

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLAMENTOS PORTUGUESES DE *Albugo candida* (Pers.) Kuntze

Maria de Lurdes Antunes Jorge

ORIENTADOR: Doutor João Carlos da Silva Dias

JÚRI:

PRESIDENTE: Doutor Carlos Alberto Martins Portas, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

VOGAIS: Doutora Maria Ivone Esteves da Clara, Professora Associada da Universidade de Évora

Doutor João Carlos da Silva Dias, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

"Dissertação apresentada neste Instituto para efeitos de obtenção do grau de Mestre"

MESTRADO EM HORTICULTURA (FRUTICULTURA, OLERICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS)

LISBOA

1998

À memória de meu pai

O Instituto Superior de Agronomia não se responsabiliza pelas doutrinas expressas neste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS	viii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - O PATOGÉNIO	3
2.1 - Taxonomia	3
2.2 - Hospedeiros.....	3
2.3 - Estruturas somáticas e reprodutivas.....	5
2.4 - Reprodução e sistemas de compatibilidade sexual	6
2.5 - Raças fisiológicas.....	9
2.6 - Factores que influenciam o desenvolvimento do fungo.....	10
2.7 - Histopatologia das relações de compatibilidade e de incompatibilidade entre o <i>A. candida</i> e o hospedeiro	13
2.8 - Sintomatologia	17
2.9 - Ciclo da doença.....	18
3 - SISTEMAS SEXUAIS EM ISOLAMENTOS PORTUGUESES DE <i>A.</i> <i>candida</i>	20
3.1 - Introdução.....	20
3.2 - Material e métodos	21

3.2.1 - Obtenção e manutenção dos isolamentos iniciais	21
3.2.2 - Obtenção de isolamentos de uma pústula única.....	23
3.2.3 - Multiplicação de inóculo a partir de pústula única	25
3.2.4 - Manutenção dos isolamentos de pústula única	26
3.2.5 - Cruzamentos efectuados para estudo dos sistemas sexuais	26
3.2.6 - Preparação do material vegetal para observação ao microscópio	27
3.3 - Resultados e discussão	28
4 - PATOGENICIDADE DE ISOLAMENTOS PORTUGUESES DE A.	
<i>candida</i>	32
4.1 - Introdução.....	32
4.2 - Fenótipos de interacção <i>A. candida</i> - hospedeiro e sua avaliação.....	33
4.3 - Material e métodos	37
4.3.1 - Material vegetal	37
4.3.2 - Isolamentos	37
4.3.3 - Delineamento experimental e condução do ensaio.....	37
4.3.4 - Análise dos dados	40
4.4 - Resultados e discussão	42
4.4.1 - Patogenicidade dos isolamentos de <i>A. candida</i> em <i>B. oleracea</i>	42
4.4.1.1 - Interações homólogas <i>B. oleracea</i> - <i>A. candida</i>	62
4.4.1.2 - Interações não homólogas <i>B. oleracea</i> - <i>A. candida</i>	67
4.4.1.3 - Conclusões	72
5 - DISCUSSÃO GERAL.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	84

Maria de Lurdes Antunes Jorge

Mestrado em Horticultura

(Sob orientação do Prof. Associado João Carlos da Silva Dias)

Caracterização de Isolamentos Portugueses de *Albugo candida* (Pers.) Kuntze

RESUMO

Este trabalho é uma primeira tentativa de caracterização de isolamentos portugueses de *Albugo candida* (Pers.) Kuntze, agente causal da ferrugem branca das crucíferas.

Dos treze isolamentos iniciais colhidos em campo (cinco em *Brassica oleracea* L., sete em *B. rapa* L. e um em *Raphanus sativus* L.), obtiveram-se os respectivos isolamentos de pústula única (IPU), e procedeu-se a cruzamentos entre IPU provenientes de hospedeiros homólogos para determinação dos seus sistemas de compatibilidade sexual.

À excepção de dois IPU provenientes de *B. oleracea*, Ac 501 (Esposende) e Ac 502 (Lourinhã), que parecem enquadrar-se num processo de homotalismo secundário, todos os outros são heterotáticos. Os IPU provenientes de *B. rapa* estudados pertencem todos a um mesmo grupo de emparelhamento ("mating type"). Nos IPU provenientes de *B. oleracea* foram observados dois grupos de emparelhamento: i) com Ac 501 (Esposende), Ac 502 (Lourinhã) e Ac 504 (Torres Vedras); e ii) com Ac 503 (Costa de Caparica) e Ac 505 (Loures).

Foram avaliadas ao nível cotiledonar as classes de interacção fenotípica de quarenta amostras de *B. oleracea* e oito dos isolamentos iniciais. O grau de susceptibilidade das amostras aos três isolamentos homólogos testados foi variável. Algumas revelaram susceptibilidade a infecções cruzadas, nomeadamente a couve lombarda "Brusselse Winter", em que mais de 50% dos indivíduos se revelaram susceptíveis aos quatro isolamentos de *B. rapa* testados.

Palavras chave: *A. candida*, *B. oleracea*, grupos de compatibilidade sexual, homotalismo secundário, interacções fenotípicas, infecções cruzadas.

Characterization of portuguese isolates of *Albugo candida* (Pers). Kuntze.

ABSTRACT

The present study is the first characterization of portuguese isolates of *Albugo candida* (Pers.) Kuntze, the causal agent of crucifers white rust.

From thirteen field isolates (five from *Brassica oleracea* L., seven from *B. rapa* L. and one from *Raphanus sativus* L.), single-pustule isolates (SPI) were obtained. The SPI of homologous hosts were crossed to establish their sexual compatibility systems.

Except two SPI from *B. oleracea*, Ac 501 (Esposende) and Ac 502 (Lourinhã), who seems to be secondary homothallic, the others are hetherothallic. All of the SPI isolates from *B. rapa* were examined and belong to the same mating type. In *B. oleracea* isolates, two mating types were observed: i) with Ac 501 (Esposende), Ac 502 (Lourinhã) and Ac 504 (Torres Vedras); and ii) with Ac 503 (Costa de Caparica) and Ac 505 (Loures).

Fourty accessions of different varieties of *B. oleracea* were tested for their phenotypic interaction classes to eight field isolates of *A. candida*, at the cotyledonar stage. The susceptibility of accessions to the three homologous isolates tested was variable. Some, such as "Brusselse Winter" savoy cabbage, revealed susceptibility to cross-infections. In this accession, 50% of the population revealed susceptibility to the four isolates of *B. rapa* tested.

Key words: *A. candida*, *B. oleracea*, mating types, secondary homothallism, phenotypic interactions, cross-infections.

AGRADECIMENTOS

Concluído este estudo não posso deixar de manifestar a minha gratidão e profundo reconhecimento a todas as pessoas e entidades que me apoiaram e tornaram possível a execução deste trabalho.

Ao Professor Associado João Silva Dias, do Instituto Superior de Agronomia, na qualidade de orientador, pelos meios postos à disposição, pelas sugestões e correcções feitas na elaboração desta dissertação, e pela disponibilidade manifestada.

Ao Professor Catedrático António St. Aubyn, do Instituto Superior de Agronomia, e ao Eng. Luís Sampaio Arnaldo, a exercer funções na Casa do Douro, pelo apoio disponibilizado na análise e interpretação estatística dos resultados.

Ao Professor Catedrático Carlos Portas e à Professora Auxiliar Maria Teresa Barros, do Instituto Superior de Agronomia, pela coordenação dadas ao Curso de Mestrado em Horticultura.

Ao Professor Catedrático António de Almeida Monteiro, do Instituto Superior de Agronomia, na qualidade de Coordenador do Projecto CEE nº AIR-CT 920463 "The location and exploitation of genes for pest and disease resistance in european gene bank collections of horticultural brassicas", no âmbito do qual executei a parte experimental desta Tese de Mestrado, por todos os meios disponibilizados e pela forma como sempre incentivou o meu trabalho.

Ao Presidente do Instituto Politécnico de Bragança, Professor Catedrático Dionísio Gonçalves, pela disponibilização dos meios materiais e logísticos que permitiram a execução e conclusão desta Tese, bem como à Direcção da Escola Superior Agrária de Bragança durante o período de 1994 -1998.

Ao Professor Adjunto Pedro Sequeira, da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pelos ensinamentos fornecidos e pela disponibilidade sempre manifestada.

Ao Eng. Arlindo Lima, Assistente do Instituto Superior de Agronomia, pelas sugestões dadas e pela disponibilização de equipamento existente na Secção de Patologia Vegetal.

A todos os que durante o período de 1995-1996 realizaram o seu trabalho experimental no edifício da Horta da Secção de Horticultura do Instituto Superior de Agronomia, e que me apoiaram em momentos difíceis, assim como à Eng. Técnica Luísa Valério, pelo apoio prestado.

Ao Sr. Luís Correia, técnico de informática da Escola Superior Agrária de Bragança, pela disponibilidade sempre manifestada e pelo apoio prestado ao longo da dactilografia do trabalho.

A todos aqueles que não foram citados, mas que de alguma forma me ajudaram e possibilitaram a conclusão deste trabalho, quero expressar os meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

2.1 - Relações citogenéticas entre espécies do género <i>Brassica</i>	3
2.2 - Ciclo de vida de <i>A. candida</i>	7
2.3 - Ultraestrutura do aparelho haustorial de <i>A. candida</i>	15
2.4 - Sintomas do ataque de <i>A. candida</i> em folhas definitivas de <i>B. oleracea</i>	17
2.5 - Ciclo da doença da ferrugem branca das crucíferas	18

CAPÍTULO 3

3.1 - Oósporos de Ac 502 em cotilédones de <i>B. oleracea</i> (x 250).....	31
--	----

CAPÍTULO 4

4.1 - Esquema da escala de avaliação dos fenótipos de interacção <i>A. candida</i> - <i>B. rapa</i> em cotilédones, sete dias após a inoculação	35
4.2 - Escala de avaliação dos fenótipos de interacção <i>A. candida</i> - <i>B. oleracea</i> em cotilédones, dez dias após a inoculação.....	36
4.3 - Distribuição dos fenótipos de interacção NN(a), [(F)N+FN](b), S1(c) e [S2+S3](d) por isolamento de <i>A. candida</i>	44
4.4 a - Projecção dos caracteres no plano definido pelos eixos 1-2	47
4.4 b - Projecção das OTUs no plano definido pelos eixos 1-2	48
4.5 a - Projecção dos caracteres no plano definido pelos eixos 1-3	49
4.5 b - Projecção das OTUs no plano definido pelos eixos 1-3.....	50
4.6 - Fenograma das distâncias entre caracteres ($r = 0,90224$).....	53
4.7 - Fenograma das correlações entre caracteres ($r = 0,85142$).....	54
4.8 - Fenograma das distâncias entre OTUs ($r = 0,89884$).....	55
4.9 - Fenograma das correlações entre OTUs	56

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 2

- 2.1 - Lista de algumas plantas cultivadas pertencentes à família das crucíferas, hospedeiras de *A. candida* 4
- 2.2 - Reacções diferenciais de várias crucíferas a isolamentos de *A. candida* representativos das primeiras seis raças fisiológicas conhecidas deste fungo.....11

CAPÍTULO 3

- 3.1 - Lista dos isolamentos portugueses de *A. candida* utilizados no estudo de caracterização dos sistemas sexuais23
- 3.2 - Presença de oósporos nos treze isolamentos portugueses de *A. candida* colhidos no campo, e nos isolamentos de pústula única deles derivados.....29
- 3.3 - Presença de oósporos em hospedeiros susceptíveis de *B. oleracea* após inoculação com isolamentos de pústula única de *A. candida*, provenientes de *B. oleracea*, em combinações pareadas30
- 3.4 - Presença de oósporos em hospedeiros susceptíveis de *B. rapa* após inoculação com isolamentos de pústula única de *A. candida*, provenientes de *B. rapa*, em combinações pareadas.30

CAPÍTULO 4

- 4.1 - Lista de amostras de *B. oleracea* utilizadas no estudo de patogenicidade dos isolamentos portugueses de *A. candida*.38
- 4.2 - Lista dos isolamentos portugueses de *A. candida* utilizados no estudo da patogenicidade.....39
- 4.3 - Infecções percentuais verificadas nas interacções *B. oleracea* - *A. candida*43
- 4.4 - Variância explicada nos três primeiros eixos (componentes principais)46

4.5 - Distribuição das interações <i>B. oleracea</i> - <i>A. candida</i> nos quatro grupos definidos por Classificação Automática	59
4.6 - Distribuição das interações homólogas isolamento-hospedeiro nos quatro grupos definidos por Classificação Automática.	64
4.7 - Distribuição dos fenótipos de interação <i>A. candida</i> - <i>B. oleracea</i> nos quatro grupos definidos por Classificação Automática e na totalidade das interações.	65
4.8 - Percentagem mínima de plantas incluídas em classes fenotípicas representativas de imunidade e/ou resistência, por cultivar de <i>B. oleracea</i> totalmente incluída nos grupos 2 e 3.....	67
4.9 - Distribuição das interações não homólogas isolamento-hospedeiro nos três grupos definidos por Classificação Automática.	69
4.10 - Distribuição dos fenótipos de interação <i>A. candida</i> - <i>B. oleracea</i> nos três grupos definidos por Classificação Automática e na totalidade das interações.....	70

1 - INTRODUÇÃO

O *Albugo candida* (Pers.) Kuntze é um fungo biotrófico da ordem *Peronosporales* e da classe *Oomycetes* que infecta pelo menos 241 espécies cultivadas e espontâneas da família *Cruciferae* ou *Brassicaceae* (Biga, 1955). Provoca a doença conhecida por ferrugem branca das crucíferas, uma das doenças mais importantes do género *Brassica*, o mais representativo e economicamente mais importante da família das crucíferas.

O género *Brassica* engloba inúmeras e diversificadas culturas, como as couves (*B. oleracea*), os nabos e couves chinesas (*B. rapa*), algumas mostardas (*B. juncea*; *B. carinata*; *B. nigra*), a colza e as rutabagas (*B. napus*), entre outras, importantes quer na alimentação humana como hortaliças, quer como plantas das quais se faz a extracção de óleos. Actualmente o óleo de colza constitui a matéria prima de um combustível usado em motores diesel, o "Diester", prevendo-se a expansão da cultura nos próximos anos (Anónimo, 1996).

Cortet & Prieur (1991) referem a França, o Reino Unido e a Itália, seguidos da Espanha, de Portugal, da Alemanha, da Holanda e da Bélgica, como países europeus onde se registam as maiores áreas de produção de couves, com um total de 223100 ha. Segundo aqueles autores, os diversos tipos de couves cultivados constituem a segunda produção hortícola da União Europeia, a seguir ao tomate. Também em Portugal, há elevada produção e consumo de couves, com destaque para as couves lombarda, repolho e tronchuda (Portas & Costa, 1977), tendo sido no ano de 1977, a produção anual estimada de 700.000 t e o consumo *per capita* de cerca de 65 kg/ano (Portas & Costa, 1977), um dos maiores do mundo (Monteiro & Williams, 1989).

Os prejuízos causados pelos ataques de *A. candida* às brássicas podem ser graves em culturas cujo objectivo é a produção de folhas (algumas couves, couve chinesa e nabos para nabiça), de inflorescências (nomeadamente couve-flor e brócolos) ou de sementes [diversos tipos de mostarda usadas como condimentos (*B. juncea*; *B. nigra*), plantas das quais se extrai óleo de sementes (*B. napus*; *B. rapa*), ou na produção comercial de sementes de brássicas]. Relativamente à importância económica em outras crucíferas que não as do género *Brassica*, Pound & Williams (1963), Cruz *et al.* (1973) e Bonnet (1981), referem que a ferrugem branca pode causar perdas apreciáveis de produção de semente de rabanete (*Raphanus sativus* L.), em países tão afastados entre si como os E.U.A., o Brasil e a França. Segundo Williams (1962), a raça 1, proveniente de *R. sativus*, poderá ainda causar infecções em hospedeiros não homólogos (*B. campestris*).

No Canadá, os ataques de ferrugem branca provocam todos os anos importantes perdas a nível de produção de sementes de *B. campestris* (Bernier, 1972; Petrie, 1973; Verma *et al.*, 1983; Petrie, 1985a; Petrie, 1985b; Petrie *et al.*, 1985) e de *B. juncea* (Petrie, 1985a; Petrie, 1985b; Petrie *et al.*, 1985; Woods & Petrie, 1989), que segundo Bernier (1972) podem atingir os 60%. Na Índia, a incidência e severidade da doença provocada por *A. candida* na cultura de *B. juncea*, quer a nível dos órgãos vegetativos

quer a nível dos florais, tem originado enormes perdas de produção (Bains & Jhooty, 1979; Kolte, 1985; Kumar *et al.*, 1986; Verma & Bhowmik, 1989; Lahiri & Bhowmik, 1993), constituindo um forte impedimento ao aumento desta cultura (Lakra & Saharan, 1991). Neste país, a cultura de *B. campestris* é também seriamente afectada (Lahiri & Bhowmik, 1993; Bisht *et al.*, 1994).

Em Portugal, é cada vez mais frequente encontrar campos infectados nas principais regiões produtoras (Dias, comunicação pessoal). A doença é importante nalgumas cultivares de nabo, couve chinesa, couve-flor, couve de Bruxelas, couve repolho e couves tronchudas. Em *B. oleracea* a doença parece ter ocorrência recente, e a sua incidência têm vindo a aumentar após a abertura das fronteiras e a introdução e cultivo de híbridos F₁ (Dias, comunicação pessoal). Em *B. rapa* a doença é mais antiga, mas a sua incidência parece também ter vindo a aumentar nos últimos anos (Dias, comunicação pessoal).

Na natureza, a reprodução sexual de *A. candida* ocorre em caules e inflorescências hipertrofiadas, e nas folhas senescentes de plantas infectadas. Os oósporos são a forma sob a qual o patogénio assegura a sua sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis (Petrie & Verma, 1974; Petrie, 1975; Verma *et al.*, 1975; Verma & Petrie, 1980). Apesar da importância dos oósporos como fonte de inóculo primário e de variação genética, o sistema sexual de *A. candida* é ainda bastante desconhecido (Liu, 1992), não existindo estudos sobre a caracterização dos sistemas sexuais e patogenicidade de isolamentos portugueses de *A. candida*.

O objectivo do presente trabalho foi a realização da primeira caracterização do sistema sexual e da patogenicidade de isolamentos portugueses de *A. candida*.

2 - O PATOGÉNIO

2.1 - Taxonomia

O *Albugo candida* (Pers.) Kuntze pertence à família *Albuginaceae*, ordem *Peronosporales* e classe *Oomycetes*. O género *Albugo* é o único da família *Albuginaceae*, e abrange cerca de 30 espécies de parasitas obrigatórios (Webster, 1980).

2.2 - Hospedeiros

O *A. candida* é um fungo biotrófico muito especializado que ataca plantas da família das crucíferas e das caparidáceas (Mukerji, 1975; Gardé & Gardé, 1981).

Segundo Biga (1955), este patogénio tem capacidade de infectar 241 espécies, distribuídas por 63 géneros da família das crucíferas, nas quais provoca a doença conhecida por ferrugem branca ("white rust" ou "white blister", em língua inglesa). Entre estas espécies encontram-se plantas espontâneas e cultivadas, assumindo estas últimas grande importância em termos económicos. Entre as espécies cultivadas infectadas por *A. candida*, encontram-se muitas pertencentes ao género *Brassica*, no qual se incluem plantas utilizadas como hortaliças, condimentares, forrageiras, oleaginosas e até como ornamentais (Quadro 2.1).

Apesar da grande variabilidade genética e morfológica existente entre as espécies do género *Brassica*, existem entre elas relações citogenéticas. As relações citogenéticas existentes entre seis espécies do género *Brassica* foram esquematizadas por U (U, 1935), através de um triângulo (Figura 2.1).

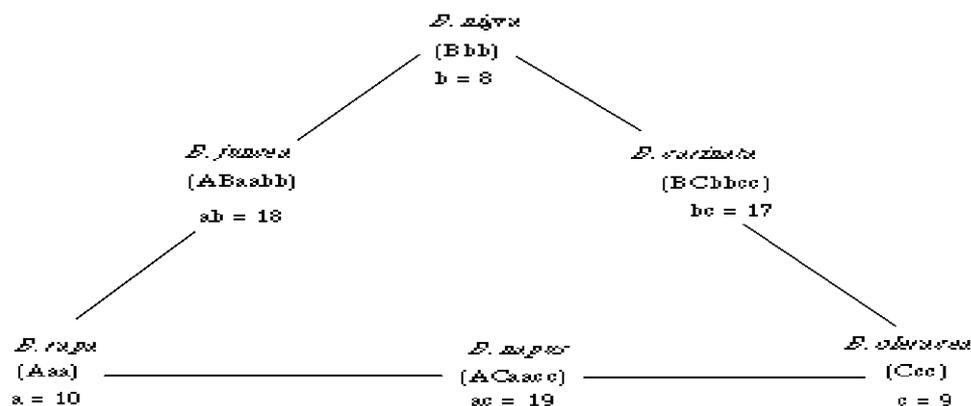


Fig. 2.1 - Relações citogenéticas entre espécies do género *Brassica* (U, 1935).

