não fazem a distinção ao nível da espécie, também neste trabalho se opta por mencionar apenas *Stemphylium* sp. Até porque as características culturais por nós visualizadas não sugerem que se trate de *Stemphylium solani* (Shen, 2012).

### 3.4 Análises moleculares a plantas de viveiro e sementes

Na tentativa de identificar a origem da contaminação com o fungo, fizeram-se análises moleculares (amplificação de fragmentos parciais ITS de fungos presentes no material vegetal e sequenciação) a plantas de viveiro de diferentes viveiristas (Triplanta e Braz

planta). Para as plantas analisadas, obtiveram-se duas sequências de 398 nt e 397 nt, respectivamente (Anexo 2) cuja análise Blast revelou homologia fortíssima também com fungos do género *Stemphylium*, em particular novamente com a acessão AB693928, (E value=0.0, identidade: 397/398 nt). Embora possa acontecer haver contaminação no viveiro, a probabilidade de diferentes viveiristas apresentarem contaminações com fungos muito semelhantes pareceu algo reduzida, pelo que formulou-se a hipótese de a infecção advir das sementes, de estas virem já contaminadas com o fungo. Realizadas análises semelhantes às anteriormente mencionadas a um lote de sementes da empresa produtora (já não o lote que dera origem às plantas do estudo, pois já não se encontrava disponível, mas um lote comparável), verificou-se que este proporcionava um resultado próximo ao anteriormente obtido. A sequência obtida para o produto amplificado a partir do ADN das sementes, também de 398 nt (Anexo 3) revelou também total homologia com fungos do género *Stemphylium*, em particular com a já referida acessão AB693928, (E value=0.0, identidade: 396/398 nt), apontando inequivocamente para a presença de *Stemphylium* sp. nas sementes.

### **3.5 Caracterização molecular do fungo em cultura pura**

Foram realizadas extracções de DNA de 4 isolados, uma partindo de uma cultura líquida fresca (do isolado referência para os ensaios de fungicidas) e três de cultura em tubo inclinado em micoteca. A qualidade do DNA extraído a partir destas três culturas foi muito baixa, pelo que se prosseguiu o estudo apenas com o isolado referência (ST4) para o qual se dispunha de cultura líquida. A sequência do fragmento parcial ITS obtida para o isolado ST4, de 392 nt (Anexo 4) revela novamente homologias muito significativas com fungos do género *Stemphylium*, e mais uma vez com a já referida acessão AB693928, (E value=0.0, identidade: 392/392 nt).

### **3.6 Comparação das diferentes sequências obtidas nos diferentes materiais vegetais e na cultura do fungo**

Na Figura 11 apresenta-se a análise comparativa das sequências obtidas, incluindo nela o genótipo da base de dados com que todas apresentaram maior semelhança.

Verifica-se uma enorme homologia entre todas, sendo a maior discrepância existente entre elas de 3 nt. Estas 3 falhas podem traduzir realidades biológicas, como seja a presença de estirpes distintas (especialmente plausível no caso das sementes, na medida em que já não foi possível arranjar sementes dos lotes usados para a produção das plantas testadas), mas também decorrer de erros de polimerização/sequenciação ocorridos durante o processo experimental.

Estes resultados sugerem estar-se em presença de um isolado similar (em termos de espécie) nas sementes, plantas de viveiro e plantas comerciais que o presente na cultura pura preparada e que foi identificado como *Stemphylium* sp.



```

comerc -----
TP -----
AB693928 TTTTCCTAGGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAATATGAAAGCGGGTTGGGACCT 60
ST4 -----
sem -----
BP -----

comerc -----TGTCTTTTGCACACTTCTT 19
TP -----TGTCTTTTGCACACTTCTT 19
AB693928 CACCTCGGTGAGGGCTCCAGCTTGTCTGAATTATTCACCCATGTCTTTTGCACACTTCTT 120
ST4 -----TGTCTTTTGCACACTTCTT 19
sem -----TGTCTTTTGCACACTTCTT 19
BP -----TGTCTTTTGCACACTTCTT 19
*****

comerc GTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACAGGACCAAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAA 79
TP GTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACAGGACCAAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAA 79
AB693928 GTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACAGGACCAAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAA 180
ST4 GTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACAGGACCAAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAA 79
sem GTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACAGGACCAAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAA 79
BP GTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACAGGACCAAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAA 79
*****

comerc TCAGCGTCAGTAAGCAATGTAATTATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC 139
TP TCAGCGTCAGTAAGCAATGTAATTATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC 139
AB693928 TCAGCGTCAGTAAGCAATGTAATTATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC 240
ST4 TCAGCGTCAGTAAGCAATGTAATTATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC 139
sem TCAGCGTCAGTAAGCAATGTAATTATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC 139
BP TCAGCGTCAGTAAGCAATGTAATTATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC 139
*****

comerc ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA 199
TP ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA 199
AB693928 ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA 300
ST4 ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA 199
sem ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA 199
BP ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA 199
*****

comerc TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCG 259
TP TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCG 259
AB693928 TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCG 360
ST4 TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCG 259
sem TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCG 259
BP TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCG 259
*****

comerc TCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTCTCACGAGACTCGCC 319
TP TCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTCTCACGAGACTCGCC 319
AB693928 TCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTCTCACGAGACTCGCC 420
ST4 TCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTCTCACGAGACTCGCC 319
sem TCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTCTCACGAGACTCGCC 319
BP TCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTCTCACGAGACTCGCC 319
*****

comerc TTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAATTCTTGCACTTTGA 379
TP TTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAATTCTTGCACTTTGA 379
AB693928 TTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAATTCTTGCACTTTGA 480
ST4 TTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAATTCTTGCACTTTGA 379
sem TTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAATTCTTGCACTTTGA 379
BP TTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAATTCTTGCACTTTGA 379
*****

comerc ATCAGCCTTGTTGAGCAT----- 398
TP ATCAGCCTTGTTGAGCAT----- 398
AB693928 ATCAGCCTTGTTGAGCATCCATCAAGACCACATTTAACTTTGACCTCGATCATGTGGA 540
ST4 ATCAGCCTTGTTGAGCAT----- 392
sem ATCAGCCTTGTTGAGCAT----- 398
BP ATCAGCCTTGTTGAGCAT----- 398
*****

comerc -----
TP -----
AB693928 GCGATCTACC 550
ST4 -----
sem -----
BP -----

```

Figura 11. Alinhamento comparativo feito com recurso ao programa ClustalW das sequências *comerc* (obtida da couve comercial), *TP* e *BP* (obtida a partir de plantas dos viveiros Triplanta e Braz planta respectivamente), *sem* (obtida a partir das sementes), *ST4* (obtida a partir da cultura pura) e da acessão *AB693928* armazenada no GenBank.

### 3.7. Eficácia biológica de fungicidas em relação ao isolado ST4

#### 3.7.1. Inibição do crescimento micelial

Da Figura 12 à Figura 16 encontram-se representadas as rectas de regressão de cada um dos fungicidas considerados no ensaio, para o isolado de *Stemphylium* sp. estudado.

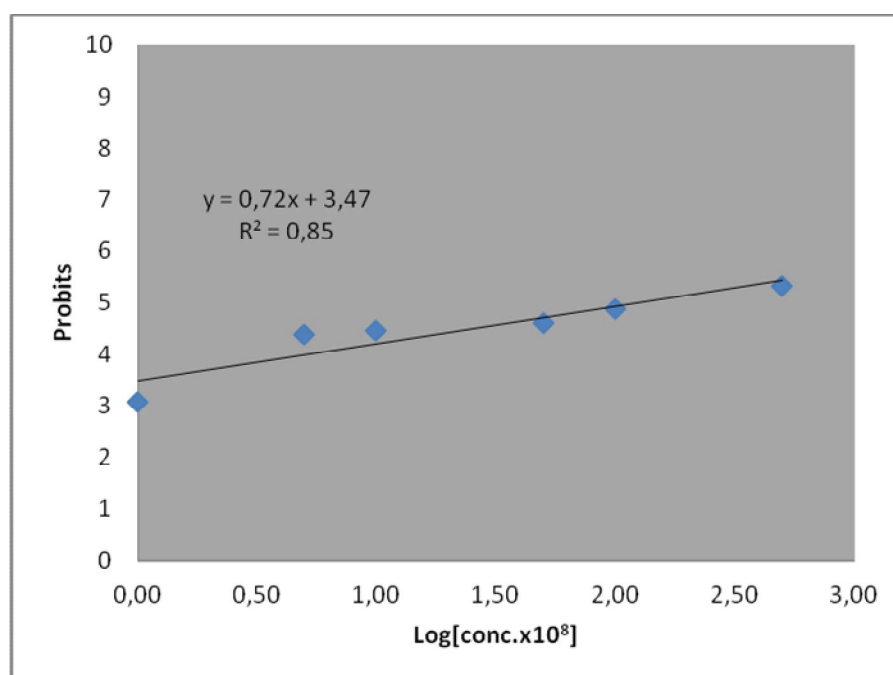


Figura 12. Eficácia de diferentes concentrações da mistura piraclostrobina + boscalide (Bellis) na inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de *Stemphylium* sp.. Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

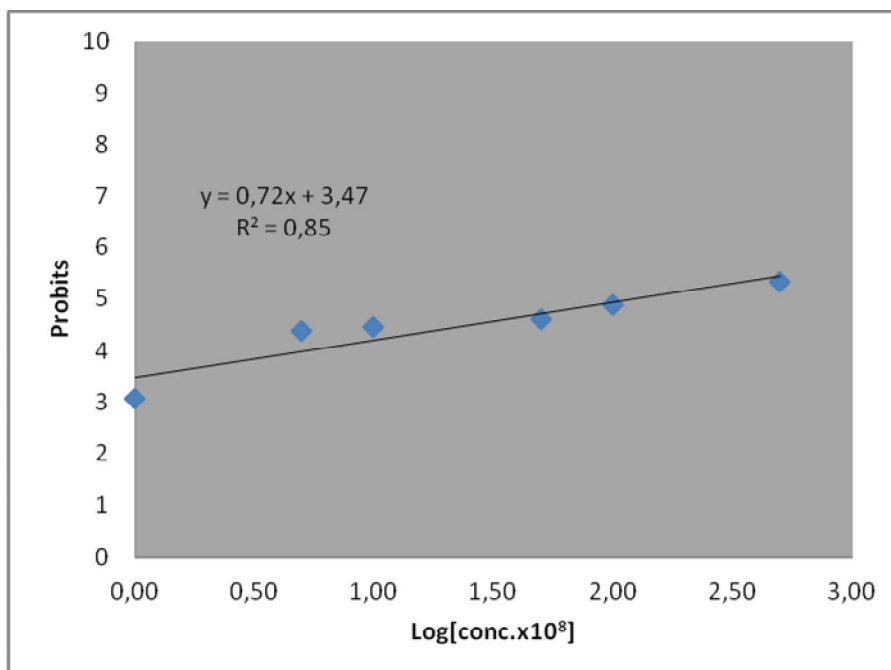


Figura 13. Eficácia de diferentes concentrações da mistura piraclostrobina + dimetomorfe (Cabrio Duo), na inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de *Stemphylium* sp.. Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

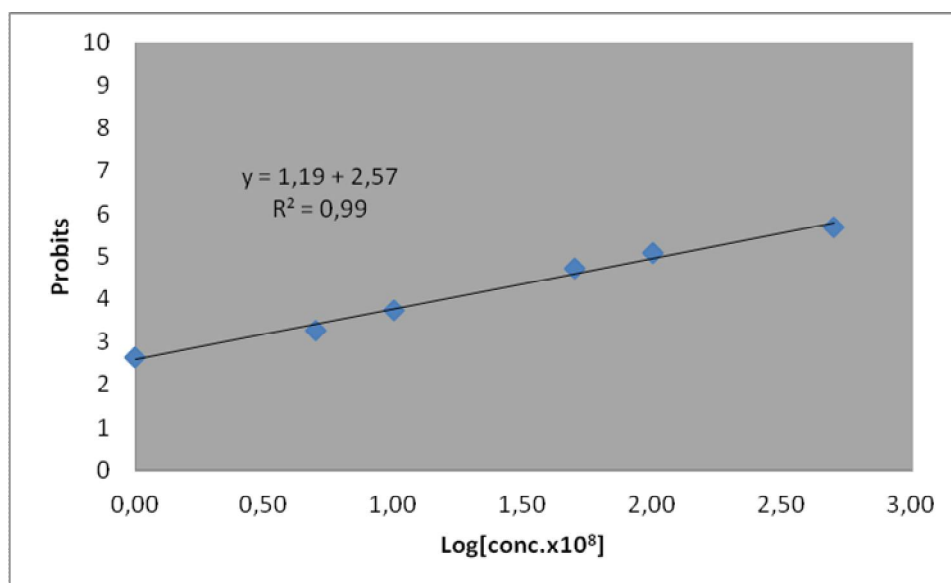


Figura 14. Eficácia de diferentes concentrações da substância activa difenoconazol (Score), na inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de *Stemphylium* sp.. Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