As letras maiúsculas referem-se ao genoma citoplasmático e as minúsculas ao genoma nuclear.

Quadro 2.1 - Lista de algumas plantas cultivadas pertencentes à família das crucíferas, hospedeiras de *A. candida*.

Nome científico¹	Nome vulgar¹
<i>Armoracia rusticana</i> Gaertn., Mey. & Scherb.	Rabanete selvagem
<i>Brassica carinata</i> A. Braun	Mostarda da Etiópia
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern. & Coss.	Mostarda, mostarda vermelha, mostarda da Índia
<i>Brassica napus</i> L. var. <i>napobrassica</i> (L.) Reichb.	Rutabaga, nabo da Suécia, nabo amarelo
<i>Brassica napus</i> L. var. <i>napus</i>	Colza, couve-nabo, couve nabiça
<i>Brassica nigra</i> Koch.	Mostarda negra
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> DC.	Couve galega, couve de folhas, couve cavaleira
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.	Couve flor
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.	Couve repolho, couve roxa
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>costata</i> DC. ²	Couve portuguesa, couve tronchuda, couve penca
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i> Zenk.	Couve-de-Bruxelas
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck	Brócolos
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>sabauda</i> L.	Couve lombarda
<i>Brassica rapa</i> L. ³ var. <i>rapa</i> (DC.) Metzg.	Nabo, nabiça, nabo greleiro
<i>Brassica rapa</i> L. ³ var. <i>pekinensis</i> (Lour.) Olsson	Couve Chinesa
<i>Brassica rapa</i> L. ³ var. <i>chinensis</i>	Packchoi
<i>Raphanus sativus</i> L.	Rabanete, rábano
<i>Sinapis alba</i> L. ⁴	Mostarda branca

¹ De acordo com Kays & Dias (1995, 1996); ² Sinónimo de *B. oleracea* var. *tronchuda* Bailey;³ Sinónimo de *B. campestris* L.; ⁴ Sinónimo de *B. hirta*.

2.3 – Estruturas somáticas e reprodutivas

O micélio é cenocítico, sendo o talo composto por hifas não septadas que se ramificam livremente, delimitadas por uma parede constituída por celulose. Apenas nas hifas que servem de suporte aos órgãos reprodutivos há formação de septos (Alexopoulos & Mims, 1979). Os haustórios surgem como protuberâncias da extremidade das hifas somáticas intercelulares. São pequenas estruturas esféricas e anucleadas, constituindo órgãos especializados de absorção.

Segundo Alexopoulos & Mims (1979), o *A. candida* é um fungo eucárpico, ou seja, os órgãos reprodutivos formam-se apenas em determinadas porções de talo, enquanto as restantes prosseguem a sua actividade somática normal.

A reprodução nos fungos pode ser sexual (quando envolve a união de dois núcleos) ou assexual, envolvendo estruturas reprodutivas diferentes.

No *A. candida*, os esporos de natureza assexual (esporangiósporos) formam-se no interior de estruturas em forma de saco, designadas por esporângios, formadas na extremidade de hifas férteis, designadas esporangióforos. Os esporângios abrem à maturação, libertando os esporos. Os esporangiósporos são hialinos, têm uma forma que vai desde esférica a oval - oblonga, e são unicelulares. São esporos que apresentam mobilidade devido à presença de dois flagelos, designando-se neste caso por zoósporos.

De acordo com Williams (1985), os esporângios de *A. candida* são hialinos, têm uma forma globosa a oval, com dimensões que se situam entre os 12 e 18 μm de diâmetro, e encerram 4 a 8 zoósporos no seu interior. Formam cadeias basípetas a partir de esporangióforos com dimensões de 30 a 45 μm por 15 a 18 μm , e em forma de clava. Segundo Vanterpool (1959), o número de zoósporos presentes por esporângio de *A. candida* varia entre 4 e 12, sendo expelidos deste em avançado estado de diferenciação, e a partir de uma vesícula séssil.

As estruturas reprodutivas de natureza sexual são os gametângios. Nos *Peronosporales*, os gametângios feminino e masculino são morfologicamente muito diferentes, sendo o primeiro designado por oogónio e o último por anterídeo. A meiose é gametangial (Sansome & Sansome, 1974; Caten & Day, 1977), levando à formação de núcleos haplóides na oosfera e no anterozóide - gâmetas feminino e masculino, respectivamente.

A reprodução sexual pode ocorrer entre oogónios e anterídeos bem diferenciados da mesma ou de diferentes hifas, desde que haja compatibilidade entre os gâmetas.

Segundo Alexopoulos & Mims (1979), em *A. candida* os gametângios são formados perto um do outro e surgem na parte terminal das hifas somáticas. Ambos são inicialmente multinucleados, mas apenas um dos núcleos se revela funcional em cada um deles. O oogónio, geralmente globoso, contém uma oosfera envolvida por uma camada de periplasma.

Após a fertilização, a oosfera desenvolve uma espessa parede e modifica-se, originando o oósporo - esporo sexual dos oomicetas. O periplasma é utilizado como substrato para o desenvolvimento do oósporo. É também a partir do periplasma que se produzem os espessamentos e ornamentações da parede do oósporo. Esta é constituída por três camadas, podendo a externa ser lisa ou mais ou menos esculpida e ornamentada; pode ser espinhosa, verrugosa, cerosa, estriada ou marcada de outra forma. O aspecto exterior desta parede permite fazer a distinção entre várias espécies do género *Albugo* e distinguir o género *Albugo* de outros pertencentes à classe dos oomicetas, sendo um importante factor de classificação taxonómica (Alexopoulos & Mims, 1979).

2.4 – Reprodução e sistemas de compatibilidade sexual

O *A. candida* apresenta um ciclo de vida haplobionte-diplóide (Fig. 2.2), com reprodução sexual através de oósporos, e zoósporos biflagelados como esporos de natureza assexual (Liu, 1992).

Segundo Alexopoulos & Mims (1979), a reprodução assexual adquire maior importância na propagação das espécies por originar grande número de indivíduos e, sobretudo, por o ciclo assexual se poder repetir sucessivamente durante a estação de crescimento, enquanto que o ciclo sexual de muitos fungos apenas ocorre uma vez por ano.

No entanto, no caso do *A. candida*, a reprodução sexual acaba por ser de primordial importância para a sobrevivência da espécie durante a estação desfavorável e para a iniciação da doença ano após ano (Liu, 1992), como se referirá mais adiante ao ser descrito o ciclo da doença.

As etapas envolvidas em cada um dos processos são as seguintes:

i) Reprodução assexual

O micélio cresce no interior do hospedeiro, alastrando entre as células deste e penetrando-as por intermédio de haustórios (Figura 2.2 A).

Em *A. candida*, após ter havido crescimento e ramificação do micélio e se ter atingido um determinado estágio de maturação, dá-se a produção de esporangióforos em forma de clava, a partir das extremidades de um grande número de hifas, situadas em determinada localização.

Os esporangióforos surgem na proximidade uns dos outros, formando sólidas camadas, imediatamente abaixo da epiderme do hospedeiro. Quando atingem um determinado estágio de crescimento, surgem esporângios nas suas extremidades (Figura 2.2 B). Cada esporangióforo origina vários esporângios, que são produzidos sucessivamente, formando-se cada um abaixo do formado anteriormente, de tal forma que a cadeia de esporângios é formada basipetamente, situando-se o esporângio mais velho no topo da cadeia e o mais novo na base (Khan, 1977).

Após a sua libertação dos esporângios, os zoósporos apresentam grande mobilidade. Posteriormente enquistam e germinam rapidamente através de um tubo germinativo que, por desenvolvimento nos tecidos do hospedeiro, origina o micélio (Figura 2.2 F e G).

ii) Reprodução sexual

A reprodução sexual envolve a união de dois núcleos compatíveis. Abrange tipicamente três fases distintas:

a) plasmogamia, em que a união de dois protoplastos leva à proximidade de dois núcleos na mesma célula.

b) cariogamia, em que ocorre a fusão desses dois núcleos.

c) meiose, em que o número de cromossomas é reduzido à forma haplóide, com formação de quatro núcleos.

Segundo Alexopoulos & Mims (1979), os gametângios de *A. candida* são formados perto um do outro, no interior dos tecidos do hospedeiro (Figura 2.2 H), surgindo na parte terminal de hifas somáticas. Quando ocorre o contacto lateral entre os gametângios, dá-se a formação do tubo fertilizante no anterídeo. Este tubo é empurrado através da parede do oogónio e atravessa o periplasma até atingir a oosfera (Figura 2.2 I). O núcleo masculino do anterídeo funde-se com o núcleo funcional da oosfera (Figura 2.2 J). O núcleo do zigoto resultante divide-se mitoticamente sucessivas vezes, enquanto o oósporo desenvolve uma parede espessa e ornamentada (Figura 2.2 K). Os oósporos germinam libertando zoósporos, que eventualmente enquistam e germinam por tubos germinativos (Vanterpool, 1959), completando o ciclo de vida.

Apesar do referido anteriormente, a reprodução sexual só é possível quando envolve a união de dois gâmetas compatíveis, ou seja, um fungo pode ser monóico ou hermafrodita, isto é, apresentar os dois sexos no mesmo talo, e não ter capacidade de ser auto-fértil. Segundo Alexopoulos & Mims (1979), os fungos podem ser classificados quanto à compatibilidade sexual, em :

i) Homotáticos (ou auto-férteis): são os fungos cujo talo é sexualmente auto-fértil, podendo reproduzir-se sexualmente sem a presença de outro talo.

ii) Heterotáticos (ou auto-estéreis): são aqueles cujo talo é sexualmente auto-estéril exigindo, para a conjugação, a presença de outro talo compatível. Os fungos heterotáticos podem ainda ser subdivididos em dois grupos:

– Heterotáticos bipolares ou unifactoriais: são os fungos cuja compatibilidade é regulada por um par de alelos Aa. Cada núcleo gamético apresenta um dos dois alelos (A ou a), sendo compatíveis apenas os talos cujos núcleos apresentam os alelos opostos que compõem este par Mendeliano, formando-se deste modo apenas zigotos do tipo Aa.

– Heterotáticos tetrapolares ou bifactoriais: são fungos cuja compatibilidade é regulada por dois pares de alelos, Aa e Bb. Deste modo, nos fungos heterotáticos tetrapolares podem existir talos com quatro tipos de constituições alélicas diferentes -

AB, Ab, aB e ab, originando quatro grupos de conjugação ("mating types"). Somente os talos cuja combinação origine um zigoto AaBb serão compatíveis e inter-férteis.

iii) Homotáticos secundários: nalguns fungos heterotáticos bipolares há por vezes incorporação de dois núcleos de emparelhamento diferentes (A e a) durante a formação de esporos. O talo originado por germinação destes esporos comporta-se como homotático e é por conseguinte auto-fértil, originando um processo de homotalismo secundário.

Mais considerações sobre os sistemas sexuais de *A. candida* serão feitas no §.3.1.

2.5 – Raças fisiológicas

Como parasita obrigatório que é, o *A. candida* necessita de protoplasma vivo do hospedeiro para a sua sobrevivência. Segundo Alexopoulos & Mims (1979), de entre os parasitas obrigatórios, há alguns que têm um elevado grau de especialização para o hospedeiro, atacando só determinados géneros de plantas da mesma família, determinadas espécies de um género ou mesmo determinadas variedades de uma espécie. Parece ser esse o caso de *A. candida*.

A especialização fisiológica de *A. candida* é de há muito conhecida e foram identificadas até hoje pelo menos 10 raças fisiológicas: raça 1 em *Raphanus sativus* L., raça 2 em *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss., raça 3 em *Armoracia rusticana* (Gaertn.; Mey. & Scherb.), raça 4 em *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., raça 5 em *Sisymbrium officinale* (L.) Scop., raça 6 em *Rorippa islandica* (Oeder) Borba's, raça 7 em *Brassica rapa* L. (sinónimo de *B. campestris* L.), raça 8 em *Brassica nigra* (L.) Koch, raça 9 em *Brassica oleracea* L. e raça 10 em *Sinapis arvensis* L. (Pound & Williams, 1963; Verma *et al.*, 1975; Delwiche & Williams, 1977; Pidskalny & Rimmer, 1985; Hill *et al.*, 1988).

Mas, embora os isolamentos de *A. candida* provoquem numa maneira geral, sintomas mais severos nas espécies das quais foram provenientes, revelando uma elevada especialização fisiológica, podem também ser capazes de causar infecção em alguns genótipos de outras espécies da família das crucíferas (Pound & Williams, 1963; Petrie, 1988; Liu & Rimmer, 1991). Um exemplo pode ser observado no Quadro 2.2. Os hospedeiros homólogos, dos quais os isolamentos foram provenientes, mostram ser os melhores diferenciais para cada uma das raças (Pound & Williams, 1963), apesar de se detectarem fenómenos de infecções cruzadas nalgumas espécies relativamente a alguns dos isolamentos testados. Em *R. islandica*, embora a maior infecção percentual seja devida à raça homóloga de *A. candida* (raça 6), verifica-se a existência de infecções, ainda que em menor grau, causadas pelas raças 3 e 4, especialmente pela primeira. Algumas das crucíferas testadas mostraram ser susceptíveis a mais do que uma raça, revelando pouco interesse como diferenciais (*B. hirta*). Plântulas de *S. officinale* revelaram uma susceptibilidade não específica, que acaba por desaparecer com o avançar do ciclo. Segundo Pound & Williams (1963), este fenómeno foi analogamente

verificado em outras crucíferas, levando a crer que os factores responsáveis pela resposta diferencial das espécies hospedeiras às raças fisiológicas de *A. candida* apenas desempenhem totalmente o seu papel com a maturação da planta.

Segundo Pound & Williams (1963), nas espécies em que se detectou haver infecções cruzadas, as plantas susceptíveis evidenciaram menor intensidade de esporulação, esporulação mais dispersa e/ou mais confinada à página superior dos cotilédones, quando comparada com a existente nas plantas susceptíveis pertencentes a hospedeiros homólogos. Nestes, a esporulação abrangia uma extensão considerável e localizava-se sobretudo na página inferior dos cotilédones (Pound & Williams, 1963). Este facto poderá indicar haver reacções de compatibilidade apenas parciais entre raças fisiológicas de *A. candida* e hospedeiros não homólogos (Pound & Williams, 1963).

2.6 - Factores que influenciam o desenvolvimento do fungo

A sobrevivência e desempenho da maior parte dos fungos fitopatogénicos depende em grande parte das condições prevalentes de temperatura e humidade relativa, e da presença de água no meio (Agrios, 1988).

Segundo Agrios (1988), a sobrevivência do micélio está condicionada à existência de uma determinada gama de temperaturas, e ao contacto com superfícies de água livre existentes à superfície ou no interior do hospedeiro. Exceptuam-se alguns esporos de resistência que conseguem suportar gamas de temperatura e de higrometria mais amplas, permitindo a perpetuação dos fungos fitopatogénicos durante os períodos de frio invernal ou de secura estival. Apesar disso, estas estruturas também só germinarão quando expostas a condições de temperatura e humidade favoráveis.

No caso específico dos fungos produtores de zoósporos, nos quais o *A. candida* se inclui, é necessária a presença de água no estado líquido para que ocorra o movimento dos zoósporos e para que estes causem infecção. No entanto, os zoósporos apenas conseguem percorrer por si próprios pequenas distâncias, que não excederão alguns centímetros (Agrios, 1988). A disseminação de esporos entre plantas ou partes da mesma planta depende de agentes tais como o vento, água, insectos, outros animais ou o próprio homem (Agrios, 1988). O vento é provavelmente o agente disseminador de esporos mais importante podendo-os transportar a grandes distâncias. No caso dos fungos portadores de zoósporos, a água pode assumir um papel mais relevante do que o próprio vento (Agrios, 1988).

Quadro 2.2 - Reações diferenciais de várias crucíferas a isolamentos de *A. candida* representativos das primeiras seis raças fisiológicas conhecidas deste fungo (Adaptado de Pound & Williams, 1963).

Plantas diferenciadoras	Hospedeiro e reacções diferenciais ¹											
	Raça 1 <i>Raphanus sativus</i>		Raça 2 <i>Brassica juncea</i>		Raça 3 <i>A Armoracia rusticana</i>		Raça 4 <i>Capsella bursa-pastoris</i>		Raça 5 <i>Sisymbrium officinale</i>		Raça 6 <i>Rorippa islandica</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>R. sativus</i> "Early Scarlet Globe"	76	0	0	110	0	118	0	117	0	88	0	84
<i>B. juncea</i> "Southern Giant Curled"	0	184	92	0	0	160	0	186	0	151	0	155
<i>A. rusticana</i>	0	33	0	41	46	0	0	57	0	65	0	36
<i>C. bursa - pastoris</i>	0	144	0	172	0	156	315	0	0	190	0	310
<i>S. officinale</i>	0	360	0	260	0	284	0	390	218	2	0	325
<i>S. officinale</i> ²	70	124	145	3	145	6	52	210	183	3	10	232
<i>R. islandica</i>	0	284	0	170	20	68	3	203	0	120	316	6
<i>B. hirta</i> "Canadian Yellow"	45	0	94	0	59	0	64	0	46	13	8	35
<i>Eruca sativa</i>	0	78	0	73	0	63	0	53	0	51	0	56
<i>Nasturtium officinale</i>	0	181	0	151	8	128	0	106	0	126	0	163

¹ + = presença de esporulação; - = ausência de esporulação. Os números em cada coluna por baixo destes sinais representam o número de plantas testadas que apresentaram um dos dois tipos de resposta. A inoculação foi feita na fase de cotilédones completamente expandidos.

² Nas plantas testadas, os cotilédones ainda não estavam completamente expandidos.

Lakra & Saharan (1988) verificaram que a máxima germinação de esporângios de *A. candida*, *in vitro*, ocorria a temperaturas de 12 a 14° C, o que está de acordo com os valores obtidos por Raabe & Pound (1952) para *A. occidentalis* Wilson.

Liu & Rimmer (1990), usando *B. napus* verificaram haver em média um encurtamento de 2-3 dias no período de incubação de *A. candida*, quando o desenvolvimento do fungo ocorria em condições de termoperíodo de 22/17°C, relativamente às de 15/10°C. Os maiores níveis de infecção também ocorriam para valores do primeiro intervalo de temperaturas, independentemente da concentração de inóculo usada, revelando-se estas condições mais favoráveis ao crescimento do fungo. Segundo estes autores, os níveis de infecção aumentam com a concentração de inóculo existente, independentemente do genótipo, da idade e estado de desenvolvimento da plântula.

Dickinson & Crute (1974) obtiveram resultados análogos em alface, relativamente à infecção por *Bremia lactucae* Regel, um outro oomiceta. De acordo com estes autores, quanto maior a concentração de inóculo existente, menor será o período de incubação e maior a intensidade de esporulação observados. Ainda de acordo com Dickinson & Crute (1974), o grau de severidade da doença provocada por *B. lactucae* decrescia com a idade e estado de desenvolvimento das plântulas testadas. Plantas mais jovens e/ou menos desenvolvidas apresentariam maior susceptibilidade à infecção e facilitariam a progressão do parasita. Segundo Dickson & Petzoldt (1993), a resistência de algumas linhas de brócolos (*B. oleracea* var. *italica*) ao míldio das crucíferas (*Peronospora parasitica* Pers. ex. Fr.) depende do desenvolvimento da planta, sendo a resistência na fase de plântula independente da resistência na fase adulta⁽¹⁾. Linhas de brócolo cujas plantas se revelaram altamente susceptíveis na fase de plântula (aos 10 dias) tornaram-se progressivamente menos susceptíveis à medida que a avaliação ia sendo feita em plantas com maior grau de desenvolvimento (20, 30, 40 e 50 dias). Nalgumas linhas a diferença entre os índices de doença observados aos 10º e 50º dias era altamente significativa⁽²⁾.

Também Liu & Rimmer (1990), trabalhando com *A. candida* em *B. napus*, verificaram níveis médios de infecção superiores quando a inoculação das plantas era feita à segunda folha verdadeira, quando comparados com os obtidos quando a inoculação era feita à quinta folha. Neste caso, também a percentagem de área foliar infectada decrescia com a idade das plantas. Este aumento da resistência com a idade das plantas foi detectado em outros membros da classe dos oomicetas, nomeadamente em *Peronospora* spp. (Leach, 1931; Clayton; 1945; Mence & Pegg, 1971) e em *Bremia* sp. (Erwin, 1920; Schultz & Röder, 1938), admitindo Dickinson & Crute (1974) ser este fenómeno universal a nível de cultivares susceptíveis, e em órgãos ainda não senescentes. No entanto, esta tendência geral não é uma regra absoluta. Williams & Pound (1963) referem haver linhas de *R. sativus* "China Rose Winter" que apresentam

(1) Considerando adulta uma planta com oito ou mais folhas verdadeiras

(2) Numa das linhas, onde se verificaram as diferenças mais significativas, o índice de doença passava de 9,0 ± 0 ao 10º dia, para 1,7 ± 0,51 ao 50º dia, usando uma escala de aumento de susceptibilidade de 1 a 9, em que 1 = sem sintomas e 9 = esporulação intensa e uniforme na página inferior das folhas.

resistência à raça 1 de *A. candida* na fase cotiledonar e susceptibilidade à medida que a planta evolui no seu desenvolvimento.

Em plantas com o mesmo estado de desenvolvimento pode haver uma acentuada influência das condições do meio, nomeadamente luz, nutrientes e temperatura sobre a progressão da doença (Dickinson & Crute, 1974). Deficiências nutritivas afectam indubitavelmente a capacidade do hospedeiro para produzir substâncias alimentares, o que constitui uma boa razão para o fraco desenvolvimento do parasita, nomeadamente a nível dos tecidos senescentes (Dickinson & Crute, 1974).

Independentemente das condições ambientais, há variabilidade nos hospedeiros, revelando-se alguns génotipos mais susceptíveis à infecção do que outros. Segundo Liu & Rimmer (1990), nas variedades de *B. napus* em que há uma camada epicuticular de ceras, há tendência para haver repulsão de água, tornando-as desta forma menos vulneráveis à acção de *A. candida*.

Fan *et al.* (1983) referem que nas linhas de *B. napus* susceptíveis à raça 7 de *A. candida*, "2282-9" e "CGL", as gotículas resultantes da pulverização das folhas com uma suspensão de zoósporos de *A. candida* não aderiam à superfície da folha, concentrando-se na base, junto à nervura central, zona onde posteriormente se localizavam as pústulas de ferrugem branca. Os mesmos autores, ao inocularem folhas de *B. campestris* "Torch", nas quais as gotículas aderiam à totalidade da superfície das folhas, observaram a formação de pústulas que cobriam a área generalizada das folhas, obtendo assim em cultivares susceptíveis diferentes graus de área foliar infectada, apenas devido a diferenças existentes na camada cerosa das folhas.

Tewari & Skoropad (1976), ao analisarem a diferença no grau susceptibilidade de *B. campestris* "Torch" e *B. napus* "Midas" a *Alternaria brassicae*, consideraram ser causa de maior susceptibilidade da primeira o facto de ter células epidérmicas com uma quantidade bastante limitada de ceras. Também Wilson & Jarvis (1963) relacionaram a susceptibilidade de uma cultivar de brócolo a *A. candida* com a ausência de extrusões cerosas a nível foliar. As diferenças existentes entre espécies a nível das características da superfície foliar podem, em certa medida, justificar diferenças de áreas foliar infectada (Fan *et al.* 1983).

2.7 - Histopatologia das relações de compatibilidade e de incompatibilidade entre o *A. candida* e o hospedeiro.

O processo de infecção devido ao *A. candida* inicia-se quando os zoósporos emitem um tubo germinativo, que penetra nos tecidos do hospedeiro através dos estomas (Williams, 1985). O crescimento do micélio é intercelular (Alexopoulos & Mims, 1979).

Os haustórios que o fungo faz penetrar nas células hospedeiras através de um minúsculo poro feito na parede celular, são protuberâncias das hifas somáticas intercelulares e estabelecem o contacto directo entre a parede celular do fungo e o

protoplasma do hospedeiro (Fig. 2.3). Quando um haustório penetra a célula hospedeira não provoca perfuração da membrana plasmática, mas simplesmente a sua invaginação (Coffey, 1975). Os haustórios de *A. candida* são pequenas estruturas esféricas e anucleadas, constituindo órgãos especializados de absorção, cujas características ultraestruturais são descritas por Berlin & Bowen (1964) e por Coffey (1975). Em relações compatíveis *A. candida* - hospedeiro, existem em elevado número de haustórios por célula parasitada (Williams, 1985) A sua principal função parece ser a de aumentar a superfície de absorção do fungo, e o seu aparecimento é provavelmente uma resposta ao estímulo dos nutrientes existentes na célula do hospedeiro (Alexopoulos & Mims, 1979).

Numa relação de parasitismo obrigatório, o bom estabelecimento do parasita depende do desempenho do hospedeiro relativamente ao fornecimento de nutrientes que são essenciais ao crescimento do fungo, e que ele não é capaz de produzir por si próprio (Berlin & Bowen, 1964). No entanto, segundo Alexopoulos & Mims (1979), as moléculas de nutrientes têm de ter dimensões suficientemente pequenas para poderem atravessar a parede celular e a membrana do fungo. O fungo tem de ter capacidade de as transformar em moléculas mais pequenas, para poder utilizá-las e fá-lo através da secreção de enzimas extracelulares, que fazem a digestão dos nutrientes exteriormente ao talo.

Pouco se sabe acerca dos mecanismos responsáveis pelo estabelecimento e manutenção das relações de parasitismo *A. candida* - hospedeiro, ou da forma como uma reacção de incompatibilidade é determinada quando o fungo encontra cultivares hospedeiras portadoras de genes de resistência (Liu & Rimmer, 1988). Segundo estes autores, estudos histológicos efectuados na sequência de inoculações laboratoriais em cultivares compatíveis e incompatíveis podem revelar fases críticas no início do processo de infecção e fornecer indicações sobre os mecanismos de resistência envolvidos.

De acordo com Liu & Rimmer (1988) e Liu, Rimmer & Scarth (1989), o processo de infecção provocado pela raça 7 de *A. candida* é idêntico em cultivares susceptíveis e resistentes de *B. napus*, e também idêntico ao verificado em cultivares susceptíveis de *B. campestris*⁽¹⁾, quer em termos de sequência das etapas envolvidas quer do tempo ao fim da qual estas são atingidas, até à fase de formação do primeiro haustório no interior das células do hospedeiro. Verma *et al.* (1975), trabalhando com hospedeiros com diferentes graus de susceptibilidade à raça 7 de *A. candida* (*B. campestris* "Span", susceptível; *B. hirta* Moench, moderadamente susceptível e *B. napus* "Zephyr", resistente), e com *B. juncea* "Southern Giant Curled", susceptível à raça 2, chegaram também à conclusão de que até à formação do primeiro haustório o processo de infecção decorria de forma idêntica. Isto está de acordo com os resultados obtidos por Williams & Pound (1963) ao analisarem o processo de infecção causado pela raça 1 de *A. candida* em *R. sativus* "China Rose Winter", resistente à raça 1 de *A. candida*.

⁽¹⁾ Foram testadas plantas de *B. napus* "Regent" (resistente), das linhas de *B. napus* "2282-9" e "CGL" (susceptíveis) e plantas de *B. campestris* "Torch" (susceptível).

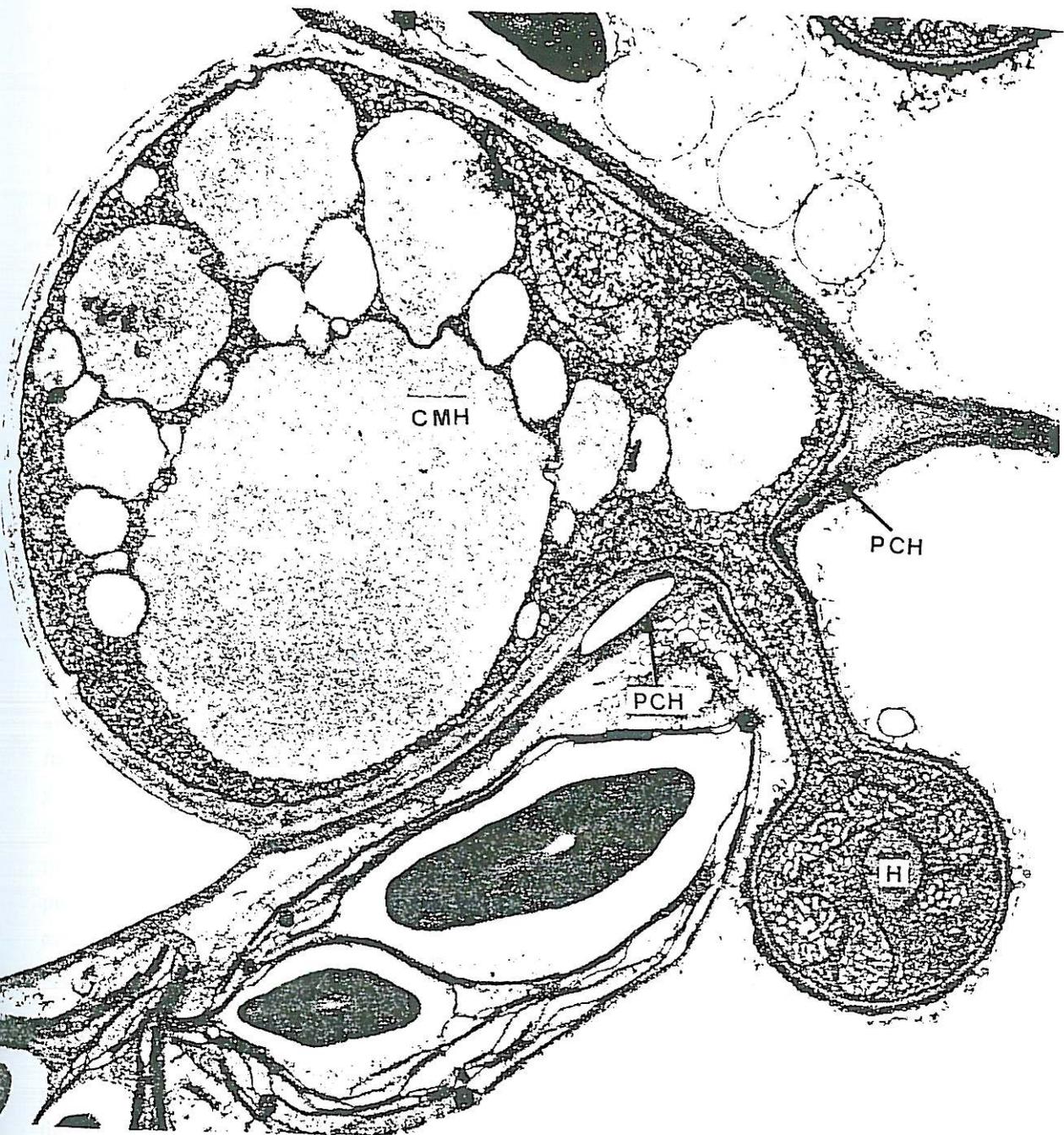


Fig.2.3 - Ultraestrutura do aparelho haustorial de *A.candida* (Coffey, 1975).

CMH - célula-mãe do haustório; H - haustório; PCH - parede celular do hospedeiro.

De acordo com Verma *et al.* (1975), nos hospedeiros susceptíveis o desenvolvimento do micélio é extraordinariamente rápido após ter ocorrido a formação do primeiro haustório. As hifas desenvolvem-se no interior das células em paliçada do mesófilo, segundo espirais descendentes, penetrando as células com um número variável de haustórios, tendo sido contabilizados até 14 por célula parasitada, num período de 96 horas após a inoculação. O número de ramificações das hifas foi também superior em tecidos de hospedeiros susceptíveis, chegando a ocupar a quase totalidade dos espaços intercelulares disponíveis sem que tivesse havido rotura das células do hospedeiro, o que pressupõe um parasitismo altamente especializado de *A. candida* (Verma *et al.*, 1975). Na cultivar resistente de *B. napus* "Zephyr", a taxa de penetração do fungo foi muito mais lenta e o número de haustórios formados por célula parasitada menor, normalmente apenas um. A volta destes haustórios começou a iniciar-se de imediato a formação de encapsulações, raramente observadas em redor dos haustórios formados em células de hospedeiros susceptíveis. Dois a três dias após a inoculação cessou o desenvolvimento do micélio naquela cultivar resistente de *B. napus*.

O estabelecimento e manutenção de uma reacção de compatibilidade entre *A. candida* e o hospedeiro parece basear-se na formação bem sucedida do primeiro haustório (Verma *et al.*, 1975). A similaridade de sequência do processo em hospedeiros susceptíveis e resistentes até esta fase, sugere que a "resistência" surte efeitos apenas a partir do momento em que se estabelece o contacto entre a extremidade da hifa primária do fungo e a célula do mesófilo do hospedeiro. Segundo Liu & Rimmer (1988), as primeiras 24 horas após inoculação são provavelmente o período crítico para o estabelecimento do parasita. De acordo com estes autores, 2 a 3 horas após se ter efectuado a inoculação da raça 7 de *A. candida* em linhas resistentes e em linhas susceptíveis de *B. napus*, os zoósporos enquistados produziram tubos germinativos, que iniciaram a penetração dos estomas. O comprimento dos tubos germinativos não diferiu significativamente nas linhas susceptíveis e resistentes testadas, quatro horas após a inoculação, levando a crer que não houvessem barreiras morfológicas ou fisiológicas que pudessem contrariar a germinação dos zoósporos enquistados e a subsequente penetração dos estomas (Liu & Rimmer, 1988). A formação dos primeiros haustórios foi detectada 8 horas após a inoculação em todas as linhas testadas, quer fossem resistentes quer susceptíveis.

Segundo Liu & Rimmer (1988), as diferenças encontradas entre reacções de compatibilidade e de incompatibilidade ocorreram cerca de 12 horas após inoculação, posteriormente à formação dos haustórios. Enquanto que nas linhas susceptíveis o alongamento das hifas primárias ocorreu rapidamente num período de 12 a 36 horas após a inoculação, originando hifas secundárias a nível dos locais onde tinha ocorrido a formação dos primeiros haustórios, tornando-se a partir deste momento o crescimento extraordinariamente rápido. As células infectadas do hospedeiro resistente tornaram-se rapidamente necróticas após se ter dado a formação do primeiro haustório (Liu *et al.*, 1989). Tal como foi referido por Verma *et al.* (1975), o crescimento do fungo em cultivares resistentes não aumentou significativamente, cessando num período de 12 a 48 horas após inoculação.

Durante esse período de 12 a 48 horas após inoculação, o número de células infectadas que apresentavam necroses aumentou de 26 para 95%. As células adjacentes ou subjacentes às necróticas, permaneceram sãs. Segundo Liu *et al.* (1989), numa cultivar resistente de *B. napus* cada hifa produziu em média um haustório, enquanto que nas linhas susceptíveis testadas o número de haustórios por local de infecção foi aumentando rapidamente até atingir o valor máximo de 44, detectado ao fim de 84 horas. Liu & *et al.* (1989) não puderam prosseguir esta contabilização devido à grande ramificação do micélio no interior do hospedeiro. A colonização quase total do espaço intercelular do hospedeiro pelo micélio do fungo foi detectado 96 horas após inoculação, e também aqui não se verificaram quaisquer roturas nas células colonizadas. Nesta fase os esporangióforos começaram a atingir a página inferior dos cotilédones, tornando-se as pústulas macroscopicamente visíveis cinco a seis dias após a inoculação.

2.8 - Sintomatologia

Os sintomas provocados pelo ataque de *A. candida* são apenas visíveis a nível da parte aérea das plantas (Smith *et al.*, 1988). Este patogénio pode causar dois tipos de infecção: i) localizada, através da invasão directa de folhas, caules e flores; e ii) a generalizada ou sistémica, com formação de pústulas em toda a planta, originando o atrofiamento generalizado da mesma (Horst, 1990). As plantas infectadas recobrem-se de pústulas brancas, pulverulentas (daí, a designação de ferrugem branca - "white rust"), semelhantes a borbulhas ("white blister"), e frequentemente apresentam hipertrofias, distorção e pigmentação anormal dos tecidos infectados (Smith *et al.*, 1988).

Nas folhas, as camadas de esporângios formadas sob a epiderme das páginas superior e inferior aparecem com um aspecto semelhante a uma massa de pústulas brancas, que podem variar na forma e na extensão, podendo confluir e formar extensas manchas. Na Figura 2.4 apresenta-se um dos aspectos da sintomatologia desta doença, em que na página superior das folhas aparecem frequentemente zonas amareladas, correspondentes à existência de pústulas na página inferior. As folhas infectadas senescem prematuramente, à excepção de áreas de lesões foliares isoladas, que podem formar "ilhas verdes" ("green islands") (Williams, 1985).

Nos caules aparecem intumescimentos localizados ou generalizados. Por vezes os caules assumem um porte pendente e dá-se a proliferação de gomos laterais, originando um crescimento do tipo arbustivo (Horst, 1990).

Nas inflorescências, a invasão sistémica provoca deformações (as designadas "stagheads" em língua inglesa), que consistem basicamente no aparecimento de distorções a nível dos pedicelos florais e hipertrofia de inflorescências, provocando a sua esterilidade. O aparecimento de pústulas também pode ocorrer a nível dos caules e das inflorescências (Williams, 1985). Nas inflorescências infectadas é frequente a produção de oósporos. Os resíduos das culturas arrastam-nos para o solo, onde permanecem durante as estações desfavoráveis ao desenvolvimento da doença, funcionando como esporos de resistência e constituindo em cada ano a primeira fonte de inóculo (*cf.* § 2.9).

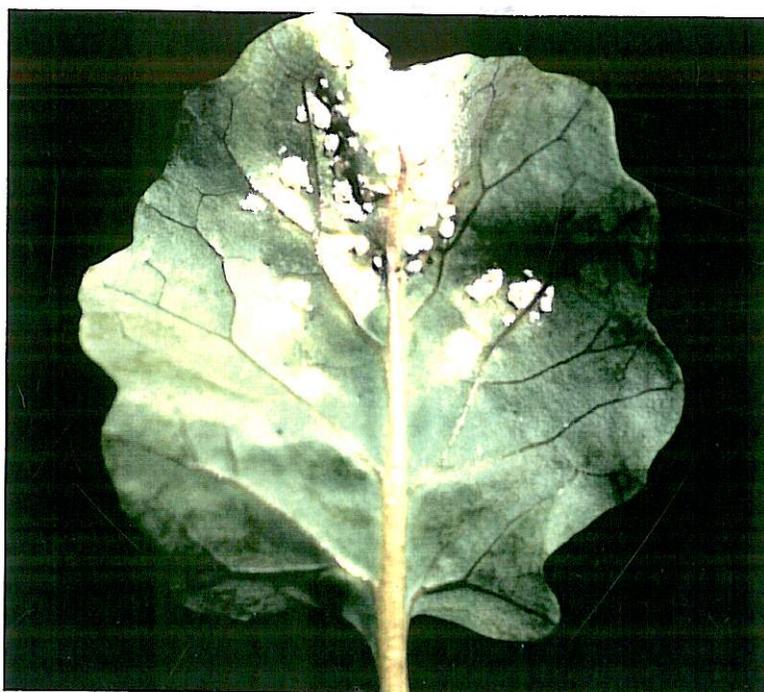


Fig. 2.4 - Sintomas do ataque de *A. candida* em folhas definitivas de *B. oleracea*.

2.9 – Ciclo da doença

O esquema do ciclo da doença causada por *A. candida* encontra-se representado na Figura 2.5.

A sobrevivência de *A. candida* em condições ambientais desfavoráveis é assegurada principalmente pela existência de oósporos nos resíduos das culturas ou no solo, pelos motivos invocados no § 2.6. Os oósporos podem também estar presentes na superfície das sementes utilizadas para iniciar as culturas (Petrie, 1986).

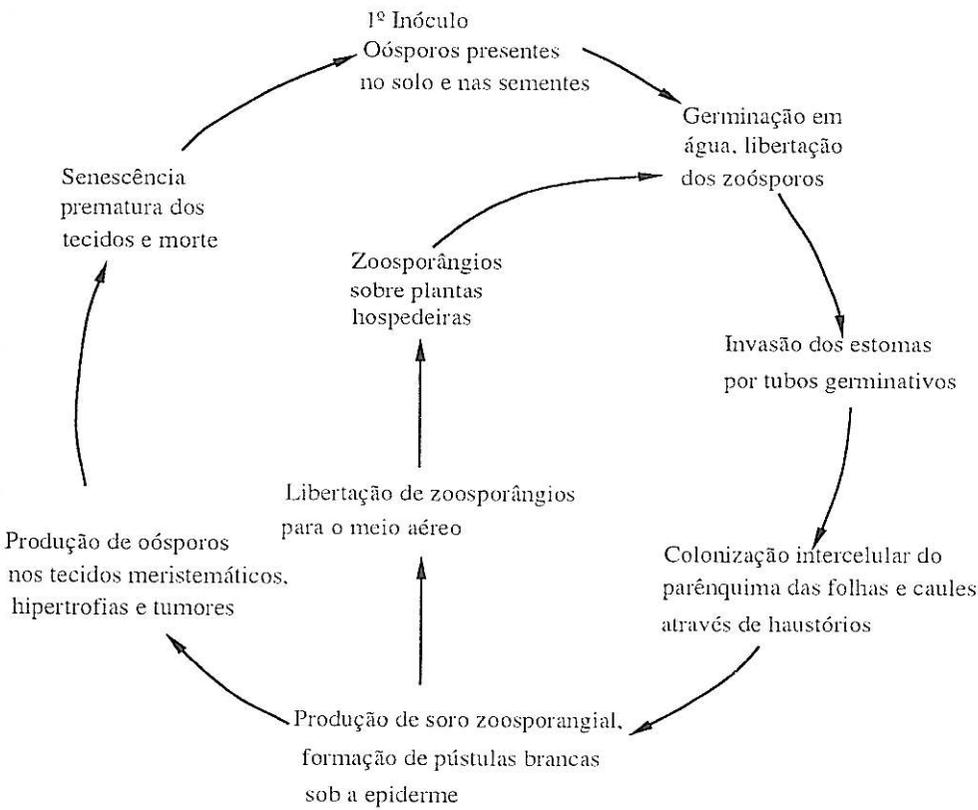


Fig. 2.5 - Ciclo da doença da ferrugem branca das crucíferas (Williams, 1985).