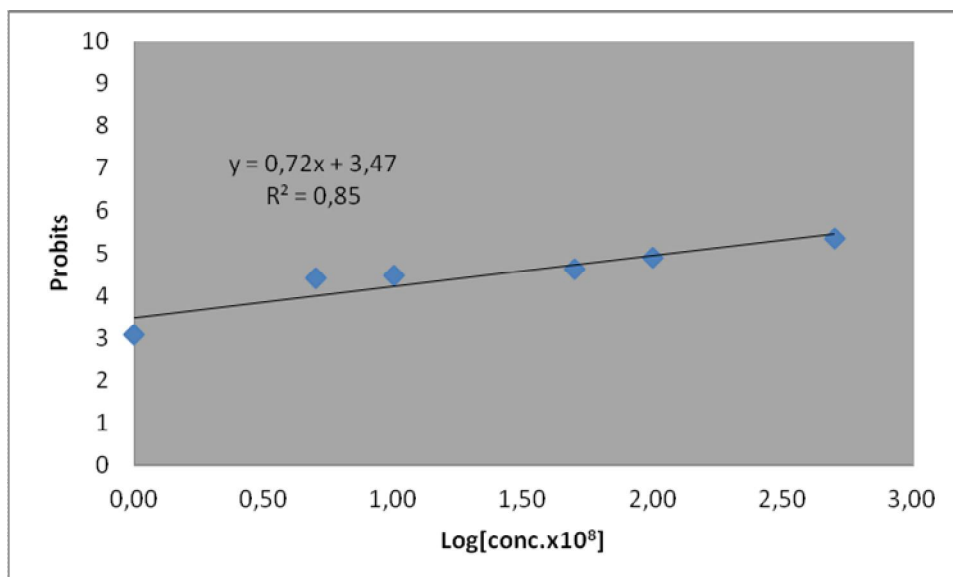


Figura 15. Eficácia de diferentes concentrações da mistura azoxistrobina + clortalonil (Ortiva Opti), na inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de *Stemphylium* sp.. Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

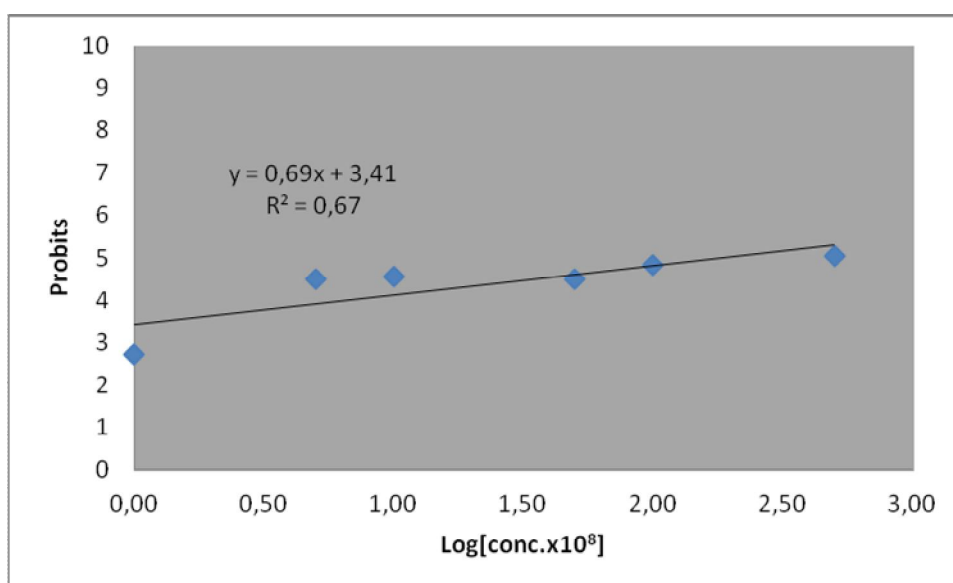


Figura 16. Eficácia de diferentes concentrações da mistura azoxistrobina + difenoconazol (Ortiva Top), na inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de *Stemphylium* sp.. Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

No Quadro 5 encontram-se representados os parâmetros de regressão ( $R^2$  e b) e os valores de  $CE_{50}$  obtidos para cada fungicida e para isolado de *Stemphylium* sp.

Os valores de  $R^2$  (coeficiente de determinação) foram baixos nos fungicidas azoxistrobina (Quadro 5) e azoxistrobina + difenoconazol, compreendidos no intervalo de [0,22; 0,68], o que revela um mau ajustamento das rectas de regressão aos valores determinados experimentalmente. Os valores de  $R^2$  dos restantes fungicidas foram elevados,

compreendidos no intervalo de [0,85; 0,99], o que revela um bom ajustamento das rectas de regressão aos valores obtidos experimentalmente.

Observando-se o Quadro 5 pode-se concluir que, dos seis fungicidas ensaiados, os três fungicidas mais eficazes, com valores de  $EC_{50}$  mais baixos, foram a piraclostrobina + boscalide, piraclostrobina + dimetomorfe e difenoconazol.

A s.a azoxistrobina não proporciona resultados satisfatórios, uma vez que, para as concentrações ensaiadas, não foi atingido o valor de  $CE_{50}$ .

Neste ensaio verifica-se uma grande diferença de eficácia na família das estrobilurinas, uma vez, que o fungicida mais eficaz e o menos eficaz são da mesma família, mas com modos de acção diferentes.

**Quadro 5.** Parâmetros de regressão linear ( $R^2$  e  $b$ ) e valores de  $CE_{50}$  registados nos ensaios *in vitro* de inibição do crescimento micelial, com 6 fungicidas, para o isolado de *Stemphylium* sp. em estudo.