Nos países com invernos rigorosos, a subida das temperaturas na Primavera, provoca o aparecimento da doença, que é favorecida por tempo ameno e húmido. Os oósporos germinam, libertando zoósporos biflagelados a partir de vesículas sésseis ou terminais (Vanterpool, 1959; Verma & Petrie, 1975).

Os zoósporos movem-se em películas de água, enquistam, acabando por germinar através de tubos germinativos. A infecção estabelece-se quando os tubos germinativos penetram os cotilédones e as folhas do hospedeiro através dos estomas (Liu, 1992).

salientes. Do micélio originam-se esporangióforos em forma de clava, onde surgem zoosporângios, numa sucessão basípeta, encerrando no seu interior os esporos de natureza assexual - zoósporos.

Tanto o crescimento do micélio como a produção de esporângios exercem pressão na epiderme do hospedeiro, levando-a a ficar saliente e eventualmente a romper-se, libertando a massa de esporângios, sob a forma de um pó branco, que pode ser disseminado pelo vento ou pela água até à superfície de outras plantas hospedeiras. Sob condições favoráveis de temperaturas amenas e presença de uma película de água, dá-se a germinação dos zoosporângios e a libertação dos zoósporos, que iniciam a infecção secundária. O ciclo assexual pode ser repetido inúmeras vezes durante a estação de crescimento, desempenhando desta forma os zoosporângios um importante papel na disseminação da doença (Liu, 1992).

Os oósporos hibernantes no solo ou presentes na superfície das sementes, constituem a primeira fonte de inóculo no campo (Petrie & Verma, 1974; Petrie, 1975; Verma *et al.*, 1975; Verma & Petrie, 1980), sendo assim de primordial importância, tanto para a iniciação da doença, como para a sobrevivência do patógeno na ausência do hospedeiro (Liu, 1992). São produzidos quer a nível das folhas em senescência, quer a nível dos meristemas e das inflorescências hipertrofiadas.

Em Portugal, as principais regiões produtoras de brássicas situam-se na proximidade do litoral, não se podendo falar na existência de invernos rigorosos. É natural que, neste caso, os oósporos não assumam um papel tão relevante na perpetuação da doença como acontece noutros países.

3 - SISTEMAS SEXUAIS EM ISOLAMENTOS PORTUGUESES DE *A. candida*

3.1 - Introdução

Há ainda muito desconhecimento acerca dos sistemas sexuais de *A. candida*, apesar da importância dos oósporos como fonte primária de inóculo e de variação genética no patogénio (Liu, 1992).

Um dos primeiros estudos sobre sistemas sexuais de *A. candida* em *Capsella bursa-pastoris* foi realizado por Sansome & Sansome (1974). Segundo aqueles autores, isolamentos de *A. candida* provenientes de *Capsella bursa-pastoris* seriam heterotáticos, sendo a reprodução sexual estimulada por infecções secundárias de *Peronospora parasitica*, um patogénio frequentemente associado na natureza a *A. candida*, em plantas da família *Brassicaceae*. De acordo com Liu (1992), após o estudo anteriormente referido, dos sistemas sexuais de *A. candida* em *C. bursa-pastoris*, não se efectuaram quaisquer outros para identificação de "mating types" em *A. candida*, embora outros membros da ordem *Peronosporales* tenham sido realizados estudos detalhados, que revelaram a existência quer de homotalismo quer de heterotalismo em *Phytophthora* spp. (Shaw, 1983; Savage *et al.*, 1968) e em vários míldios, nomeadamente em *P. parasitica* (Sherriff & Lucas, 1989a,b) e *Bremia lactucae* (Michelmore & Ingram, 1980; Michelmore & Ingram, 1982). Em espécies heterotáticas de *Phytophthora*, Shen *et al.* (1983) e Skidmore *et al.* (1984), encontraram-se fortes indícios de que a existência de infecções mistas, em que participassem espécies com "mating types" compatíveis, levassem à produção de oósporos, o que vem apoiar os resultados anteriormente obtidos por Sansome & Sansome (1974). A autofertilidade devida a homotalismo secundário foi referida em *Phytophthora* spp. (Mortimer *et al.*, 1977), em *P. parasitica* (Sherriff & Lucas, 1989b) e em *B. lactucae* (Michelmore & Ingram, 1982). Estudos citológicos sugerem que nos isolamentos em que se verifica homotalismo secundário, a autofertilidade será devida à existência de trissomia num dos cromossomas envolvidos na translocação recíproca, nos quais se presume existirem os determinantes dos grupos de compatibilidade (Sansome, 1980; Michelmore & Sansome, 1982; Sherriff & Lucas, 1989a). Segundo Sansome (1980), nunca foi detectada a existência de translocações recíprocas entre cromossomas, em isolamentos verdadeiramente homotáticos.

Liu (1992) referiu a existência de dois isolamentos homotáticos em *A. candida*, Ac 2 e Ac 7, patogénicos para *B. juncea* e *B. rapa*, respectivamente. A obtenção de isolamentos de pustula única (IPU), não os reduziu a um "mating type", o que indica que nestes isolamentos a autofertilidade não é devida a mistura de isolamentos com "mating types" compatíveis, mas sim uma característica estável. Liu (1992), ao analisar os sistemas sexuais de quatro outros isolamentos de *A. candida*, patogénicos para *B. oleracea* (Ac 9) e para *B. carinata* (Accar 1, Accar 6 e Accar 7), constatou que os mesmos eram heterotáticos, uma vez que os isolamentos de pustula única (IPU) deles

derivados não produziam oósporos em cotilédones de cultivares susceptíveis, ao contrário do que acontecia relativamente aos isolamentos Ac 2 e Ac 7. A inoculação conjunta de IPU heterotálicos do isolamento Ac 9 e dos isolamentos Accar 1, 6 e 7, em cotilédones de cultivares susceptíveis de *B. napus* "Stellar" e "Westar" não conduziu à produção de ósporos (Liu, 1992).

Segundo Liu (1992), a produção de oósporos por cotilédone é variável, mas há normalmente uma correlação positiva entre a intensidade da esporulação assexuada verificada e o número de oósporos presentes, o que está de acordo com Alexopoulos & Mims (1979), que referem que, em *A. candida*, a reprodução sexual e a assexuada podem coexistir, não havendo competição entre elas.

O facto de existirem isolamentos homotálicos em *A. candida* tem consequências epidemiológicas e genéticas (Liu, 1992). Em espécies heterotálicas, a frequência relativa de "mating types" complementares nas populações tanto pode ser quase equitativa como fortemente assimétrica, com um dos "mating types" ocorrendo com uma frequência muito baixa (Shaw, 1988), o que parece ser de ocorrência frequente em fungos fitopatogénicos com intensa esporulação assexuada, nomeadamente em *Phytophthora* spp. (Shaw, 1988). Pelo contrário, em isolamentos homotálicos, em que a reprodução sexual não exige a associação de isolamentos com "mating types" compatíveis, a produção de oósporos pode ocorrer a uma taxa muito elevada. Nos isolamentos homotálicos, a consanguinidade pode levar à redução de variabilidade na população, o que parece explicar a dificuldade dos isolamentos Ac 2 e Ac 7 ultrapassarem a resistência de algumas cultivares de *B. juncea* e de *B. rapa* (Liu, 1992). Contudo, aquele autor verificou que aqueles dois isolamentos eram sexualmente intercompatíveis, podendo ocorrer na natureza a infecção simultânea de hospedeiros comuns, o que seria um meio de gerar patótipos virulentos quer para cultivares de *B. juncea*, quer de *B. rapa*, através de recombinação sexual.

Foi objectivo do presente estudo fazer a determinação dos sistemas sexuais de treze isolamentos portugueses de *A. candida*, provenientes de diferentes hospedeiros (*B. oleracea*, *B. rapa* e *R. sativus*), e com origens geográficas diferentes, descritas no Quadro 3.1.

3.2 - Material e Métodos

3.2.1 - Obtenção e manutenção dos isolamentos iniciais

Os estudos de determinação do sistema sexual de isolamentos portugueses de *A. candida* tiveram como ponto de partida a prévia colheita de isolamentos em hospedeiros infectados naturalmente no campo (Dias *et al.*, não publicado).

No Quadro 3.1, indica-se a proveniência dos isolamentos iniciais, hospedeiros e respectivo código de referência atribuído. Ao todo foram utilizados 13 isolamentos iniciais, cinco de *B. oleracea*, sete de *B. rapa* e um de *R. sativus*.

Na manutenção laboratorial dos isolamentos em estudo foram usados hospedeiros susceptíveis: a couve tronchuda "Murciana", o nabo "Globo de Colo Roxo" e o rábano "Roxo Comprido", respectivamente para os isolamentos de *A.candida* colhidas em *B. oleracea*, *B. rapa* e *R. sativus*. Todas estas cultivares foram provenientes da casa de sementes Soares & Rebelo.

Em todos os casos, as sementes dos hospedeiros susceptíveis foram semeadas em vasos de polietileno de 9 cm cheios com composto Levington F₂[®] e cobertas com uma fina camada de vermiculite de 0,3 cm. As plântulas hospedeiras foram inoculadas na fase cotiledonar, seis dias após a sementeira. Em cada uma das metades de cada cotilédone foi depositada uma gota de 10 µl de inóculo, com recurso a uma pipeta de repetição de Eppendorf[®].

Para a preparação do inóculo provocou-se a rotura de pústulas maduras ⁽¹⁾, com recurso a uma agulha e fez-se a colheita de esporângios directamente para um copo graduado com 5 ml de água bidestilada. O conteúdo foi agitado para melhor dispersão dos esporângios no líquido, e o copo tapado com uma película de parafilme.

A suspensão foi colocada numa câmara escura, a 12° C, condições favoráveis à germinação dos esporângios e conseqüente libertação do seu conteúdo - os zoósporos. Em média, o tempo necessário de permanência em câmara escura para se dar a germinação rondou entre as 2 h 30 m e as 3 h 00 m. Seguidamente avaliou-se a concentração de zoósporos em suspensão, recorrendo a uma câmara de contagem Neubauer melhorada[®]. A concentração da suspensão foi ajustada para um valor de 1x10⁵ zoósporos/ml, após o que se realizou a inoculação.

Após a inoculação, as plantas foram colocadas a infectar em câmara húmida no interior de um propagador, e colocadas numa câmara escura, a 20° C, durante um período de 18 a 24 horas - condições de infecção (Williams, 1985). Terminado esse período, as plantas foram retiradas da câmara húmida, e colocadas numa câmara de crescimento, à temperatura de 20° C, numa situação de dia permanente (24 horas de iluminação), com uma intensidade de luz de 350 µmol/m²-s, e em condições de humidade relativa de cerca de 70% - condições de incubação (Williams, 1985).

Este procedimento foi repetido por norma de 10 em 10 dias, assegurando-se deste modo a manutenção dos isolamentos iniciais existentes.

(1) Com 8 - 12 dias após a inoculação de ordem anterior.

Quadro 3.1 - Lista dos isolamentos portugueses de *A. candida* utilizados no estudo de caracterização dos sistemas sexuais.

Código do isolamento¹	Local de colheita	Hospedeiro²
Ac 501	Belinho, Esposende	Couve - flor (Bo)
Ac 502	Lourinhã, Lourinhã	Couve - flor (Bo)
Ac 503	Costa de Caparica, Almada	Couve Portuguesa (Bo)
Ac 504	Santa Cruz, Torres Vedras	Couve Portuguesa (Bo)
Ac 505	Albogas, Loures	Couve Grelo (Bo)
Ac 506	Montes de Alvor, Portimão	Nabo (Br)
Ac 507	Santa Cruz, Torres Vedras	Couve Chinesa (Br)
Ac 508	Lourinhã, Lourinhã	Nabo (Br)
Ac 509	Costa de Caparica, Almada	Nabo (Br)
Ac 510	A-Ver-o-Mar, Póvoa do Varzim	Couve Chinesa (Br)
Ac 511	A-Ver-o-Mar, Póvoa do Varzim	Nabo (Br)
Ac 512	Aguçadoura, Póvoa do Varzim	Nabo (Br)
Ac 513	Montes de Alvor, Portimão	Rábano (Rs)

¹ Número de código do banco de isolamentos de *A. candida* existente na Secção de Horticultura do Instituto Superior de Agronomia.

² Bo = *B. oleracea*; Br = *B. rapa*; Rs = *R. sativus*.

3.2.2 - Obtenção de isolamentos de pústula única

Para a obtenção de isolamentos de pústula única foi colhido inóculo de cada um dos isolamentos iniciais.

A colheita de esporângios para a obtenção de pústulas únicas foi feita aos 10 dias após a referida inoculação de manutenção, a partir de pústulas maduras, mas ainda intactas. Os esporângios foram colocados em copos graduados contendo 3 ml de água bidestilada, agitados para que se dispersassem bem no interior do líquido, e os copos foram cobertos com uma película de parafilme. A germinação dos esporângios foi feita em câmara escura, a uma temperatura de 12° C durante aproximadamente 2h 30m a 3h 00m.

A concentração da suspensão obtida foi, em cada caso, avaliada com recurso a uma câmara de contagem, e o respectivo valor ajustado a 1×10^5 zoósporos/ml. A partir dessa suspensão final retiraram-se sucessivamente amostras de 10, 20, 30 e 40 μ l para copos graduados contendo respectivamente 40 ml de água bidestilada, por forma a obter as concentrações finais de 0,25; 0,5; 0,75 e $1,0 \times 10^2$ zoósporos/ml, respectivamente. As amostras foram retiradas com pipetas de Gilson[®] aferidas para as respectivas

quantidades, e a suspensão agitada previamente à colheita das amostras, com o objectivo de tornar a distribuição dos zoósporos no líquido o mais homogénea possível.

Desde a saída da câmara escura até à inoculação em plantas susceptíveis, os recipientes que continham as suspensões de inóculo foram mantidas em água com gelo para evitar a perda de viabilidade dos zoósporos.

Para a obtenção de isolamentos de pústula única foi feita a inoculação de cotilédones com cada uma das concentrações anteriormente referidas, com recurso a uma pipeta de repetição de Eppendorf[®], colocando-se duas gotas de 10 ml por cotilédone. Sempre que um bico de pipeta tinha que ser enchido, as suspensões foram sujeitas previamente a agitação para uniformizar a distribuição dos zoósporos. Para cada concentração foram inoculadas 30 plantas, dispostas em tabuleiros de alvéolos de 3x3x5cm. A inoculação foi feita na página superior de cotilédones completamente expandidos (cinco dias após sementeira em *B. oleracea* e em *B. rapa*; quatro dias após sementeira em *R. sativus*).

Após a inoculação, os tabuleiros de alvéolos foram preparados para a infecção. Para isso foram colocados em tabuleiros de plástico que lhes serviam de suporte, regados por forma a ficar uma película de água no fundo e envolvidos por um saco de plástico que foi selado com fita adesiva, de modo a manter as plantas inoculadas num ambiente sempre húmido (câmara húmida). A infecção ocorreu durante as 18-24 horas de permanência das plantas em câmara escura, a uma temperatura constante de 20° C. Findo este tempo, os sacos de plástico que envolviam os tabuleiros foram retirados e as plantas foram postas numa câmara de crescimento à temperatura constante de 20° C, com 24 horas de luz contínua, uma intensidade luminosa de 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, e uma humidade relativa de 70%.

Como as concentrações de inóculo usadas na obtenção de pústulas únicas foram muito baixas, nos casos em que ocorria esporulação, esta progredia a uma velocidade muito lenta. Por norma, só ao fim de oito dias se tornava visível, e apenas aos treze dias as mini-pústulas obtidas estavam em condições de poderem libertar os esporângios. Em todos os inóculos testados, quer de *B. oleracea*, *B. rapa* ou *R. sativus*, uma concentração de $0,25 \times 10^2$ zoósporos/ml foi suficiente para provocar esporulação (por vezes apenas em meio cotilédone) em algumas das plantas inoculadas. Concluiu-se que bastava um zoósporo viável para que pudesse haver infecção numa planta susceptível, pelo menos ao nível dos cotilédones. Numa fase preliminar do trabalho, tinham-se testado concentrações de $1;2$ e 4×10^2 zoósporos/ml, que se revelaram excessivas uma vez que praticamente não havia nos tabuleiros inoculados plantas não infectadas, e as plantas infectadas apresentavam pústulas de grandes dimensões, que não indiciavam probabilidade de poderem ter sido obtidas a partir de zoósporo único.

Todas as plantas do tabuleiro inoculado foram observadas, e registados os resultados da inoculação para cada concentração utilizada: número de cotilédones sem esporulação, com esporulação só em meio cotilédone ou com esporulação em ambos os locais de inoculação do cotilédone. A partir daí foram seleccionadas as plantas que apresentaram pústulas únicas, ou seja, as que apresentavam pústulas de pequenas dimensões em

apenas meio cotilédone e normalmente plantas inseridas num lote em que havia muitas plantas sem esporulação.

3.2.3 - Multiplicação de inóculo a partir de uma pústula única

Uma pústula única é uma minipústula, logo, o seu conteúdo não pode ser diluído em grandes quantidades de água, uma vez que o que se pretende é conseguir um inóculo o mais concentrado possível, para causar infecção e permitir fazer o aumento do inóculo disponível.

Assim sendo, o conteúdo de cada pústula única foi cuidadosamente retirado com uma agulha para um tubo de Eppendorf[®] com 0,2 - 0,3 ml de água bidestilada, tubo esse que era fechado e agitado para homogeneização do seu conteúdo. Para cada um dos inóculos iniciais dos isolamentos Ac 501 a Ac 513, tentou-se a multiplicação de inóculo a partir de pelo menos quatro pústulas únicas.

Para a multiplicação do inóculo das pústulas únicas foram testados dois métodos de germinação dos zoosporângios e de inoculação:

i) Germinação dos zoosporângios num tubo de Eppendorf[®] colocado num suporte, e mantido durante 3 h - 3 h 30 m em câmara escura a 12° C. Findo este tempo e como a concentração do inóculo e o volume da suspensão eram baixos, inoculavam-se directamente as plantas sem proceder a contagem. Normalmente, três plantas esgotavam a suspensão existente, colocando várias gotas em cada um dos cotilédones da planta e não apenas duas. O objectivo foi obter infecções maiores, mesmo que em menor número de plantas, para posteriormente se conseguir retirar mais facilmente o inóculo.

Antes da inoculação procedia-se à introdução do bico da pipeta de Eppendorf[®] no tubo, enchendo-o e esvaziando-o várias vezes, para homogeneizar a suspensão e evitar que houvesse aderência do inóculo às paredes do tubo.

As plantas foram inoculadas e a infecção ocorreu em câmara húmida e escura à temperatura de 20° C, durante 18 a 24 horas.

ii) Enquanto que no caso anterior se fez a germinação dos zoosporângios *in vitro*, neste segundo processo a inoculação foi feita do tubo recém-preparado directamente para as plantas a inocular (mantendo os mesmos cuidados de homogeneização do conteúdo do tubo referidos anteriormente). Também neste caso não foi possível contabilizar a concentração do inóculo na suspensão. As plantas inoculadas foram postas em câmara escura e húmida a 12° C durante 3h - 3h 30 m, dando-se a germinação dos zoosporângios *in vivo* - quando os zoósporos eram libertados dos esporângios, podiam logo penetrar no hospedeiro. Findo este período, as plantas inoculadas foram mudadas para uma câmara escura, à temperatura de 20° C, durante 18 - 24 horas.

Dos dois métodos testados, o que originou melhores resultados foi o de germinação dos zoosporângios *in vivo*. O método de germinação dos zoosporângios *in vitro* originou

muito mais insucessos na infecção e duma maneira geral pode-se dizer que, com este método, de cada quatro pústulas únicas inoculadas, apenas duas conseguiam infectar as plantas. Usando o método de germinação dos zoosporângios *in vivo*, o sucesso foi próximo dos 100%.

Em ambos os métodos, após infecção as plantas foram colocadas numa câmara de crescimento com uma temperatura de 20° C, 70% de humidade relativa, 24 horas de luz contínua e a uma intensidade luminosa de 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$.

Aproximadamente dez dias após inoculação, as pústulas obtidas atingiram o grau de maturação necessário para serem colhidas e diluídas. As suas dimensões já não requeriam tratamento especial e a quantidade de inóculo obtido já permitia obter uma suspensão com um volume (≥ 3 ml) que permitia a inoculação de várias plantas.

3.2.4 - Manutenção dos isolamentos de pústula única

A metodologia utilizada para a manutenção dos isolamentos de pústula única foi semelhante à utilizada para a manutenção dos isolamentos iniciais (*cf.* § 3.2.1).

Contudo, para evitar contaminações, as plantas inoculadas com cada um dos isolamentos de pústula única foram colocadas em propagadores individuais. Com o uso de propagadores, o microclima em redor das plantas alterou-se, criaram-se condições de maior humidade e menor arejamento, o que obrigou a regar muito menos as plantas. Verificou-se que as pústulas de plantas metidas em propagadores permaneciam em boas condições durante menos tempo, sendo a sua senescência acelerada, pelo que se teve que proceder à colheita de inóculos em intervalos mais curtos do que os utilizados para a manutenção dos isolamentos iniciais.

3.2.5 - Cruzamentos efectuados para estudo dos sistemas sexuais

Foram realizados todos os cruzamentos possíveis entre os isolamentos portugueses de pústula única pertencentes a hospedeiros homólogos.

Os hospedeiros susceptíveis escolhidos para serem inoculados com as combinações de isolamentos foram: i) a couve tronchuda "Murciana", para todos os cruzamentos entre isolamentos de pústula única portugueses provenientes de *B. oleracea*; ii) nabo "Globo de 60 dias", para todas as combinações entre isolamentos de pústula única provenientes de *B. rapa*.

O isolamento de pústula única de Ac 513, proveniente de *R. sativus*, como único isolamento disponível desta espécie, não foi sujeito a cruzamento.

Para cada cruzamento entre isolamentos de hospedeiros homólogos, as plantas susceptíveis foram semeadas em tabuleiros de alveolos de 3x3x5 cm, e inoculadas aos

cinco dias com uma suspensão de 1×10^5 zoósporos/ml. Esta suspensão final foi obtida por a adição de iguais volumes das suspensões iniciais, de igual concentração, cada uma proveniente de um dos isolamentos em estudo. Em cada cruzamento inocularam-se cerca de 30 plantas, ou seja, aproximadamente 60 cotilédones, com duas gotas de 10 μ l por cotilédone.

3.2.6. Preparação do material vegetal para observação ao microscópio

Foram colhidos e preparados para observação ao microscópio cotilédones de todos os isolamentos iniciais de *A. candida*, dos isolamentos de pústula única deles derivados, e dos cruzamentos efectuados e anteriormente referidos¹ no § 3.2.5.

A colheita de cotilédones foi feita, em média, 17 a 18 dias após inoculação, já numa fase de senescência dos cotilédones.

A preparação de cotilédones, para posterior observação ao microscópio e detecção de oósporos, consistiu em recorrer a métodos que provocassem a sua descoloração e pusessem em evidência a presença de oósporos. Após serem retirados das plantas, os cotilédones foram imersos em álcool a 70°, para solubilização da clorofila. De dois em dois dias, os cotilédones foram transferidos para uma nova solução, até chegar a altura em que deixavam de apresentar vestígios de coloração. Numa segunda fase, e para pôr em evidência as estruturas do fungo, os cotilédones foram fervidos durante cinco minutos numa mistura (v/v) de 2 lactofenol: 1 glicerina: 1 álcool a 96°, e aí permaneceram em repouso durante 24 horas. Seguidamente, foram retirados e passados por água destilada até desaparecerem os vestígios da mistura anterior. Este método de preparação foi o que levou aos resultados mais satisfatórios e foi adaptado das técnicas referidas por Lepik (1928), Shipton & Brown (1962), Heath (1971), Bruzzese & Hasan (1983) e Sherriff & Lucas (1989b).

Apesar do tratamento anterior, verificou-se que nos cotilédones de *B. oleracea*, mais espessos, havia ainda necessidade de maior clarificação das estruturas para facilitar a sua visualização, tendo-se recorrido à imersão durante sete dias numa solução de hidrato de cloral a 250% (5 g de hidrato de cloral em 2 ml de água destilada), procedendo-se depois à lavagem dos cotilédones em água destilada para remoção dos resíduos da solução. Esta técnica foi adaptada da referida por Bruzzese & Hasan (1983). Quer neste caso quer no anterior, os cotilédones foram guardados em frascos com glicerol a 70°, o que permitiu a sua posterior conservação. A montagem para observação ao microscópio óptico foi igualmente feita em glicerol a 70°.

¹ Para se poderem comparar os resultados obtidos, na inoculação de cotilédones com suspensões derivadas dos isolamentos iniciais também se usaram duas gotas de 10 ml por cotilédone, usando uma concentração de 1×10^5 zoósporos/ml.

Foram observadas ao microscópio óptico 20 cotilédones de cada um dos isolamentos iniciais, dos IPU deles derivados, e de cada um dos cruzamentos efectuados (*cf* § 3.2.5).

3.3 - Resultados e discussão

No Quadro 3.2 apresentam-se os resultados da produção de oósporos nos treze isolamentos portugueses de *A. candida* colhidos no campo, e nos isolamentos de pústula única deles derivados.

Dos treze isolamentos inicialmente colhidos, apenas quatro provocaram produção de oósporos em cotilédones de hospedeiros homólogos susceptíveis: os isolamentos de *B. oleracea* Ac 501 (Esposende), Ac 502 (Lourinhã) e Ac 505 (Loures), e o isolamento Ac 513 (Portimão), de *R. sativus*, colocando-se a hipótese de poderem ser homotáticos.

Os isolamentos de pústula única (IPUs) derivados dos isolamentos Ac 505 (Loures) de *B. oleracea*, e Ac 513 (Portimão) de *R. sativus*, não provocaram produção cotiledonar de oósporos (*cf*. Quadro 3.2), pelo que se rejeitou a hipótese de serem homotáticos. Sendo assim, e uma vez que os isolamentos inicialmente colhidos apresentavam capacidade de produção de oósporos, estes dever-se-iam encontrar na natureza como uma mistura de talos de diferentes "mating types", sendo desta forma heterotáticos.

Os IPU derivados de *B. oleracea* Ac 501 e Ac 502 mostraram ter capacidade de produzir oósporos, mas em reduzido número. Enquanto que os isolamentos iniciais originavam a produção de um número de oósporos/cotilédone que não podia ser contabilizado por simples observação ao microscópio óptico (Fig.3.1), os IPU deles derivados originavam a presença de um reduzido número de oósporos/cotilédone (de 1 a 5), pondo-se a hipótese de representarem casos de homotalismo secundário.

Como seria de esperar, tal como os isolamentos iniciais, também os IPU derivados dos isolamentos de *B. oleracea* Ac 503 (Costa de Caparica) e Ac 504 (Torres Vedras), e os IPU derivados dos isolamentos de *B. rapa* Ac 506 (Portimão), Ac 507 (Torres Vedras), Ac 508 (Lourinhã), Ac 509 (Costa de Caparica), Ac 510 (Póvoa do Varzim 1), Ac 511 (Póvoa do Varzim 2) e Ac 512 (Póvoa do Varzim 3), não originaram produção de oósporos em cotilédones de hospedeiros susceptíveis, revelando-se heterotáticos.

Nos Quadros 3.3 e 3.4 apresentam-se os resultados da presença de oósporos em hospedeiros susceptíveis de *B. oleracea* e de *B. rapa*, após inoculação com isolamentos de pustula única de *A. candida* homólogos, em combinações pareadas.

Quadro 3.2 - Presença de oósporos¹ nos treze isolamentos portugueses de *A. candida* (Ac) colhidos no campo (C), e nos isolamentos de pústula única deles derivados (IPU).

Código do isolamento ²	Origem	Hospedeiro ³	Presença de oósporos	
			C	IPU
Ac 501	Esposende	Couve-flor (Bo)	+	±
Ac 502	Lourinhã	Couve-flor (Bo)	+	±
Ac 503	Almada	Couve portuguesa (Bo)	-	-
Ac 504	Santa Cruz	Couve portuguesa (Bo)	-	-
Ac 505	Loures	Couve portuguesa (Bo)	+	-
Ac 506	Portimão	Nabo (Br)	-	-
Ac 507	Santa Cruz	Couve chinesa (Br)	-	-
Ac 508	Lourinhã	Nabo (Br)	-	-
Ac 509	Almada	Nabo (Br)	-	-
Ac 510	Póvoa do Varzim 1	Couve chinesa (Br)	-	-
Ac 511	Póvoa do Varzim 2	Nabo (Br)	-	-
Ac 512	Póvoa do Varzim 3	Nabo (Br)	-	-
Ac 513	Portimão	Rábano (Rs)	+	-

¹ + = presença de oósporos, ± = presença ocasional de oósporos (de 1 a 5 por cotilédone inoculado);

- = ausência de oósporos.

² Os códigos referem-se aos isolamentos de Ac listados no Quadro 3.1.

³ Bo = *B. oleracea*; Br = *B. rapa*; Rs = *R. sativus*.

Ao fazerem-se combinações pareadas entre IPU provenientes de hospedeiros homólogos verificou-se que:

i) nunca foi detectada a presença de oósporos em quaisquer das combinações provenientes de *B. rapa*, pelo que estes isolamentos parecem ser heterotáticos e pertencerem todos ao mesmo grupo de conjugação ("mating type").

ii) nos isolamentos provenientes de *B. oleracea* poder-se-ão estabelecer dois grupos de conjugação: um, englobando os isolamentos Ac 501 de Esposende, Ac 502 da Lourinhã e Ac 504 de Torres Vedras, e outro, englobando os isolamentos Ac 503 de Almada e Ac 505 de Loures.

iii) os isolamentos Ac 501 de Esposende e Ac 502 da Lourinhã, embora tenham capacidade de se revelarem auto-férteis (*cf.* Quadro 3.2), comportam-se como heterotáticos na presença de isolamentos com "mating types" compatíveis (*cf.* Quadro 3.3), produzindo oósporos em grande quantidade, sendo assim altamente provável que constituam casos de homotalismo secundário.

Quadro 3.3 - Presença de oósporos¹ em hospedeiros susceptíveis de *B. oleracea* após inoculação com isolamentos de pústula única de *A. candida* (Ac), provenientes de *B. oleracea*, em combinações pareadas.

Isolamentos de ² pústula única	Ac 501	Ac 502	Ac 503	Ac 504	Ac 505
Ac 501 p.u.	±				
Ac 502 p.u.	-	±			
Ac 503 p.u.	+	+	-		
Ac 504 p.u.	-	-	+	-	
Ac 505 p.u.	+	+	-	+	-

¹ + = presença de oósporos, ± = presença ocasional de oósporos (de 1 a 5 por cotilédone inoculado);
- = ausência de oósporos.

² Os códigos referem-se aos isolamentos de *A. candida* listados no Quadro 3.1, a partir dos quais os IPU foram obtidos.

Quadro 3.4 - Presença de oósporos¹ em hospedeiros susceptíveis de *B. rapa* após inoculação com isolamentos de pústula única de *A. candida* (Ac), provenientes de *B. rapa*, em combinações pareadas.

Isolamentos ² de pústula única	Ac 506	Ac 507	Ac 508	Ac 509	Ac 510	Ac 511	Ac 512
Ac 506 p.u.	-						
Ac 507 p.u.	-	-					
Ac 508 p.u.	-	-	-				
Ac 509 p.u.	-	-	-	-			
Ac 510 p.u.	-	-	-	-	-		
Ac 511 p.u.	-	-	-	-	-	-	
Ac 512 p.u.	-	-	-	-	-	-	-

¹ - = ausência de oósporos

² Os códigos referem-se aos isolamentos de *A. candida* listados no Quadro 3.1., a partir dos quais os IPU foram obtidos.

Verificou-se também que, nos cotilédones que apresentavam maior intensidade de esporulação assexual, ocorria também uma produção mais significativa de oósporos, o que está de acordo com o referido por Alexopoulos & Mims (1979) e Liu (1992).

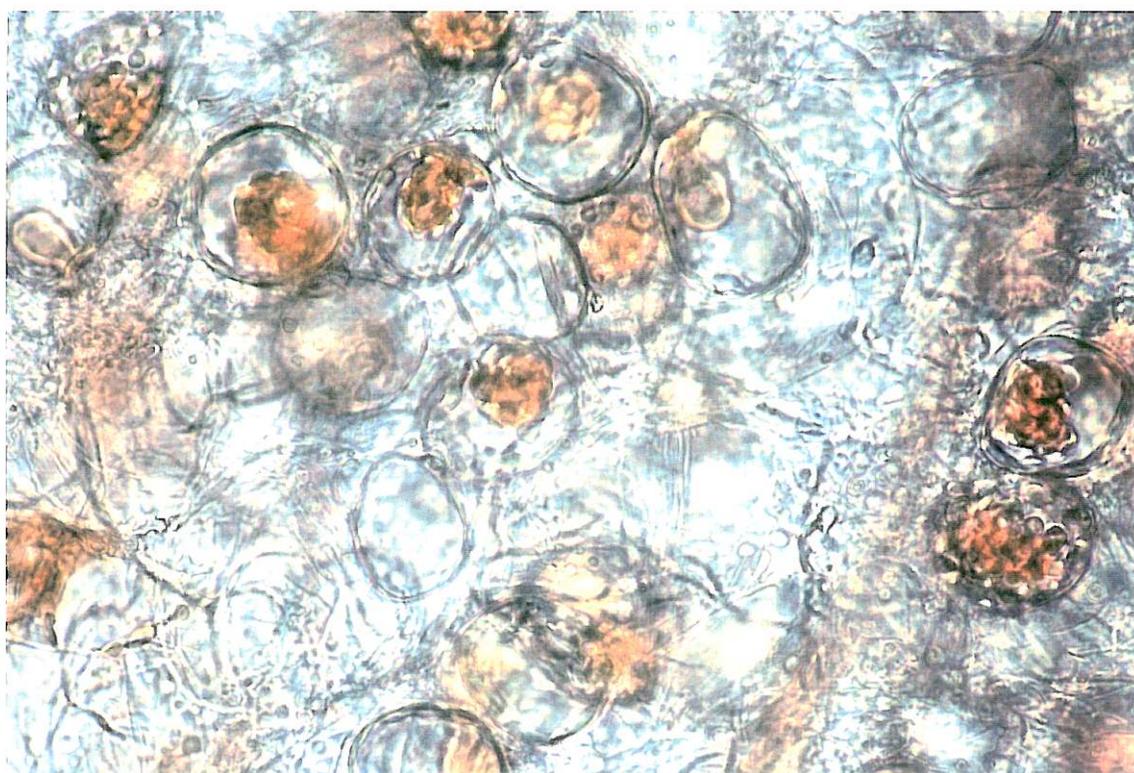


Figura 3.1 - Oósporos de *Ac 502* em cotilédones de *B. oleracea* (x 250).

4 - PATOGENICIDADE DE ISOLAMENTOS PORTUGUESES DE *A. candida*

4.1 - Introdução

Avaliar a patogenicidade de um isolamento de um patógeno só é possível testando a sua interacção com diferentes hospedeiros. A interacção depende da concentração de inóculo utilizada e, para concentrações padronizadas, pode ir desde o maior grau de susceptibilidade até ao mais elevado grau de resistência (imunidade).

O objectivo dos melhoradores de plantas é a obtenção de material vegetal resistente aos patógenos, o dos patologistas é a caracterização mais profunda possível do patógeno, nomeadamente do seu grau de patogenicidade e de virulência. Uns e outros têm que recorrer ao sistema de interacção "planta-patógeno-ambiente".

As colecções de germoplasma vegetal são importantes fontes de genes de resistência a pragas e doenças (Williams, 1989). A genealogia de muitas cultivares resistentes pode ser traçada a partir de colecções de germoplasma (Peterson, 1975), permanecendo muitas delas largamente inexploradas, apesar do seu grande potencial como fontes de resistência (Harlan, 1977).

A identificação e selecção de indivíduos que apresentem os fenótipos desejados, dentro de uma população heterogénea, só é possível recorrendo à avaliação de inúmeros indivíduos, em condições ambientais previamente estabelecidas, fidedignas, e que possam ser facilmente reproduzidas (Williams, 1989).

No caso da avaliação para resistência a doenças, a designação de fenótipo de interacção (FI) ["interaction phenotype"(IP), em língua inglesa], abrange todos os fenótipos possíveis, resultantes da interacção entre a planta, o patógeno e as condições ambientais, que são inúmeros, havendo necessidade de os enquadrar em classes de resistência ou de susceptibilidade, quando o objectivo é o melhoramento (Williams, 1989). Estas classes devem permitir detectar variações genéticas inerentes à população do hospedeiro, relacionadas com os génotipos do patógeno, permitindo comparações entre selecções do hospedeiro e do patógeno (Williams, 1989).

Williams (1985) estabeleceu uma escala de avaliação para os fenótipos de interacção *A. candida* - *B. rapa*, com dez classes de FI, de 0 a 9 (*cf.* § 4.2). Segundo aquele autor, a melhor forma de avaliar o potencial genético de uma colecção é o registo do número de indivíduos por classes de FI, desde que na elaboração das classes se tenha tido em conta a diversidade de sintomas existentes no hospedeiro e de sinais de presença do patógeno. Este sistema permite a normalização da avaliação da resistência a doenças, embora apresente a lacuna de considerar como discretas variáveis que são contínuas.

A resistência é uma manifestação que resulta de um grande número de mecanismos fisiológicos e morfológicos da planta, muitos dos quais sob um complexo controlo

genético. Esta manifestação é por vezes altamente específica de um tecido, e restrita a certos órgãos ou a certos estádios de desenvolvimento, ou fisiológicos, de uma planta (Williams, 1989).

Num programa de melhoramento, tão importante como o conhecimento das reacções do hospedeiro, é o conhecimento do patogénio, nomeadamente da sua ecologia, epidemiologia, reprodução e mecanismo genético. Segundo Williams (1989), o melhorador deve ter consciência da existência de variabilidade no patogénio. As colecções de germoplasma devem ter em conta a existência de patótipos e a sua distribuição. As regiões onde se costuma verificar a máxima diversidade de patótipos coincidem normalmente com as de existência de uma população diversificada de hospedeiros que os suportam (Williams, 1989). Ainda segundo aquele autor, é nestas zonas que se detectam as raças ou estirpes mais virulentas, endémicas e/ou sazonalmente epidémicas.

O presente estudo teve como objectivo a caracterização da patogenicidade de oito isolamentos portugueses de *A. candida*. Para tal, recorreu-se à avaliação de 40 amostras de *B. oleracea*, de origem e potencial genético diversificados. Os isolamentos de *A. candida* foram colhidos em Portugal, em zonas geográficas onde tradicionalmente se faz o cultivo de brássicas. Os oito isolamentos foram colhidos em diversos hospedeiros (*B. oleracea*, *B. rapa* e *R. sativus*), permitindo testar a possibilidade de existência de variação entre os isolamentos e de eventuais interacções específicas "isolamento x amostra".

4.2 - Fenótipos de interacção *A. candida* - hospedeiro e sua avaliação

As brássicas são plantas alogâmicas, havendo uma enorme variabilidade dos indivíduos no interior da espécie e mesmo entre indivíduos pertencentes a uma determinada cultivar. A susceptibilidade das diferentes brássicas ao *A. candida* varia de genótipo para genótipo.

Uma planta muito susceptível não reage à penetração do micélio do fungo, possibilitando que a invasão alastre em sentido descendente através do parênquima das folhas, quando são estas os órgãos infectados. Deste modo, uma planta muito susceptível evidencia após o período de incubação do fungo, a presença de pústulas na página inferior das folhas. Se a esporulação fôr mais intensa, as pústulas podem aparecer simultaneamente na página superior das folhas.

Numa planta com um certo grau de resistência (planta moderadamente resistente) pode ocorrer reacção à penetração do fungo. Um dos tipos de resposta possível é a morte das células, impedindo que a esporulação progrida no sentido descendente. Neste caso, aparecem necroses na página inferior das folhas, mas ainda assim é frequente o aparecimento de pústulas na página superior. Por seu turno, uma reacção de resistência consiste na não ocorrência de esporulação e no aparecimento de cloroses ou de necroses

no ponto de inoculação, que correspondem a uma senescência prematura dos tecidos da planta, impedindo um bom desenvolvimento do fungo. A imunidade consiste na não alteração a nível dos tecidos inoculados, devido ao não reconhecimento do fungo por parte da planta.

Com base nas características de interacção "planta - hospedeiro", para condições ambientais padronizadas, Williams (1985) criou uma escala de avaliação das interacções fenotípicas *A. candida* - *B. rapa* a nível cotiledonar, que se apresenta na Figura 4.1. A escala preconizada por Williams tem 10 classes de aumento de susceptibilidade ao patogénio, com FI de 0 a 9.

Posteriormente, Leckie *et al.* (1996) desenvolveram uma escala de avaliação, também a nível cotiledonar, específica para os fenótipos de interacção *A. candida* - *B. oleracea* com seis classes (Figura 4.2). Também esta escala de avaliação considera como discretas variáveis que são contínuas, embora apresente a vantagem de não considerar um tão grande número de classes como a de Williams, o que acaba por a tornar menos confusa para o utilizador.

Na escala de Williams (Williams, 1985), considera-se que interacções muito compatíveis (grande susceptibilidade do hospedeiro ao isolamento) apresentam como fenótipo pouca esporulação na página superior dos cotilédones (adaxial), e pústulas coalescentes de grandes dimensões na página inferior (abaxial), o que é aceitável quando o hospedeiro é *B. rapa*, mas não quando se trata de *B. oleracea* ou de *R. sativus*. Aqui, os fenótipos representativos de máxima susceptibilidade, apresentam pústulas coalescentes de grandes dimensões, quer na página inferior quer na superior de cotilédones infectados, pelo que a escala de Leckie *et al.* (1996) acaba por ser mais adequada aos fenótipos de interacção obtidos naquela espécie. Por outro lado, utilizando esta escala, a avaliação dos fenótipos de interacção obtidos é feita ao 10º dia, momento em que se pode considerar ter sido atingida a máxima evolução na interacção "planta - patogénio" para determinado ambiente normalizado, uma vez que avaliações feitas mais precocemente não evidenciam o completo desenvolvimento dos sintomas.