Grupo químico	Nome da s.a (nome comercial)	$R^2$	$b$	$CE_{50}$ (mg L <sup>-1</sup> )
estrobilurina	piraclostrobina + boscalide (Bellis)	0,85	1,55	0,08
estrobilurina + morfolina	piraclostrobina + dimetomorfe (Cabrio Duo)	0,98	0,44	0,53
triazol	difenoconazol (Score)	0,99	1,19	1,07
estrobilurina + nitrilo	azoxistrobina + clortalonil (Ortiva Opti)	0,85	0,73	1,24
estrobilurina + triazol	azoxistrobina + difenoconazol (Ortiva Top)	0,68	0,70	1,86
estrobilurina	azoxistrobina (Ortiva)	0,22	-0,14	-

### 3.7.2. Inibição da germinação de esporos

Para o ensaio de germinação de esporos, seleccionaram-se apenas dois fungicidas utilizados nos ensaios de inibição do micélio. Os produtos foram a mistura piraclostrobina + boscalide e o difenoconazol, devido a estes apresentarem eficácia elevada no controlo do crescimento micelial.

Os resultados apurados nos ensaios de inibição da germinação de esporos de *Stemphylium* sp (quadro 6) revelaram que apenas o fungicida piraclostrobina + boscalide demonstrou eficácia biológica. O difenoconazol não actua na inibição da germinação de esporos e só actua sobre o micélio. No Quadro 6 e Figura 17, encontram-se representado os parâmetros de regressão ( $R^2$  e  $b$ ) e os valores de  $CE_{50}$  obtido. O valor de  $R^2$  (coeficiente de determinação) obtido neste ensaio é de 0,87 o que determina um nível de robustez elevado. Na inibição da germinação de esporos, a família das estrobilurinas foi a que revelou eficácia

**Quadro 6.** Parâmetros de regressão linear ( $R^2$  e  $b$ ) e valores de  $CE_{50}$  registados nos ensaios *in vitro* de inibição da germinação de esporos, com 2 fungicidas, para o isolado de *Stemphylium* sp. em estudo.

Grupo químico	Nome da s.a (nome comercial)	$R^2$	$b$	$CE_{50}$ (mg L <sup>-1</sup> )
estrobilurina	piraclostrobina + boscalide (Bellis)	0,87	2,1	0,27
triazol	difenoconazol (Score)	-	-	-

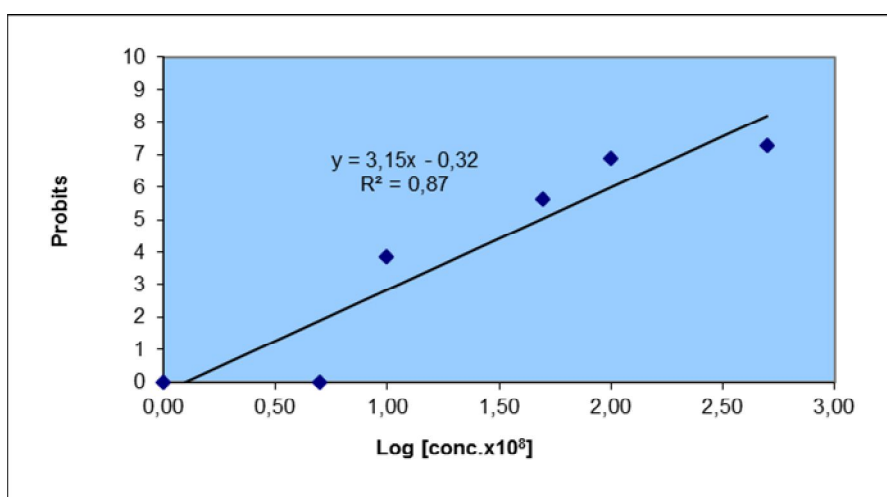


Figura 17. Eficácia de diferentes concentrações da substância activa piraclostrobina + boscalide (Bellis), na inibição da germinação dos esporos (probit) de um isolado de *Stemphylium* sp.. Recta de regressão linear, equação respectiva e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

### 3.8. Ensaio no contexto da produção

#### 3.8.1 Avaliação de sintomas na cultura

Na avaliação no campo foram observadas um total de 232 couves sendo 126 pertencentes ao campo tratado com fungicidas e 126 pertencentes ao campo tratado com água.

No Quadro 7 encontram-se representados os números de plantas infectadas com estenfiliose no campo tratado com água e no campo tratado com fungicidas. Como se verifica, o campo tratado com água manifestou uma semana antes da colheita os primeiros sintomas de estenfiliose, no entanto ao longo do tempo observou-se uma maior intensidade da doença no campo tratado com fungicidas. A maior incidência de estenfiliose no campo tratado, poderá ser justificada pelos tratamentos efectuados com fungicidas ao longo do desenvolvimento vegetativo da cultura, com o objectivo de controlar outras doenças já referidas no quadro 4. Estes tratamentos terão diminuído a pressão do inóculo concorrente.

Um aspecto importante é que, embora as sementes e as plântulas desde início estejam infectadas com a estenfiliose, esta manifesta-se apenas com manchas nas folhas do repolho (Figura 18), nos últimos dias antes do momento óptimo de colheita

**Quadro 7.** Resultados da avaliação de sintomas no campo: data de observação e nº de plantas com sintomas

Data da observação	Nº de plantas com sintomas	
	Campo tratado com água	Campo tratado com fungicidas
29-11-2010 <sup>a</sup>	0	0
27-12-2010	0	0
14-01-2011	0	0
24-01-2011	0	0
07-02-2011	0	0
15-02-2011	0	0
25-02-2011	3	0
03-03-2011 <sup>b</sup>	49	59
04-03-2011	colheita	colheita
08-03-2011	50	61
11-03-2011	55	73

a - Data de plantação; b – Observação um dia antes da colheita.



Figura 18. Folhas do repolho onde as manchas de estenfiliose se manifestam.

### 3.8.2 Avaliação de sintomas no armazém

Os Quadros 8 e 9 apresentam a avaliação do número de manchas (ou, na última data, percentagem de área afectada) nas amostras de couve-coração tratadas com água e tratadas com fungicidas mantidas à temperatura ambiente, verificando-se uma contaminação do fungo bastante elevada. Os Quadros 10 e 11 apresentam a avaliação do número de manchas na amostra tratada com água e tratada com fungicidas, mantida sob temperatura controlada (0-3°C), verificando-se um desenvolvimento do fungo mais reduzido.

**Quadro 8.** Avaliação do número de manchas (ou percentagem de área afectada) na amostra tratada com água e mantida à temperatura ambiente.