O índice médio de doença (ID) que a classificação de Williams considera não salienta diferenças importantes a nível da resistência das cultivares testadas. Um índice médio de doença de valor 3 tanto pode ser obtido numa população testada em que todos os indivíduos apresentam um fenótipo de interacção 3, como noutra em que 50% das plantas apresentam um fenótipo de interacção 1 e as 50% restantes apresentam o 5, o que em termos de selecção de amostras que incluam plantas resistentes não é indiferente, acabando por ser mais representativa da realidade a inclusão das plantas testadas em classes representativas da sua maior ou menor susceptibilidade, medidas através da frequência em cada classe.

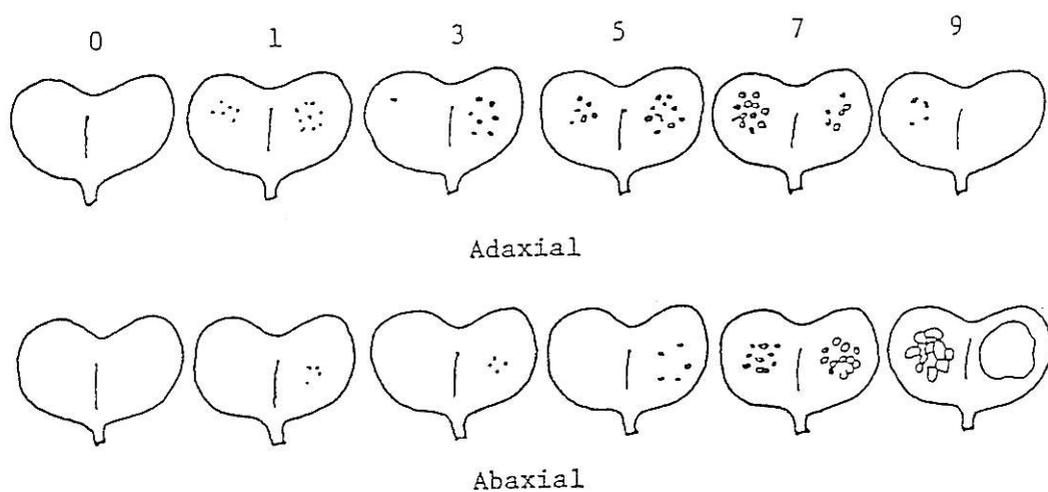


Fig. 4.1 - Esquema da escala de avaliação¹ dos fenótipos de interacção *A. candida* - *B. rapa* em cotilédones, sete dias após a inoculação (Williams, 1985).

¹ As classes de interacção fenotípica são as seguintes: 0 = sem sintomas em qualquer uma das faces do cotilédone; 1 = manchas necróticas sob o ponto de inoculação, desde minúsculas a extensas, eventualmente estendendo-se à página inferior. Sem esporulação. 3 = esporulação dispersa, desde uma a poucas pústulas de minúsculas dimensões na face superior; sem esporulação, ou com poucas pústulas, na face inferior. 5 = pústulas espalhadas na face superior, desde poucas a muitas; sem esporulação na página inferior, ou com pouca esporulação. 7 = de poucas a muitas pústulas na página superior; muitas pústulas espalhadas na página inferior, de pequenas a grandes dimensões. 9 = poucas pústulas na página superior ou mesmo ausência de esporulação; muitas pústulas de grandes dimensões e coalescentes na página inferior.

Resposta do hospedeiro	Não		Sim				
Pontuações necróticas de pequenas dimensões			(F)				
Pontuações necróticas de grandes dimensões			F				
Clorose			ch				
Colapso de tecidos						tc	
Esporulação do patógeno	Não			Sim			
Tipo de esporulação	Adaxial				mP, FP	mP, FP, MP	FP, MP, LP, CP
	Abaxial					mP, FP	MP, FP, MF
Fenótipo de interação	NN	(F)N	FN	S1	S2	S3	

Fig. 4.2 - Escala de avaliação¹ dos fenótipos de interação *A. candida* - *B. oleracea* em cotilédones, dez dias após a inoculação. (Leckie *et al.*, 1996).

¹ As classes de interação fenotípica preconizadas são as seguintes: NN = ausência de sintomas no hospedeiro [N]; ausência de esporulação [N]. (F)N = necroses ligeiras de pequenas dimensões [(F)] e/ou aparecimento de cloroses [ch] no hospedeiro; ausência de esporulação [N]. FN = necroses intensas [F] na página superior do cotilédone, eventualmente extensíveis à página inferior; ausência de esporulação [N]. S1 = pústulas de dimensões minúsculas [mP] ou pequenas [FP] na página superior dos cotilédones; ausência de esporulação na página inferior. S2 = pústulas de pequenas dimensões espalhadas na página superior dos cotilédones, desde poucas [mP, FP] a muitas [MP]; pústulas de pequenas dimensões na página inferior dos cotilédones [mP, FP]. S3 = pústulas de pequenas [FP, MP] a grandes dimensões [LP, CP] na página superior dos cotilédones; pústulas de grandes dimensões [LP] ou coalescentes [CP] na página inferior dos cotilédones, ou colapso de tecidos [tc] na planta.

4.3 - Material e Métodos

4.3.1 - Material Vegetal

No Quadro 4.1 apresenta-se a lista das variedades e cultivares de *B. oleracea* utilizadas no presente estudo. Na avaliação da patogenicidade foram testadas 40 cultivares de *B. oleracea* pertencentes a diferentes variedades botânicas e com proveniências geográficas diversas, representativas da diversidade genética de uma colecção de 410 amostras previamente avaliadas em relação ao isolamento Ac 502 da Lourinhã (Santos *et al.*, 1996). A *B. oleracea* de Ciclo Curto (CrGC 3.4) foi utilizada como testemunha, devido a ter sido previamente seleccionada, por apresentar fenótipos de interacção de elevada susceptibilidade com os isolamentos portugueses de *A. candida* colhidos em *B. oleracea*.

4.3.2 - Isolamentos

Na avaliação foram utilizados oito isolamentos de *A. candida*, de hospedeiros diversos, colhidos em diferentes regiões geográficas do País (Quadro 4.2), o que permitiu avaliar a variação entre os isolamentos e as interacções específicas isolamento x amostra.

4.3.3 - Delineamento experimental e condução do ensaio

A avaliação das resistências foi feita em tabuleiros alveolados com casualização aleatória completa das 40 cultivares de *B. oleracea* utilizadas, e três repetições por cultivar. A sementeira foi feita à profundidade de 0,5 cm, em tabuleiros de 160 alvéolos de 3x3x5, cm dispostos em 16 linhas de 10, previamente cheios de composto Levington F₂[®]. Em cada repetição, as sementes de uma dada cultivar ocupavam uma linha do tabuleiro. Após a distribuição das sementes, estas foram cobertas com uma camada de 0,3 cm de vermiculite, e os tabuleiros com as plantas colocados noutros de plástico que lhes serviam de suporte.

A rega pretendeu dar a todas as plantas a maior uniformidade possível de condições. Numa primeira fase procedeu-se à rega por infiltração ascendente, em que com um regador se colocava água no tabuleiro de suporte, por forma a humedecer a parte inferior do substrato contido nos alvéolos. Seguidamente efectuou-se uma rega por nebulização. Considerou-se um tabuleiro bem regado quando, simultaneamente, a água da base do tabuleiro tinha sido absorvida, e a vermiculite que cobria as sementes se encontrava bem humedecida.

Quadro 4.1 - Lista de amostras de *B. oleracea* utilizadas no estudo de patogenicidade dos isolamentos portugueses de *A. candida*.

Variedade / Cultivar	Código de Referência ¹	País de origem
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> :		
1 - Borecole "Sel. Dammer"	CGN 11140	Holanda
2 - Kale "Chembere Dzagumhana"	HRI 4293	Zimbabué
3 - Cavolo "Verza San Giovanni"	HRI 4773	Itália
4 - Kale "Giant Jersey"	HRI 6226	Inglaterra
5 - Kale "K 269"	HRI 7538	Japão
6 - Kale "Jersey"	HRI 7824	Inglaterra
7 - Kale	HRI 8207	Síria
8 - Couve galega "Tocha Frisada"	HRI 9527	Portugal
9 - Couve galega "Branca"	HRI 9549	Portugal
10 - Kale ornamental "Red on Green"	HRI 9846	Japão
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> :		
11 - Couve-flor "Romanesco Precoce"	HRI 4857	Itália
12 - Couve-flor "Romanesco Natalino"	HRI 4861	Itália
13 - Couve-flor "Romanesco Medio Precoce"	HRI 4866	Itália
14 - Couve-flor "Autumn Italian Pyramid Type"	HRI 4988	Itália
15 - Couve-flor "Winter Marzolo"	HRI 5424	Itália
16 - Couve-flor "Autumn Tasman"	HRI 6254	Austrália
17 - Couve-flor "Romanesco"	HRI 7520	Inglaterra
18 - Couve-flor "Modelet"	HRI 8266	Israel
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> :		
19 - Couve roxa "L. B. Graag Group 1"	CGN 11043	Holanda
20 - Couve repolho "L. B. Sel. Smit"	CGN 11121	Holanda
21 - Couve ornamental "Fiore Miscuglio"	HRI 4886	Itália
22 - Couve repolho "Large Blood Red"	HRI 7833	Índia
23 - Couve repolho "Bacalã"	HRI 11490	Portugal
24 - Couve repolho "Bacalã"	HRI 11555	Portugal
25 - Couve roxa "Ruby Ball"	STOP	Bélgica
26 - Couve roxa "Kissendrup"	Bricobi	Dinamarca
<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i> :		
27 - Penca de Mirandela	ISA 2	Portugal
28 - Penca de Chaves	ISA 19	Portugal
29 - Couve de Valhascos	ISA 20	Portugal
30 - Couve de Valhascos	ISA 35	Portugal
31 - Couve Glória de Portugal	ISA 134	Portugal
32 - Coivão	ISA 178	Portugal
33 - Couve Algarvia	ISA 207	Portugal
34 - Couve de Corte	ISA 272	Portugal
<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> :		
35 - Couve de Bruxelas "Gr. sel. v. Prooiem"	CGN 14076	Holanda
36 - Couve de Bruxelas "Electra Group 1"	CGN 14089	Holanda
37 - Couve de Bruxelas "de la Halle"	STOP	Bélgica
<i>B. oleracea</i> var. <i>medullosa</i> :		
38 - Marrowstem Kale "New Zealand" Medium	HRI 7548	Nova Zelândia
<i>B. oleracea</i> var. <i>sabauda</i> :		
39 - Couve lombarda "Brusselse Winter"	CGN 7102	Dinamarca
<i>B. oleracea</i> de Ciclo Curto:		
40 - <i>B. oleracea</i> CrGC 3.4 (testemunha)	CrGC 3.4	E.U.A.

¹ CrGC = Crucifer Genetic Cooperative, Madison, Wisconsin, EUA; CGN = Center for Genetic Resources, Wageningen, Holanda; HRI = Horticulture Research International, Wellesbourne, Reino Unido; ISA = Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal.

Quadro 4.2 - Lista dos isolamentos portugueses de *A. candida* utilizados no estudo de patogenicidade

Código¹	Local de origem	Hospedeiro²
Ac 501	Esposende	Couve-flor (Bo)
Ac 502	Lourinhã	Couve-flor (Bo)
Ac 503	Almada	Couve Portuguesa (Bo)
Ac 506	Portimão	Nabo (Br)
Ac 508	Lourinhã	Nabo (Br)
Ac 509	Almada	Nabo (Br)
Ac 510	Póvoa do Varzim	Couve Chinesa (Br)
Ac 513	Portimão	Rábano (Rs)

¹ Número de código do banco de isolamentos de *A. candida* existente na Secção de Horticultura do Instituto Superior de Agronomia.

² Bo = *B. oleracea*; Br = *B. rapa*; Rs = *R. sativus*.

Os tabuleiros foram então colocados numa câmara de crescimento, à temperatura de 20°C, com 24 horas de luz contínua e uma intensidade luminosa de 350 mmol/m².s, durante seis a sete dias, altura em que se considerou haver total expansão dos cotilédones, estando as plantas aptas a ser inoculadas. Durante este tempo, dispensaram-se às plantas cuidados de rega diários e, quando necessário, realizaram-se tratamentos fitossanitários para combater os afídeos.

No dia anterior à inoculação, procedeu-se à marcação de um dos cotilédones de cada planta, uma vez que, cada cotilédone foi testado com um isolamento diferente. A marcação possibilitou uma fácil identificação do cotilédone a inocular com determinado isolamento. Para além da casualização das variedades no tabuleiro, procedeu-se à casualização da inoculação dos cotilédones, para cada um dos isolamentos testados, num delineamento em "split - plot". Tentou-se deste modo distribuir o erro resultante das sucessivas inoculações.

A inoculação foi feita no interior da câmara de crescimento, com o tabuleiro sobre uma bancada, à temperatura ambiente constante de 20° C. Em cada cotilédone foram depositadas duas gotas de 10 µl de um dos inóculos usados, com uma concentração final de 1 x 10⁵ zoósporos/ml, recorrendo a uma pipeta de Eppendorf. As técnicas usadas para manter a viabilidade da suspensão de zoósporos (imersão do recipiente contendo a suspensão em água com gelo e agitação do recipiente), a elaboração da câmara húmida, as condições de infecção e de incubação foram semelhantes às anteriormente referidas no § 3.2.1.

A avaliação das interações fenotípicas resultantes de cada combinação planta-isolamento utilizado foi feita aos 6, 8 e 10 dias após inoculação usando a escala de avaliação de Leckie *et al.* (1996).

4.3.4 - Análise de dados

Os fenótipos de interacção avaliados ao 10^o dia segundo a escala de avaliação de Leckie *et al.* (1996) (*cf.* § 4.2) foram reagrupados, por forma a porem em evidência a sua semelhança, em quatro grupos - NN, [(F)N+FN], S₁ e [S₂+S₃], que correspondem a fenótipos de interacção representativos de imunidade, resistência, moderada susceptibilidade (tolerância) e elevada susceptibilidade, respectivamente.

Foi feita uma análise multivariada em que os dados foram analisados segundo o método de ordenação por Análise em Componentes Principais, seguido de análise de grupos, utilizando o método de agregação UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages), através do programa NTSYS (Numerical Taxonomy System of Multivariate Statistical Programs), elaborado por Rohlf & Kirk (1993). Fez-se ainda uma Classificação Automática, utilizando o programa S.P.A.D. (Système Portable pour L'Analyse des Données), elaborado por Lebart *et al.* (1985). Estes dois últimos sistemas de classificação de agregados fornecem informações que são complementares, tendo sido utilizado o primeiro para ordenação das cultivares por índices de semelhança, e o segundo para agrupar as interacções *B. oleracea* - *A. candida* por critérios de semelhança.

A Análise em Componentes Principais permite dar-nos uma ideia da distribuição das amostras (também designadas em taxonomia numérica por OTUs - Unidades Taxonómicas Operacionais) num espaço tridimensional, com um mínimo de perda de informação. Para proceder a esta análise foi elaborada a matriz de dados, **Y**, do tipo **n x p** [**n** linhas, em que **n** representa o número de cultivares amostradas; **p** colunas, sendo **p** o número de variáveis em estudo (neste caso temos quatro variáveis dependentes representativas dos fenótipos de interacção por isolamento testado, correspondendo os isolamentos a variáveis nominais). Os valores y_{ij} de **Y** foram padronizados por forma a que cada variável apresentasse média de zero e variância unitária, transformando cada elemento y_{ij} de **Y** em $x_{ij} = (y_{ij} - y_{.j})/s_j$, sendo $y_{.j}$ a média da variável de ordem j e s_j^2 a sua variância. A matriz dos dados padronizados **X**(**n x p**), fornece as coordenadas dos **n** pontos em **p** dimensões, em que **p** representa o número de variáveis. Para um dado $k < p$, o método de Análise em Componentes Principais, procura um subespaço de k dimensões para o qual a soma dos quadrados das distâncias dos **n** pontos a esse subespaço seja mínimo (Digby & Kempton, 1987). Cada ponto é então representado pela projecção da sua posição inicial nesse subespaço.

Para definir o subespaço de k dimensões, calcula-se a matriz(**p x p**) $\Sigma = X'X$, prosseguindo a análise pela determinação dos valores e vectores próprios da matriz Σ . A matriz de projecção (**P** = **V'****X**, sendo **V'** a matriz transposta da matriz de vectores próprios), representa a matriz das coordenadas dos pontos representativos das amostras no novo sistema de eixos (o primeiro eixo ou componente principal possui uma determinada direcção, para a qual se verifica a máxima dispersão entre os pontos; o segundo eixo é perpendicular ao primeiro, verificando-se a

condição anterior, e assim sucessivamente). Os valores próprios, $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p$, podem-nos indicar a adequação do modelo ao subespaço de k dimensões, sendo a variação numa dada dimensão l dada por λ_l ($\lambda_l = s_l^2$).

Com $t_k = \sum_{l=1}^k \lambda_l$, a variação dos valores x_{ij} é t_p , e a variância explicada pelo subespaço de k

dimensões é $t_k / t_p \times 100$ (Digby & Kempton, 1987). Para valores de k relativamente baixos, podem-se representar graficamente as dimensões, combinadas duas a duas, e averiguar o padrão de distribuição das amostras segundo os eixos.

O método de análise de agregados (UPGMA), origina a formação de grupos onde há uma determinada hierarquia. A agregação é normalmente feita a partir dos valores da matriz de distâncias euclidianas médias, ou a partir da matriz dos coeficientes de correlação¹, e é representada graficamente por fenogramas, isto é, sob a forma de estruturas ramificadas, nas quais os níveis em que ocorrem as ligações dos ramos estão relacionados com os valores de semelhança em que se baseou o método (Arnaldo, 1985). Segundo Cabral *et al.* (1977), este método consiste em admitir a hipótese inicial de existirem tantos grupos quanto o número de OTUs em análise, cujas distâncias (ou correlações) entre si são dadas pelos valores da matriz das distâncias (ou pelos da matriz das correlações). Em seguida faz a selecção de pares semelhantes entre si, e considera cada um desses pares como um grupo. Os novos valores das distâncias (ou das correlações) entre os grupos recém-formados são calculados, é feita novamente uma selecção de pares considerados mais próximos, e assim sucessivamente até à penúltima fase, quando já só existem dois grupos (Cabral *et al.*, 1977).

A Classificação Automática é um outro método de análise de agregados que permite estabelecer uma classificação não hierárquica, agrupando as interacções em estudo por critérios de semelhança, estabelecendo grupos devidamente caracterizados. O sistema é formado pelo conjunto das amostras, e tem um centro de gravidade. Cada um dos grupos formados por partição do sistema inicial gera um subsistema, e tem um centro de gravidade. A definição dos grupos é tanto mais correcta quanto menores forem os valores da inércia intra-grupos e maior o valor da inércia inter-grupos.

¹ Para quantificar a semelhança (ou a dissemelhança) entre as amostras, calcularam-se dois coeficientes de semelhança: a distância euclidiana média e o coeficiente de correlação.

4.4 - Resultados e Discussão

4.4.1 - Patogenicidade dos isolamentos de *A. candida* em *B. oleracea*.

Nos Anexos IV.1 e IV.2 apresentam-se as frequências dos fenótipos de interação obtidos nas combinações *B. oleracea* - *A. candida*.

No Quadro 4.3 apresentam-se as infecções percentuais obtidas no conjunto das interações *B. oleracea* - *A. candida*. Verifica-se que para os isolamentos homólogos (provenientes de *B. oleracea*), estas se situam entre os 30,0 e os 100,0%, não havendo uma única cultivar que apresente, no conjunto das plantas testadas, total resistência a qualquer um dos três isolamentos testados, rondando em média os valores de infecção os 89,4%. Para os isolamentos não homólogos, as percentagens de infecção obtidas situam-se entre os 0,0 e os 56,6%, mas apresentando em média valores da ordem dos 4,0%, bastante inferiores aos verificados no primeiro caso.