Amostra	Nº de manchas		
	04-03-2011 (colheita)	09-03-2011	17-03-2011
1	12	23	100%
2	5	7	100%
3	10	21	100%
4	12	18	100%
5	4	10	100%

**Quadro 9.** Avaliação do número de manchas na amostra tratada com fungicidas e mantida à temperatura ambiente

Amostra	Nº de manchas		
	04-03-2011 (colheita)	09-03-2011	17-03-2011
1	6	17	100%
2	6	12	100%
3	7	13	100%
4	7	16	100%
5	2	8	100%



**Quadro 10.** Avaliação do número de manchas na amostra tratada com água e mantida à temperatura controlada

Amostra	Nº de manchas		
	04-03-2011 (colheita)	09-03-2011	17-03-2011
1	10	12	14
2	4	4	4
3	6	7	10
4	6	8	8
5	28	32	35

**Quadro 11.** Avaliação do número de manchas na amostra tratada com fungicidas e mantida à temperatura controlada

Amostra	Nº de manchas		
	04-03-2011 (colheita)	09-03-2011	17-03-2011
1	23	24	27
2	13	15	16
3	20	20	25
4	9	10	12
5	18	19	27

Como se verifica, as manchas de estenfiliose desenvolveram-se ao longo do tempo em maior número nas amostras colocadas em temperatura ambiente. No nosso caso, em 5 dias e na plantas analisadas, passou-se de 30-40 manchas para 65-70.

Em temperatura controlada, o aparecimento de manchas de estenfiliose ocorreu ao longo do tempo com menor intensidade; em 5 dias formaram-se muito poucas novas manchas nos lotes analisados (5-10). Importa referir que nas câmaras controladas a humidade relativa é de cerca de 90 %, podendo este factor favorecer o desenvolvimento da doença. No entanto, o efeito da temperatura parece ter sido preponderante.



Figura 19. A caixa da esquerda apresenta couves coração tratadas com fungicidas e conservada pós colheita à temperatura ambiente. A caixa direita apresenta couves coração tratadas com fungicidas e conservadas em temperatura controlada.

Verificou-se a existência de um desenvolvimento da doença pós colheita, mesmo em temperatura controlada, no entanto com menos intensidade (Figura 19). No dia 17-03-2011 não se contabilizou as manchas de estenfiliose das couves que se encontravam à temperatura ambiente, devido às couves estarem sem qualidade comercial.

#### 4. Conclusões

Dada a importância actual da estenfiliose na couve coração-de-boi, pretendeu-se com este trabalho, em primeiro lugar, isolar e identificar o patógeno associado à doença, a partir de campos da cultura com sintomas.

O estudo realizado permitiu realizar a descrição detalhada dos sintomas, pequenas manchas negras, com ligeiras depressões, que surgem nas folhas da cabeça da couve quando esta está formada, na época de colheita. Constatou-se ainda que a doença não se desenvolve só no campo mas também no transporte e armazenamento.

O estudo das características culturais dos isolados revelou-se útil para a identificação preliminar do género, salientando-se como as características mais diferenciadoras a textura feltrosa do micélio com densidade média e coloração verde olivácea a acinzentado. A frente de crescimento era regular e a cultura apresentava-se homogénea. A face inferior apresentava-se semelhante à superior variando na coloração que era acastanhada com o centro cinzento-escuro a negro. Estas características apontam para fungos do género *Stemphylium*.

Através da análise da sequenciação de fragmentos amplificados por PCR do DNA purificado de folhas de couve coração-de-boi comercial com lesões, observou-se que estamos em presença de um organismo com homologias muito significativas com fungos do género *Stemphylium*. Na tentativa de identificar a origem da contaminação, fizeram-se análises moleculares (amplificação de fragmento parciais ITS de fungos presentes no material vegetal) a plantas de viveiro de diferentes viveiristas (Triplanta e Bráz planta), tendo sido verificado que as plantas estavam contaminadas com o fungo.

Embora possa acontecer contaminação no viveiro, a probabilidade de diferentes viveiristas apresentarem contaminações com fungos muito semelhantes pareceu algo reduzida, pelo que formulou-se a hipótese de a infecção advir das sementes, de estas virem já contaminadas com o fungo. Realizadas análises semelhantes às anteriormente mencionadas a um lote de sementes da empresa produtora, verificou-se que este proporcionava um resultado próximo ao anteriormente obtido. De qualquer forma, estes apontam inequivocamente para a presença de *Stemphylium* sp. nas sementes. Assim considera-se aconselhável proceder a uma desinfecção das sementes com fungicidas específicos no controlo da doença.

Relativamente à verificação da patogenicidade dos isolados, tentámos obter sementes sãs para proceder à sua realização, contudo, tal foi impossível de concretizar, devido à escassez de tempo.

Conclui-se que, dos seis fungicidas ensaiados, no que respeita à inibição do crescimento micelial de um isolado de *Stemphylium* sp., cinco apresentaram eficácia biológica, tendo sido atingido os valores respectivos de  $CE_{50}$ , para as concentrações ensaiadas. Dos 6

fungicidas utilizados, verificou-se que existia três fungicidas mais eficazes, com valores de  $EC_{50}$  mais baixos, foram a piraclostrobina + boscalide, piraclostrobina + dimetomorfe e o difenoconazol.

Já no que se refere ao comportamento dos dois fungicidas utilizados na inibição da germinação de esporos de *Stemphylium sp.*, apenas a mistura piraclostrobina + boscalide revelou eficácia biológica.

Nos campos de cultura em ensaio, verificou-se que o campo tratado com água manifestou, uma semana antes da colheita, os primeiros sintomas de estenfiliose, no entanto ao longo do tempo observou-se uma maior intensidade da doença no campo tratado com fungicidas, talvez pela existência de menor competição com outros patógenos.

Relativamente às condições de armazenamento, verificou-se que as manchas de estenfiliose manifestam-se com maior número nas amostras colocadas em temperatura ambiente.

Os resultados alcançados nos ensaios de fungicidas permitiram à Hortapronta informar a Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) antiga Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGARD) da existência da doença, estenfiliose em couves repolho e solicitar autorização para aplicação do produto fitofarmacêutico, cuja s.a activa é a piraclostrobina + boscalide através de um pedido de usos menores.