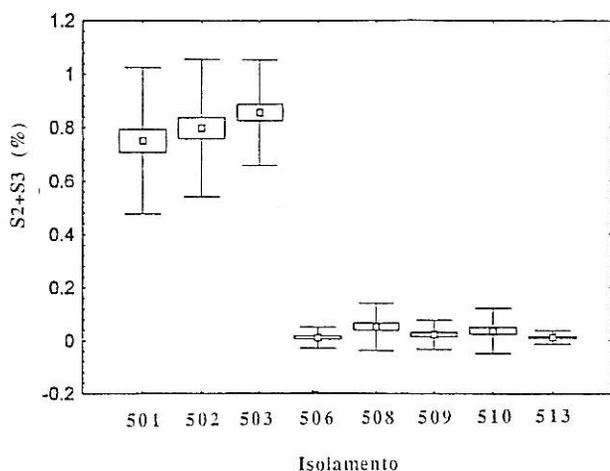
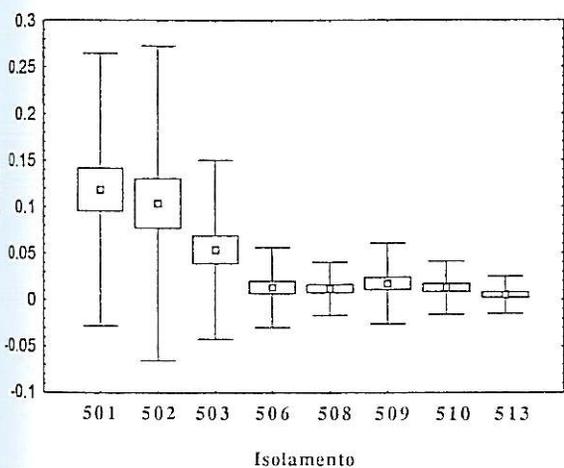
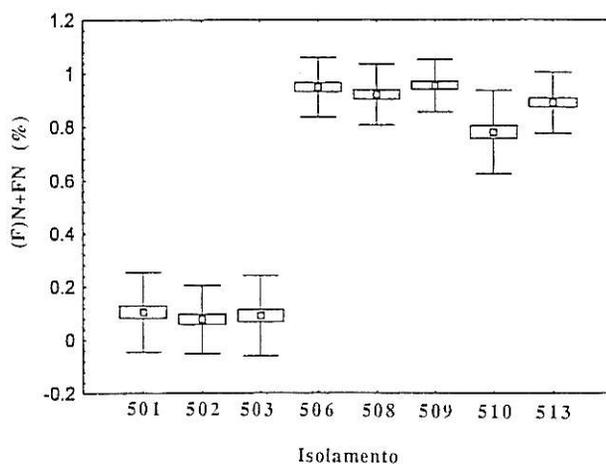
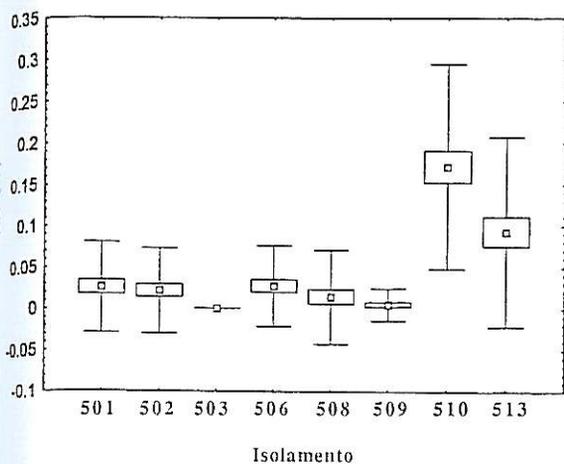
Na Figura 4.3 encontram-se as contribuições médias de cada um dos isolamentos para cada classe fenotípica, e os respectivos erro e desvio padrão. Há evidência de uma grande diferença de comportamento entre dois grupos de isolamentos, relativamente às interações incluídas nas classes representativas de resistência, [(F)N+FN], e de elevada susceptibilidade, [S2+S3].

Assim, enquanto que os isolamentos Ac 501 (Esposende), Ac 502 (Lourinhã) e Ac 503 (Costa de Caparica), provenientes de *B. oleracea*, apresentam baixas frequências de inclusão na classe [(F)N+FN], e elevadas na classe [S2+S3], passa-se precisamente o contrário com os isolamentos Ac 506 (Portimão), Ac 508 (Lourinhã), Ac 509 (Costa de Caparica) e Ac 510 (Póvoa do Varzim1), provenientes de *B. rapa*, e com o isolamento Ac 513 (Portimão), proveniente de *R. sativus*, indicando à partida existirem diferenças entre isolamentos homólogos e não homólogos, revelando o primeiro grupo uma maior patogenicidade nas cultivares de *B. oleracea* testadas.

Apesar de se poder afirmar que os isolamentos colhidos em hospedeiros homólogos causam, por norma, maiores níveis de infecção do que os de origem não homóloga, verifica-se uma grande variabilidade de resposta por parte das cultivares em estudo, havendo cultivares que se mostraram susceptíveis a isolamentos de origem não homóloga, sobretudo a isolamentos de *B. rapa*, e outras que apresentaram um grau variável de susceptibilidade aos isolamentos de *B. oleracea*, podendo-se dizer que há uma grande variabilidade entre cultivares, entre isolamentos, e entre interações cultivar x isolamento (*cf.* Quadro 4.3).

Quadro 4.3 - Infecções percentuais verificadas nas interações *B. oleracea* - *A. candida*

Variedade/ /Cultivar	Isolamento testado							
	Ac 501	Ac 502	Ac 503	Ac 506	Ac 508	Ac 509	Ac 510	Ac 513
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> :								
Borecole "Sel. Dammer"	100,0	100,0	100,0	—	13,8	3,3	—	—
Kale "Chembere Dzagumhana"	96,7	96,7	96,6	3,4	13,3	3,3	3,3	—
Cavolo "Verza San Giovanni"	93,3	100,0	100,0	—	3,3	6,7	3,3	20,7
Kale "Giant Jersey"	53,3	66,7	83,3	—	—	—	—	3,3
Kale "K 269"	100,0	100,0	100,0	—	3,6	—	3,6	—
Kale "Jersey"	62,1	79,3	82,7	—	—	—	—	—
Kale	100,0	100,0	100,0	—	3,3	13,8	25,0	7,1
Couve galega "Tocha Frisada"	86,7	86,7	86,7	—	—	—	3,3	—
Couve galega "Branca"	80,0	96,6	93,3	—	3,3	—	3,3	3,3
Kale ornamental "Red on Green"	96,6	100,0	100,0	—	—	—	—	—
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> :								
Couve-flor "Romanesco Precoce"	59,3	63,3	70,0	—	—	—	—	—
Couve-flor "Romanesco Natalino"	80,0	90,0	100,0	3,6	—	—	—	—
Couve-flor "Romanesco Medio Precoc"	57,1	60,7	72,4	—	—	—	—	—
Couve-flor "Autumn Italian Pyramid Type"	100,0	100,0	100,0	—	20,0	—	—	6,7
Couve-flor "Winter Marzolo"	53,3	79,3	96,7	—	3,4	—	—	—
Couve-flor "Autumn Tasman"	100,0	100,0	100,0	3,3	—	—	—	3,3
Couve-flor "Romanesco"	73,3	73,3	70,0	—	—	—	—	—
Couve-flor "Modelet"	100,0	100,0	96,7	—	8,0	—	3,3	—
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> :								
Couve roxa "L. B. Graag Group"	100,0	100,0	100,0	—	10,0	—	6,7	—
Couve repolho "L. B. Sel. Smit"	100,0	100,0	100,0	13,3	6,7	26,7	6,7	3,3
Couve ornamental "Fiore Miscuglio"	100,0	100,0	100,0	—	3,3	—	—	—
Couve repolho "Large Blood Red"	100,0	100,0	100,0	20,0	40,0	20,0	30,0	6,7
Couve repolho "Bacalã"	66,6	62,1	62,1	—	—	—	—	—
Couve repolho "Bacalã"	30,0	51,7	41,4	—	3,4	—	—	—
Couve roxa "Ruby Ball"	100,0	100,0	100,0	—	—	3,3	—	—
Couve roxa "Kissendrup"	96,7	100,0	100,0	—	3,3	—	3,3	—
<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i> :								
Penca de Mirandela	96,0	100,0	96,7	—	—	3,3	3,6	3,3
Penca de Chaves	93,3	96,7	100,0	—	6,7	3,3	—	—
Couve de Valhascos	100,0	100,0	100,0	—	—	—	3,6	6,7
Couve de Valhascos	100,0	100,0	100,0	3,3	13,3	7,4	12,5	—
Couve Glória de Portugal	67,9	64,3	57,7	—	—	—	—	—
Coivão	88,5	81,5	70,0	—	3,7	—	—	—
Couve Algarvia	52,2	58,6	66,7	—	—	5,0	—	—
Couve de Corte	96,0	100,0	96,7	—	—	5,0	—	3,6
<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> :								
Couve de Bruxelas "Gr. sel. v. Prooiem"	100,0	100,0	100,0	—	13,3	—	—	—
Couve de Bruxelas "Electra Group 1"	100,0	100,0	100,0	—	3,3	—	3,3	—
Couve de Bruxelas "de la Halle"	100,0	100,0	96,3	—	10,0	—	6,8	—
<i>B. oleracea</i> var. <i>medullosa</i> :								
Marrowstem Kale "New Zealand" Medium	100,0	100,0	100,0	3,3	6,7	—	—	—
<i>B. oleracea</i> var. <i>sabauda</i> :								
Couve lombarda "Brusselse Winter"	100,0	100,0	100,0	46,7	50,0	50,0	56,6	3,3
<i>B. oleracea</i> de Ciclo Curto:								
<i>B. oleracea</i> CrGC 3.4 (testemunha)	100,0	100,0	100,0	3,3	13,3	11,1	20,0	—
Média	87,0	90,2	90,9	2,5	6,5	4,1	5,0	1,8



 Desvio - padrão
 Erro - padrão
 Média

Figura 4.3 - Distribuição dos fenótipos de interação NN(a), [(F)N+FN](b), S1(c) e [S2+S3](d) por isolamento de *A. candida*.

Muitas das cultivares testadas apresentam uma completa susceptibilidade aos isolamentos de origem homóloga, não se tendo detectado uma única planta resistente, independentemente do isolamento testado. Estão neste caso as cultivares Kale (7), Couve-flor "Autumn Italian Pyramid Type" (14), Couve repolho "L. B. Sel. Smit" (20), Couve de Valhascos (29), Couve de Bruxelas "Gr. sel. v. Prooiem" (35), Marrowstem Kale "New Zealand" Medium (38), Couve lombarda "Brusselse Winter" (39), e a *B. oleracea* de ciclo curto CrGC 3.4 (40), entre outras (cf. Quadro 4.3), abrangendo cultivares pertencentes a todas as variedades botânicas de *B. oleracea* testadas.

Nalgumas cultivares, a susceptibilidade a *A. candida* de origem homóloga não é total, tendo-se detectado um número variável de plantas resistentes por cultivar. Neste caso a resistência a *A. candida* é, a maior parte das vezes, função do isolamento testado. Entre outras, comportam-se desta forma as cultivares Kale "Giant Jersey" (4), em que a percentagem de plantas resistentes varia entre 17,7%, para o isolamento Ac 503, e 47,7%, para o Ac 501; a Couve-flor "Romanesco Precoce" (11), em que aqueles valores variam entre 30,0 %, para o isolamento Ac 503, e 40,7%, para o Ac 501; a Couve repolho "Bacalã" (24), em que os valores variam entre 48,3%, para o isolamento Ac 502, e 70,0% para o Ac 501; e a Couve Glória de Portugal (31), onde se detectaram percentagens de resistência entre os 32,1%, para o isolamento Ac 501, e os 42,3%, para o Ac 503, o que denota uma grande variabilidade de resposta das cultivares face aos isolamentos.

De entre as cultivares que se mostraram susceptíveis a infecções cruzadas, destacam-se pela sua maior susceptibilidade, a Couve lombarda "Brusselse Winter" (39), susceptível a todos os isolamentos de origem não homóloga testados, com percentagens de infecção que se situam entre os 3,3%, para o isolamento Ac 513 de *R. sativus*, e os 56,6%, para o isolamento Ac 510 de *B. rapa*; a Couve repolho "Large Blood Red" (22), cujos valores de infecção variam entre os 6,7%, para o isolamento Ac 513, e os 40,0%, para o Ac 508; a Couve repolho "L. B. Sel. Smit" (20), em que estes valores variam entre os 3,3%, para o isolamento Ac 513, e os 26,7%, para o Ac 509; a Cavolo "Verza San Giovanni" (3), cujos valores de infecção se situam entre os 3,3%, para os isolamentos Ac 508 e Ac 510, e os 20,7%, para o isolamento Ac 513; a Kale (7), com valores entre os 3,3%, para o isolamento Ac 508, e os 25,0%, para o Ac 510; e a Couve-flor "Autumn Italian Pyramid Type" (14), que mostrou ser apenas susceptível aos isolamentos Ac 513 (6,7% de plantas infectadas) e Ac 508 (com 20,0% de infecções).

As cultivares Kale "Chembere Dzagumhana" (2), Couve de Valhascos (30) e a testemunha *B. oleracea* de ciclo curto CrGC 3.4 (40), apenas mostraram ter susceptibilidade aos isolamentos de origem não homóloga provenientes de *B. rapa*. Nestas, a susceptibilidade também mostrou ser função do isolamento testado. Assim, na Kale "Chembere Dzagumhana" (2), os níveis de infecção situaram-se entre os 3,3-3,4%, para os isolamentos Ac 506, Ac 509 e Ac 510, e os 13,3%, para o isolamento Ac 508; na Couve de Valhascos (30), estes situam-se

entre os 3,3%, para o Ac 506, e os 13,3%, para o Ac 508; e na *B. oleracea* de ciclo curto CrGC 3.4 (40), entre os 3,3%, para o Ac 506, e os 20,0%, para o Ac 510.

Das cultivares que apresentaram susceptibilidade a infecções cruzadas, a Kale "Giant Jersey" (4), foi a única a ser exclusivamente infectada pelo isolamento Ac 513, proveniente de *R. sativus*, o que a coloca numa posição peculiar, uma vez que este isolamento mostrou ser, por norma, menos patogénico em *B. oleracea* do que os restantes isolamentos não homólogos, provenientes de *B. rapa*.

Para avaliar toda esta variabilidade recorreu-se, como referido, ao método de ordenação por Análise em Componentes Principais, e ao de agregação UPGMA, para caracterização de cultivares e isolamentos; e ao método de Classificação Automática para caracterização das interacções *B. oleracea* - *A. candida*.

Os objectos em análise - cultivares de *B. oleracea* ou OTUs - seriam representados no modelo real por pontos num espaço multidimensional, definido por 32 dimensões diferentes (correspondentes às combinações classe fenotípica - isolamento testado), os caracteres. Ao fazer a sua representação num modelo tridimensional, segundo os dois planos definidos pelas três primeiras componentes principais, estamos a efectuar uma distorção da realidade. Neste caso, 65,7% da variância é explicada nos três primeiros eixos (Quadro 4.4), pelo que se pode considerar ser o modelo tridimensional suficientemente representativo da realidade.

Quadro 4.4 - Variância explicada nos três primeiros eixos (componentes principais).

Eixo	Valor próprio ¹	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	11,335600	36,5665	36,5665
2	5,419733	17,4830	54,0495
3	3,607121	11,6359	65,6853

¹ Traço da matriz = 31.

Nas Fig. 4.4 e 4.5 encontram-se as projecções dos caracteres e das OTUs segundo os planos definidos pelas três primeiras componentes principais.

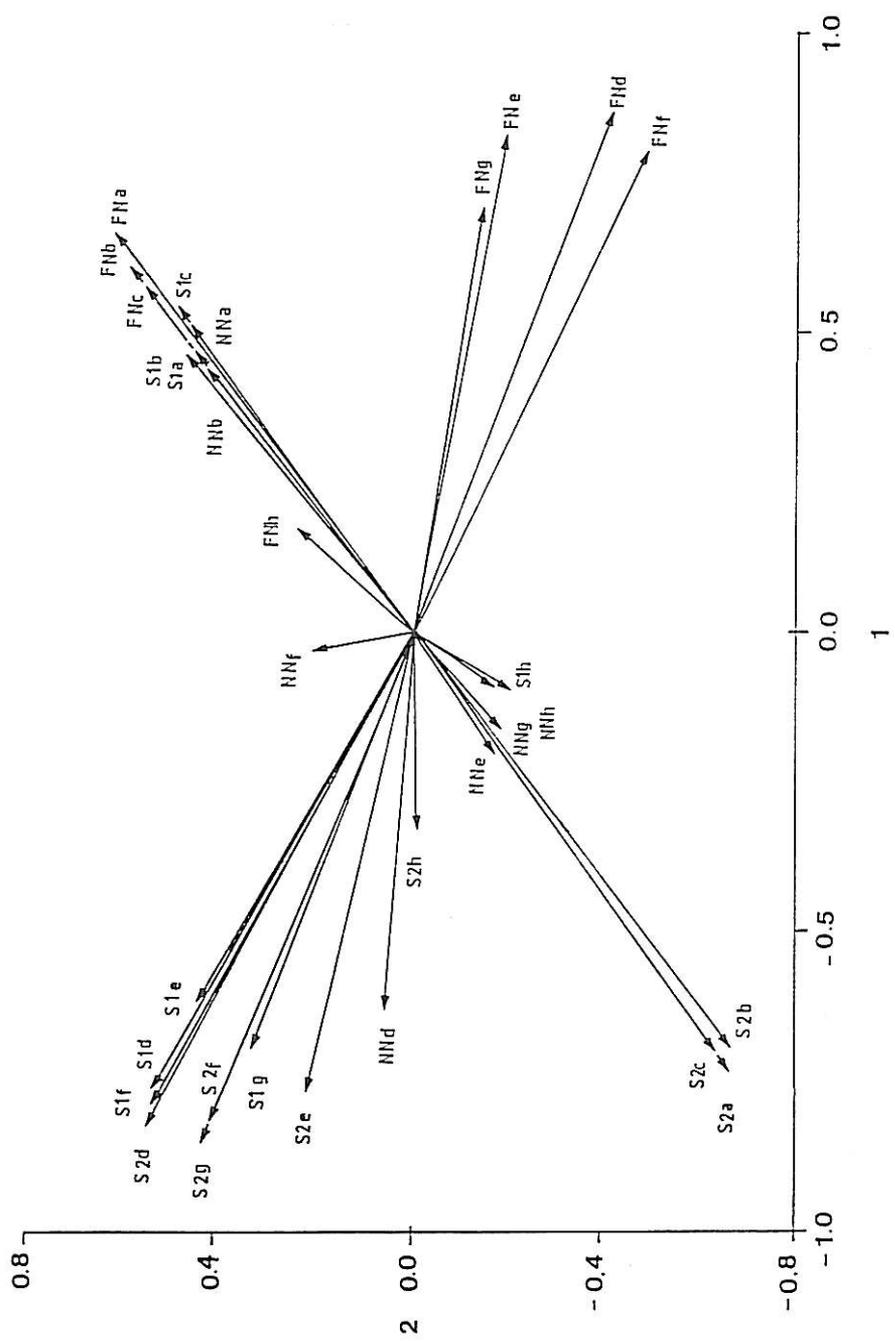


Figura 4.4 a - Projecção dos caracteres no plano definido pelos eixos 1-2. As letras identificam os caracteres (cf. § 4.4.1).

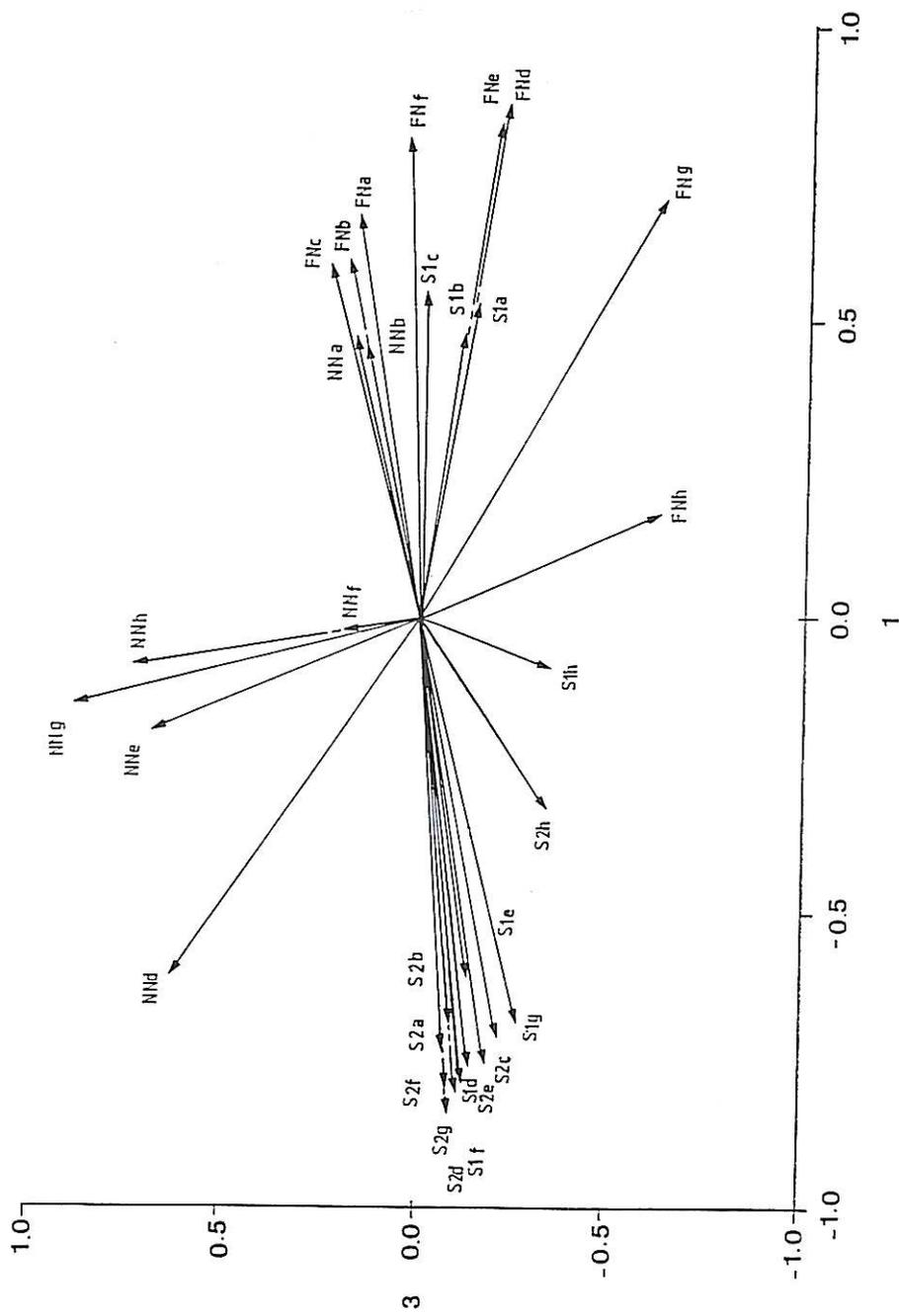


Figura 4.5 a - Projecção dos caracteres no plano definido pelos eixos 1-3. As letras identificam os caracteres (cf. § 4.4.1).