## Referências Bibliográficas

- Agrios, G. N. Plant Pathology. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.
- Amaro, P. 1971. O ensaio biológico, Factores de variação no ensaio biológico, bases estatísticas do ensaio biológico. Aparentamentos do curso de fitofarmacia. Vol, 6, ISA, Lisboa, 18P
- Aveling, T. 1993. Infection studies of *Stemphylium vesicarium* on onion leaves. *Mycol. Res.* 97: 984 - 988. (cit. Sousa, 2000).
- BASF, 2012. [www.agro.basf.pt](http://www.agro.basf.pt) (acedido em 18/01/12).
- Bizarro, P, B. 2004. A produção de couves no Oeste. *Frutas, Legumes e Flores* 12, suplemento técnico 77. 8 p.
- Bliss, C. I. 1935. The calculatin of the dosage mortality curve. *Annals of Applied Biology* 22: 135-167.
- Boiteux, L.; Lima, M.; Menezes Sobrinho, J. & Lopes, C. 1994. A garlic (*Allium sativum*) leaf blight caused by *Stemphylium vesicarium* in Brazil. *Plant Pathology* 43: 412 - 414.
- Câmara, M.; O'Neil, N. & Berkum, P. van 2002. Phylogeny of *Stemphylium* spp. based on ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 94: 660-672.
- Chang, S.; Kim, H.; Kang, H. & Hwang, B. 2000. Leaf blight of Chinese chive caused by *Stemphylium vesicarium* in Korea. *Plant Pathology Journal* 16: 280-282.
- Chary, S.; Kumar, B. & Reddy, S. 1980. Hitherto unrecorded post-harvest diseases of tomato. *Indian Phytopatology* 33: 624-625 (cit. Sousa, 2000).
- Croxall, H; Knight, B.; Dale, W. & Rosser, W. 1964. A comparison of protective and curative apple scab spray programmes. *Plant Pathology*, 13: 93 -100
- DGARD 2012. [www.dgard.pt](http://www.dgard.pt) (acedido em 14/01/12).
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

- Ellis, M. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew. Commonw. Mycological. Inst. Kew, Surrey 608 pp.
- Finney. 1951. *Probit Analyses*. 2ed. Cambridge Univers. Press, Cambridge (cit. Amaro, 1971)
- Godet, F.; Roques, J. & Campagnon, J. 1997. L'azoxistrobine fungicide polyvalent cereals et vigne. *Phytoma*, 498: 52-54.
- Hassan, M., Allam, A., Abo-Elyousr, K. & Hussein, M. 2007. First report of *Stemphylium* leaf blight of onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology* 56: 724.
- Hausbeck, M.K. 2009. Purple spot disease of asparagus: Cool, wet growing conditions favor purple spot on asparagus spears ([http://msue.anr.msu.edu/news/purple\\_spot\\_disease\\_of\\_asparagus](http://msue.anr.msu.edu/news/purple_spot_disease_of_asparagus)).
- Hernández, E. 1999. La mancha negra del peral. *Agricultura: Revista. Agropecuária*. 68: 1018-1020.
- Horsfall, J. C. 1956. *Principles of Fungicidal Action*. Waltham, Mass, 279 pp.
- Kirk, P.; Cannon, P.; David, J. & Stalpers, J. 2004. *Dictionary of the Fungi*. 9th Edition. International Mycological Institute. CAB International Biocience, Wallingford, 655 pp.
- Kodsueb, R.; Dhanasekaran, V.; Aptroot, A.; Lumyong, S.; McKenzie, E.; Hyde, K. & Jeewon, R. 2006. The family Pleosporaceae: intergeneric relationships and phylogenetic perspectives based on sequence analyses of partial 28S rDNA. *Mycologia* 98: 571-83
- Koike, Steven T. & Henderson, M. 2001. Leaf Spot Disease of Spinach in California Caused by *Stemphylium botryosum*. *Plant Disease* 85, Number 2. 126-130
- Kuo, K. C. & Hoch, H .C. 1996. Germination of *Phyllosticta ampellicida* pynidiospores: Prerequisite of adhesion to the substratum and the relationship of substratum wttability. *Fungal Genetic Biology* 20: 18-29. (Cit Olaya & Koller, 1999).
- Kurosawa, C. & Mussi, L. 1995. Avaliação de resistência em cultivares e híbridos de tomateiro à mancha de estenfílio. *Summa Phytopathologica* 21:199-201.

- Lima, A, 1989. Trabalho para provas de aptidão pedagógica e capacidade científica apresentado ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa,.22 f.
- Llorente, I. & Montesinos, E. 2002. Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology* 92: 99-104.
- Lopes, A. Simões, A. 2007. *Produção Integrada em Hortícolas, Família das Aliáceas e das Asparagáceas*, Lisboa. 180 pp.
- Menzies, S.; Broadhurst, P. & Triggs, C. 1992. *Stemphylium* disease of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) in New Zeland. *New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science*. 20: 427-433 (cit. Sousa, 2000).
- Michel, P. 2000. Sept nouvelles substances actives fungicidas. *Phytoma* 533: 40-44.
- Montesinos, E. & Vilardell, P. 1992. Evaluation of Fast as a forecasting system for scheduling fungicide sprays for control of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Plant Disease*. 76: 1221-1226.
- Moore, M. 1967. Glasshouse experiments on apple scab. III Fungicides mistures, curative translocation and the influence of muldew . *Annals of Applied Biology*, 59: 239-244.
- Nischwitz, Claudia. 2012. *Stemphylium* leaf blight and stalk rot *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons, Utah State University, Bugwood.org
- Olaya, G. & Koller, W. 1999. Baseline sensivities of *Venturia inaequalis* to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. *Plant Disease* 83: 274-278.
- Palminha, J. M. C. 1994. *O complexo Sthemphylium no tomateiro*. Ciência Biológica. Monografia número 21. Departamento de Zoologia. Universidade de Coimbra. Coimbra 50 pp.
- Pei, Y.-F.; Wang, Y.; Geng, Y.; O'Neil, N.; Zhang, X.-G. 2011. Tree novel species of *Stemphylium* from Sinkiang, China: their morphological and molecular characterization .*Mycological Progress* 10: 163-173.

- Prados-Ligero, A.; Melero-Vara, J.; Corpas-Hervías, C. & Basallote-Ureba, M. 2003. Relationships between weather variables, airborne spore concentrations and severity of leaf blight of garlic caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 109: 301-310.
- Rayner, R.W. 1970. A Mycological Colour Chart. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Rao, N. & Pavgi, M. 1975. *Stemphylium* leaf blight of onion. *Mycopathologia* 56: 113-118. (cit. Tavares, 1992).
- Reis & Boiteux, L.S. 2006. Resistência de acessos de *Lycopersicon* e *Stemphylium solani* e *S Lycopersici*. Brasília: Embrapa Hortaliças Boletim de pesquisas e desenvolvimento 22. 12P.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Samuel, G. 1930. Tomato diseases in South Australia and how to control. *Them. J. Agr. So. Australia* 34: 499-510. (cit.Palminha, 1994).
- Shen YM, Yang YC, Fu YJ, Hung TH, 2012. First repost of *Stemphylium Solani* causing leaf spot of Lalanchoe blossfeldiana in Taiwan . New Disease Reposts 25, 10. (<http://dx.doi.org/10.5197/j.20044-0588.2012.010>).
- Shepard, H. H. 1951. The chemistry and action of insecticides. (1<sup>ST</sup>. ed.), New York, McGraw-Hill Book Co. Inc.. (Cit Tomaz, 1958)
- Silva Fernandes, A. 1990 Modo de acção dos fungicidas. Apontamentos da cadeira de fitofarmacologia . ISA. Lisboa, 42p.
- Simmons, E. 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia* 59: 67-92.
- Simmons, E. 1969. Perfect states of *Stemphylium*. *Mycologia* 61: 1-26.
- Simmons, E. 1985. Perfect states of *Stemphylium* II. *Sydowia, Annales Mycologici* Ser. II, 38: 284-293.
- Smith, O. 1940. *Stemphylium* leaf spot of red clover and alfafa. *J. Agr. Res*, vol. 61 nº12, 831-846.



- Sousa, A. 2000. *Medidas a adoptar para a redução da incidência da “Stemphyliose” no pomar de pereira Rocha*. 5º Encontro Rocha em flor. Produção Integrada. Associação dos Produtores Agrícolas da Sobrena. Cadaval. 33-38.
- Suzui, T. 1973. Stemphylium leaf spot (*Stemphylium botryosum* Wallr.) on asparagus plant. *Ann. Phytopathol. Soc.Jpn.* 39: 364-366. (cit. Fallon *et al.*, 1987).
- Tavares, C. 1992. *Estudo comparativo de isolamentos de dois fungos do género Stemphylium: S. botryosum e S. vesicarium*. Relatório de estágio do curso de engenheiro agrónomo. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa 146 pp.
- Tomaz, I. L. 1958. Características fitofarmacêuticas de alguns fungicidas. Métodos de análise. Relatório fim de curso Eng. Agr., ISA, UTL, Lisboa, 175.
- Tomaz, I. & Lima, A. 1986. Uma importante doença da cebola em Portugal causada por *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) Simmons. *Publicação Laboratorio Patologia. Vegetal Verissimo. Almeida* 48, 4pp.
- Tomlin, C (ed.) 1994. *A world compendium*. The Pesticide Manual. Incorporating the agrochemicals handbook. Tenth edition, crop protection publications, Bath, UK, 1341p.
- Thompson, J.; Gibson, T.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D. 1997. The CLUSTLX windows interface flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25, 4876-4882.
- USDA Cooperative Extension Slide Series. (acedido em 14/01/12).
- Vasquez, A. & Zumelzú, G. 1982. *Stemphylium vesicarium* Wallr. y su forma perfecta *Pleospora herbarum* Pers. en cultivos de cebola (*Allium cepa* L.) en el Departamento Cruz del Eje (Pcia de Cordoba). *Revista Científica Agropecuária*. 3: 29-36. (cit. Tavares, 1992).
- Zheng, L., Huang, J. and Hsiang, T., 2008. First report of leaf blight of garlic (*Allium sativum*) caused by *Stemphylium solani* in China. *Plant Pathology*. 57: 380.

## **Anexo I**

## Anexo 1 - sequência obtida para o fragmento amplificado por PCR do ADN purificado de folhas de couve coração-de-boi comerciais com lesões e análise Blast

ATGCTCAACCAAGGCTGATTCAAAGTGCAAGAATTGTGCTGCGCTCCGAA  
 ACCAGTAGGTTCGGCTGCCAATCATTTTAAGGCGAGTCTCGTGAGAGACAAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCCTT  
 GAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGAT  
 GATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGAT  
 CCGTTGTGAAAGTTGTAATAATTACATTGCTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAAGGTTTATGGTTTGGTC  
 CTGGTGGCGGGCGAACCCGCCAGGAAACAAGAAGTGCGCAAAAGACA

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>	Links
<a href="#">AB693928.1</a>	Stemphylium solani genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S RNA, partial and complete sequence, isolate: F0626	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	
<a href="#">HM240841.1</a>	Uncultured Stemphylium clone 1071 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	
<a href="#">JF289150.1</a>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-B10-unis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	
<a href="#">JF331529.1</a>	Pleospora sp. CNU094030 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	
<a href="#">JF331528.1</a>	Pleospora sp. CNU093052 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	
<a href="#">JF331527.1</a>	Pleospora sp. CNU093046 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	
<a href="#">JF331526.1</a>	Pleospora sp. CNU093040 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	
<a href="#">JF331525.1</a>	Pleospora sp. CNU093018 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	
<a href="#">JF331524.1</a>	Stemphylium sp. CNU094015 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	
<a href="#">JF331523.1</a>	Stemphylium sp. CNU094014 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	
<a href="#">JF331522.1</a>	Stemphylium sp. CNU094013 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%	

## **Anexo II**

## Anexo 2 - seqüências obtidas para os fragmentos amplificados por PCR do ADN purificado de folhas de plantas de viveirista e análise Blast

### Amostras de plantas provenientes do Viveiro Triplanta

ATGCTCAACCAAGGCTGATTCAAAGTGCAAGAATTGTGCTGCGCTCCG  
 AAACCAGTAGGTGCGCTGCCAATCATTTTAAGGCGAGTCTCGTGAGAGACAAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGC  
 TTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCG  
 ATGATTCACTGAATTCCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAG  
 ATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATAATTACATTGCTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGGTTTGG  
 TCCTGGTGGCGGGCGCAACCCGCCAGGAAACAAGAAGTGCAGCAAAAGACA

398 bp

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
<a href="#">AB693928.1</a>	Stemphylium solani genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S RNA, partial and complete sequence, isolate: F0626	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">HM240841.1</a>	Uncultured Stemphylium clone 1071 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF289150.1</a>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-B10-unis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331529.1</a>	Pleospora sp. CNU094030 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331528.1</a>	Pleospora sp. CNU093052 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331527.1</a>	Pleospora sp. CNU093046 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331526.1</a>	Pleospora sp. CNU093040 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331525.1</a>	Pleospora sp. CNU093018 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331524.1</a>	Stemphylium sp. CNU094015 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331523.1</a>	Stemphylium sp. CNU094014 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331522.1</a>	Stemphylium sp. CNU094013 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331521.1</a>	Stemphylium sp. CNU094007 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331520.1</a>	Stemphylium sp. CNU094005 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
	gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence					
	Stemphylium vesicarium isolate CNU094009					
<a href="#">JF331519.1</a>	internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">730</a>	730	100%	0.0	99%

## Amostras de plantas provenientes do Viveiro Brásplanta

ATGCTCAACCAAGGCTGATTCAAAGTGCAAGAATTGTG  
CTGCGCTCCGAAACCAAGTAGGTGGCTGCCAATCATT'TAAGGCGAGTCTCGTGAGAGACAAAGACGCCCAACAC  
CAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTT  
CAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCA  
GAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATAATTACATTGTTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAAGGTT  
TATGTTTGGTCTGTTGGCGGGCGAACCAGCCAGGAAACAAGAAGTGCACAAAAGACA

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
<a href="#">AB693928.1</a>	Stemphylium solani genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S RNA, partial and complete sequence, isolate: F0626	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%
<a href="#">HM240841.1</a>	Uncultured Stemphylium clone 1071 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%
<a href="#">JF289150.1</a>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-B10-unis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331529.1</a>	Pleospora sp. CNU094030 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331528.1</a>	Pleospora sp. CNU093052 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331527.1</a>	Pleospora sp. CNU093046 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331526.1</a>	Pleospora sp. CNU093040 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331525.1</a>	Pleospora sp. CNU093018 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331524.1</a>	Stemphylium sp. CNU094015 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331523.1</a>	Stemphylium sp. CNU094014 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331522.1</a>	Stemphylium sp. CNU094013 internal transcribed	<a href="#">728</a>	728	100%	0.0	99%

Sequences producing significant alignments:

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<u><a href="#">Max</a></u> <u><a href="#">score</a></u>	<u><a href="#">Total</a></u> <u><a href="#">score</a></u>	<u><a href="#">Query</a></u> <u><a href="#">coverage</a></u>	<u><a href="#">E</a></u> <u><a href="#">value</a></u>	<u><a href="#">Max</a></u> <u><a href="#">ident</a></u>
	spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence					

### **Anexo III**



### Anexo 3 - sequência obtida para o fragmento amplificado por PCR do ADN purificado de sementes de couve coração-de-boi e análise Blast

TGTCCTTTTGGCGCACTTCTTGTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACCAGGACCAAACCATA  
AACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAACAATGTAATTATTACGACTTTCAACAA  
CGGATCTCTTGGTCTTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAAT  
TGCAGAATTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAA

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
<a href="#">AB693928.1</a>	Stemphylium solani genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S RNA, partial and complete sequence, isolate: F0626	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">HM240841.1</a>	Uncultured Stemphylium clone 1071 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF289150.1</a>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-B10-unis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331529.1</a>	Pleospora sp. CNU094030 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331528.1</a>	Pleospora sp. CNU093052 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331527.1</a>	Pleospora sp. CNU093046 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331526.1</a>	Pleospora sp. CNU093040 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331525.1</a>	Pleospora sp. CNU093018 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331524.1</a>	Stemphylium sp. CNU094015 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331523.1</a>	Stemphylium sp. CNU094014 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331522.1</a>	Stemphylium sp. CNU094013 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331521.1</a>	Stemphylium sp. CNU094007 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331520.1</a>	Stemphylium sp. CNU094005 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331519.1</a>	Stemphylium vesicarium isolate CNU094009 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%

## Sequences producing significant alignments:

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><u>Max</u> <u>score</u></b>	<b><u>Total</u> <u>score</u></b>	<b><u>Query</u> <u>coverage</u></b>	<b><u>E</u> <u>value</u></b>	<b><u>Max</u> <u>ident</u></b>
<a href="#">JF331518.1</a>	Stemphylium vesicarium isolate CNU094008 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331517.1</a>	Stemphylium vesicarium isolate CNU094004 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331516.1</a>	Stemphylium vesicarium isolate CNU094003 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">JF331515.1</a>	Stemphylium vesicarium isolate CNU094002 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%
<a href="#">HQ649919.1</a>	Pleospora sp. s062 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	99%

## **Anexo IV**

## Anexo 4 - sequência obtida para o fragmento amplificado por PCR do ADN purificado de cultura pura de ST4 e análise Blast

TGTCCTTTTGGCGCACTTCTTGTCTTCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAAAC  
AATGTAATTATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTTGGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAAT  
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTC  
TTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTCTCACGAGACTCGCCTTAAATGATTGGCAGCCGACCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAATTCTTGCACTT  
TGAATCAGCCTTGTT

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
<a href="#">AB693928.1</a>	Stemphylium solani genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S RNA, partial and complete sequence, isolate: F0626	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">HM240841.1</a>	Uncultured Stemphylium clone 1071 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF289150.1</a>	Uncultured fungus clone L046937-122-075-B10-unis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331529.1</a>	Pleospora sp. CNU094030 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331528.1</a>	Pleospora sp. CNU093052 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331527.1</a>	Pleospora sp. CNU093046 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331526.1</a>	Pleospora sp. CNU093040 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331525.1</a>	Pleospora sp. CNU093018 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331524.1</a>	Stemphylium sp. CNU094015 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331523.1</a>	Stemphylium sp. CNU094014 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331522.1</a>	Stemphylium sp. CNU094013 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331521.1</a>	Stemphylium sp. CNU094007 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331520.1</a>	Stemphylium sp. CNU094005 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331519.1</a>	Stemphylium vesicarium isolate CNU094009 internal transcribed spacer 1, partial sequence;	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%

## Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<a href="#">Max score</a>	<a href="#">Total score</a>	<a href="#">Query coverage</a>	<a href="#">E value</a>	<a href="#">Max ident</a>
<a href="#">JF331518.1</a>	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Stemphylium vesicarium isolate CNU094008 internal transcribed spacer 1, partial sequence;	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331517.1</a>	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Stemphylium vesicarium isolate CNU094004 internal transcribed spacer 1, partial sequence;	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331516.1</a>	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Stemphylium vesicarium isolate CNU094003 internal transcribed spacer 1, partial sequence;	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">JF331515.1</a>	5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Stemphylium vesicarium isolate CNU094002 internal transcribed spacer 1, partial sequence;	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">HQ649919.1</a>	Pleospora sp. s062 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">HQ649917.1</a>	Pleospora sp. r356 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">HQ649916.1</a>	Pleospora sp. r318 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%
<a href="#">HQ649915.1</a>	Pleospora sp. r262 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">725</a>	725	100%	0.0	100%