Na projecção das 32 combinações classe fenotípica-isolamento segundo o plano definido pelas componentes 1-2 (Fig. 4.4), verifica-se que:

i) para cada classe fenotípica da escala de Leckie *et al.* (1996) (*cf.* § 4.2) - aqui representadas numa forma simplificada por NN, FN¹, S₁ e S₂² (*cf.* § 4.3.4) - há uma nítida separação entre caracteres que caracterizam isolamentos homólogos (Ac 501=a, Ac 502=b e Ac 503=c) e não homólogos (Ac 506=d, Ac 508=e, Ac 509=f, Ac 510=g e Ac 513=h), isto é, os caracteres NNa e NNb³ estão espacialmente separados dos NNd, NNe, NNf, NNg e NNh; os FNa, FNb e FNc estão separados dos FNd, FNe, FNf, FNg e FNh; o mesmo acontece relativamente aos caracteres representativos das classes S1 e S2, havendo separação entre os provenientes de isolamentos homólogos e não homólogos.

ii) os caracteres S1h e S2h distanciam-se dos restantes S1 e S2 derivados de isolamentos não homólogos (S1d, S1e, S1f e S1g; S2d, S2e, S2f e S2g).

iii) as OTUs distribuem-se espacialmente pela influência que os valores dos caracteres apresentam relativamente às duas primeiras componentes principais. A cultivar Couve lombarda "Brusselse Winter" (39) aparece completamente destacada das restantes. As cultivares Kale (7), Kale ornamental "Red on Green" (10), Couve repolho "L. B. Sel. Smit." (20), Couve repolho "Large Blood Red" (22), Couve de Valhascos (30) e a testemunha *B. oleracea* de ciclo curto CrGC 3.4 (40), aparecem também relativamente isoladas. As restantes distribuem-se por três grupos, sendo um dos grupos formado pelas cultivares 4, 6, 11, 13, 15, 17, 18, 23, 24, 31 e 33; outro pelas cultivares 8, 9, 12, 29 e 32; e o último pelas cultivares 1, 2, 3, 5, 14, 16, 19, 21, 25, 26, 27, 28, 34, 35, 36, 37 e 38. No entanto, algumas destas cultivares acabam por se agrupar de forma diferente no plano definido pelas componentes 1-3 (*cf.* Fig. 4.5b).

Na projecção das 32 combinações classe fenotípica-isolamento segundo o plano definido pelas componentes 1-3 (*cf.* Fig. 4.5), verifica-se que:

i) os caracteres NNa e NNb e os S1a, S1b e S1c distanciam-se dos restantes NN e S1 derivados de isolamentos não homólogos (NNd, NNe, NNf, NNg e NNh; S1d, S1e, S1f, S1g e S1h), tal como acontecia no plano definido pelas componentes 1-2.

ii) os caracteres S1h e S2h aparecem ainda isolados dos restantes caracteres S1 e S2, o que parece indicar estarmos na presença de um isolamento distinto dos restantes isolamentos não homólogos.

iii) a cultivar Couve lombarda "Brusselse Winter" (39), continua a aparecer completamente destacada das restantes. As cultivares Kale (7), Kale ornamental "Red on

¹ FN=[(F)N+FN].

² S2=[S2+S3].

³ O isolamento c = Ac 503 não originou valores na classe NN.

Green" (10), Couve repolho "L. B. Sel. Smit. (20), Couve repolho "Large Blood Red" (22), Couve de Valhascos (30) e a testemunha *B. oleracea* de ciclo curto CrGC 3.4 (40) continuam a aparecer isoladas. As restantes cultivares reagrupam-se de forma distinta da anterior, mantendo-se um dos anteriores grupos quase inalterado. A distinção entre grupos é menos marcada. Um dos grupos é formado pelas cultivares 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 23, 24, 31, 32 e 33; outro pelas cultivares 1, 5, 34, 35 e 36; o último pelas cultivares 2, 3, 7, 9, 12, 14, 16, 18, 19, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 37 e 38.

Nas Fig. 4.6 a 4.9 apresentam-se os fenogramas das distâncias e das correlações entre caracteres e entre OTUs, obtidos pelo método de agregação UPGMA. Pela sua análise, a semelhança entre caracteres e entre OTUs é mais facilmente visualizada. Analisando o fenograma das distâncias entre caracteres (Fig. 4.6), verifica-se uma nítida separação entre caracteres S1 e S2 de isolamentos homólogos e não homólogos (o que está de acordo com a distribuição espacial destes caracteres segundo o plano definido pelas duas primeiras componentes principais, *cf.* Fig. 4.4). Verifica-se ainda que os caracteres mais semelhantes entre si são os S2a e S2b; os FNb e FNc, e os S1d e S1f. Pode-se considerar a formação de dois grandes grupos, e dentro destes vários subgrupos.

No primeiro grupo, onde estão englobados todos os caracteres FN, os caracteres NNa e NNb, e os S1a, S1b e S1c, destacam-se os subgrupos formados pelos caracteres:

- i) NNa, NNb, FNa, FNb e FNc.
- ii) S1a, S1b e S1c.
- iii) FNd, FNe, FNf e FNg.
- iv) FNh.

Deste grupo ressalta a semelhança entre caracteres FN, e entre caracteres S1 de isolamentos colhidos em *B. oleracea*, e também a existente entre caracteres FN de isolamentos provenientes de *B. rapa*. O carácter FN, característico do isolamento colhido em *R. sativus* (FNh), revelou ser o mais dissemelhante do grupo. Estas observações são confirmadas por análise do fenograma das correlações entre caracteres (Fig. 4.7).

No segundo grupo, encontram-se todos os caracteres NN e S1 de isolamentos não homólogos, e a totalidade dos caracteres S2. Os subgrupos formados são os seguintes:

- i) S2a, S2b e S2c.
- ii) S1d, S1e, S1f, S1g, S2d, S2e, S2f e S2g.
- iii) S1h e S2h.
- iv) NNd, NNe, NNf, NNg e NNh.

Por análise deste grupo verificamos que os caracteres S2 de isolamentos de origem homóloga revelam proximidade entre si, e distância relativamente aos caracteres S2 de origem

Distância

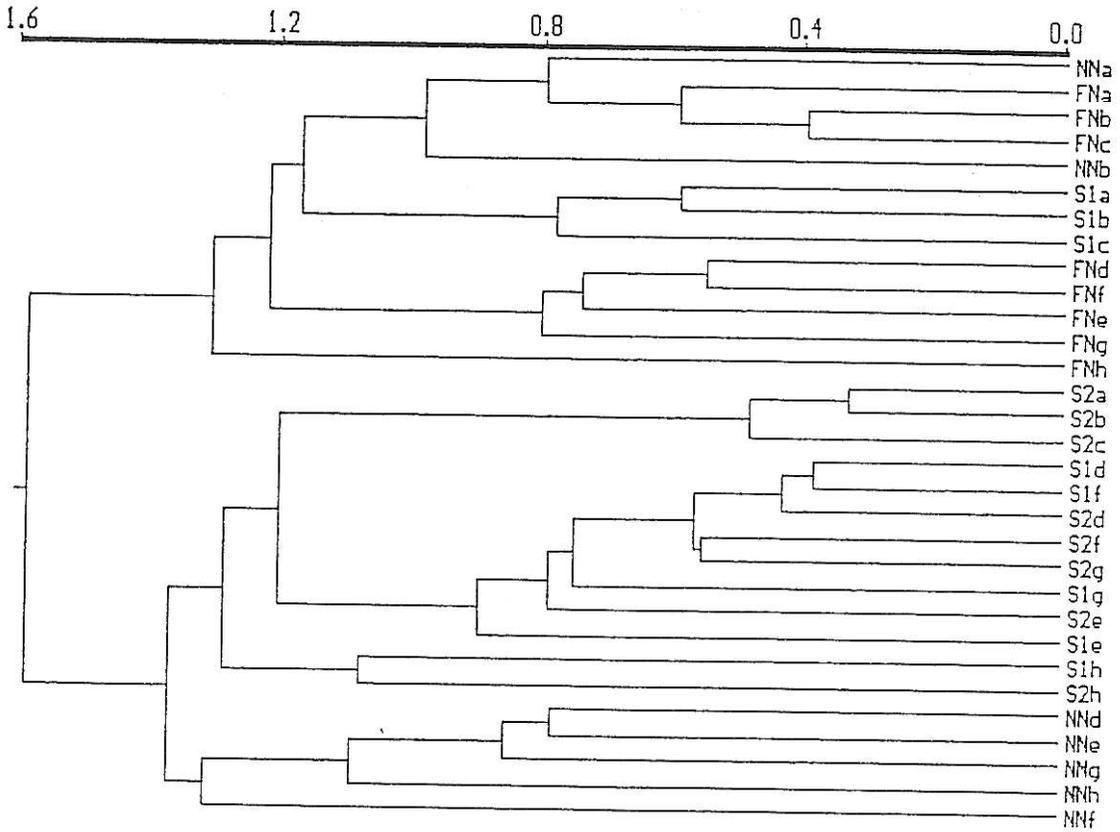


Figura 4.6 - Fenograma das distâncias entre caracteres ($r = 0,90224$).

Correlação

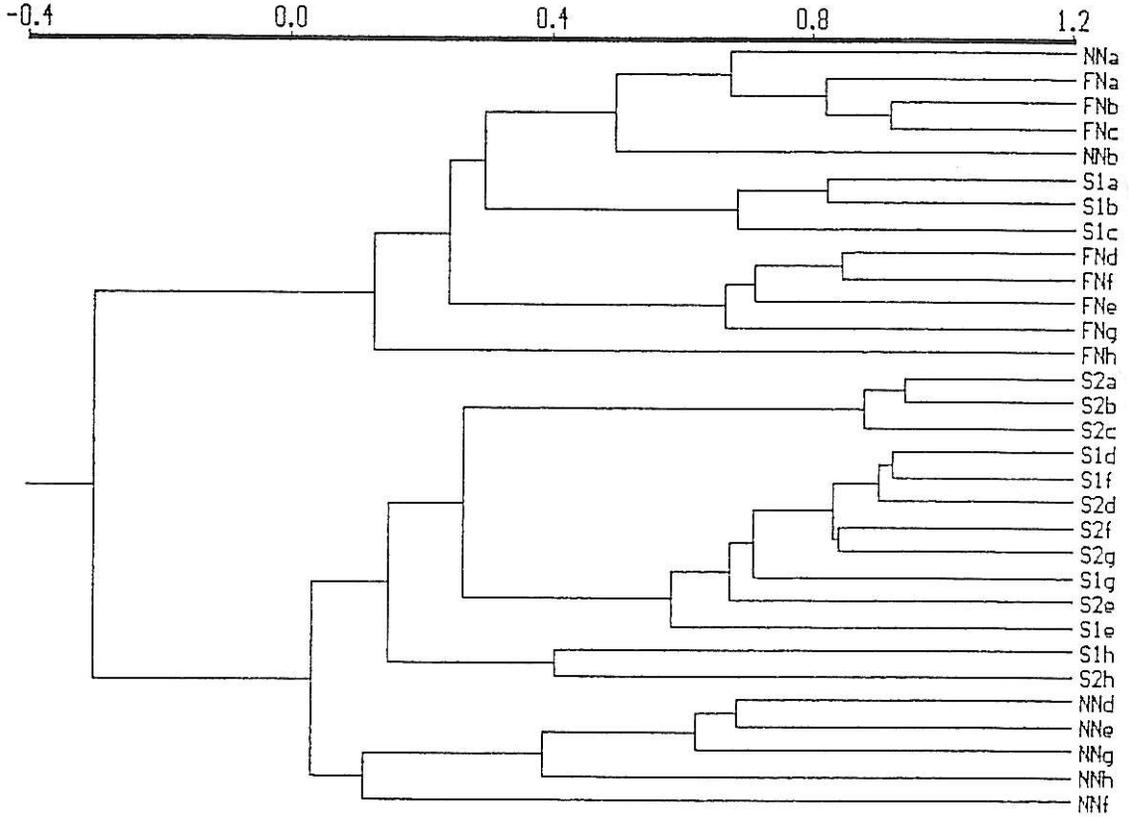


Figura 4.7 - Fenograma das correlações entre caracteres ($r = 0,85142$).

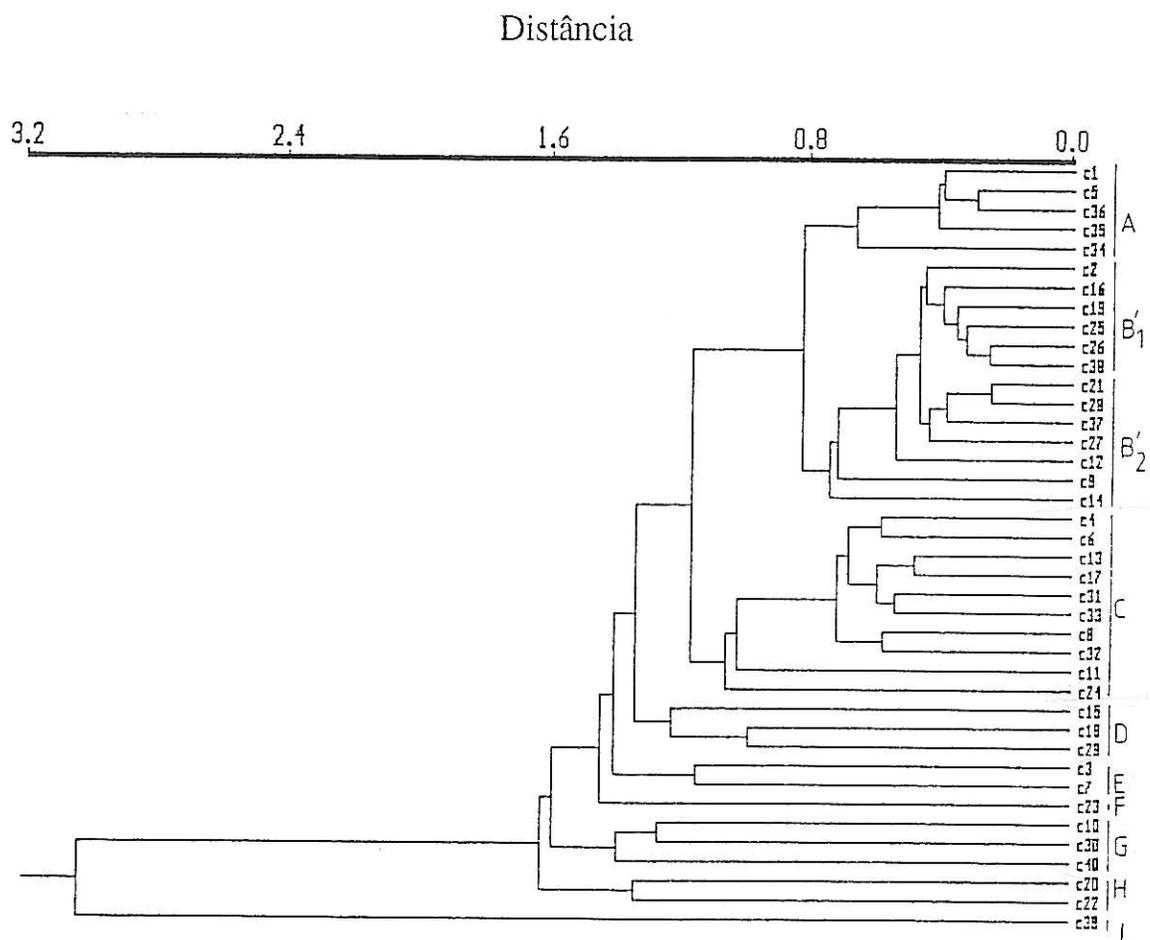


Figura 4.8 - Fenograma das distâncias entre OTUs ($r = 0,89884$). As letras A a I referem-se aos grupos definidos no texto.

Correlação

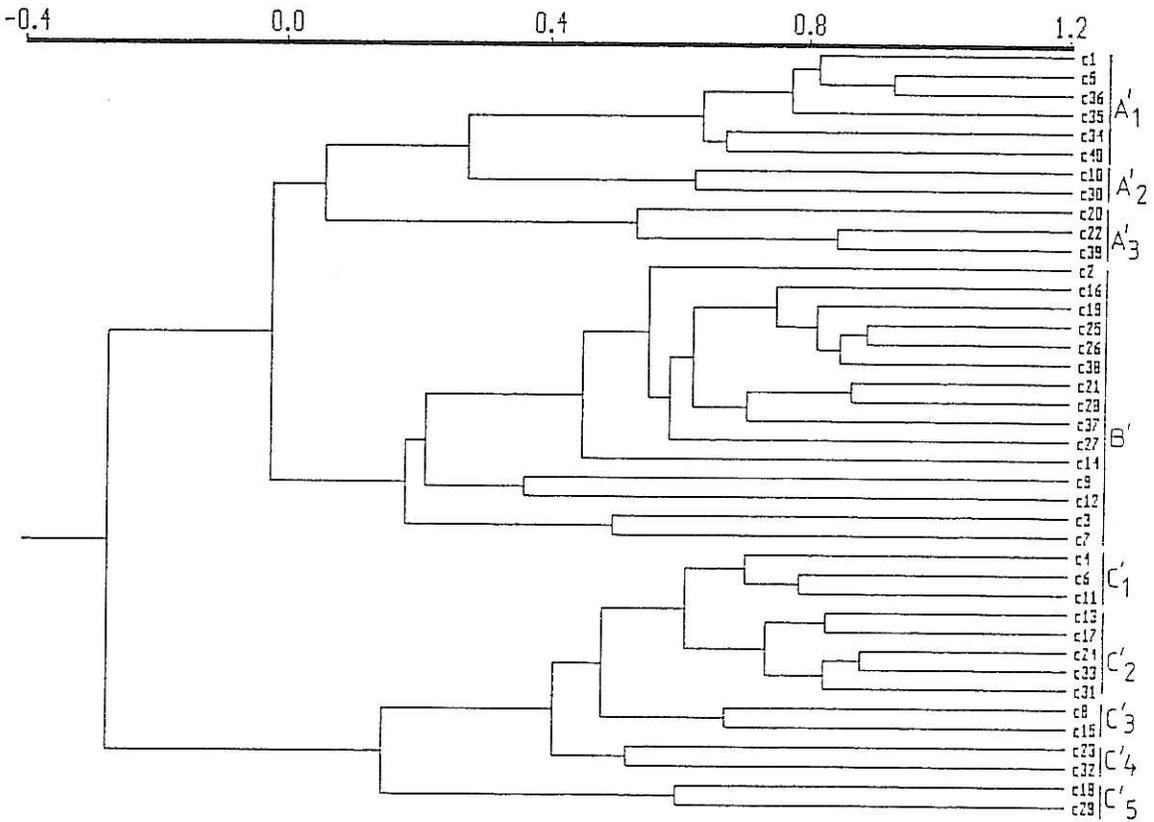


Figura 4.9 - Fenograma das correlações entre OTUs. As letras A' a C' referem-se aos grupos definidos no texto.

não homóloga. Os caracteres S1h e S2h são próximos entre si e estão bastante afastados de qualquer outro caracter S1 ou S2, independentemente da sua origem. Os caracteres S1g, S1e e S2e são os que se mostram mais distantes dos restantes caracteres S1 e S2 dos isolamentos de *B. rapa*, e os que mais próximo se situam dos caracteres S2 dos isolamentos de *B. oleracea*. Estes dados são confirmados por análise do fenograma das correlações entre caracteres (*cf.* Fig. 4.7), que mostra também existir uma correlação negativa entre os dois grandes grupos formados.

Por análise conjunta dos dois fenogramas (o da distância e o da correlação entre caracteres), verifica-se que, de entre os isolamentos homólogos (Ac 501=a, Ac 502=b e Ac 503=c), os mais semelhantes entre si são o Ac 501 (Esposende) e Ac 502 (Lourinhã).

O fenograma das distâncias entre OTUs (cultivares) revela a existência de nove grupos (A, B, C, D, E, F, G, H e I), *cf.* Fig. 4.8. O grupo A abrange as cultivares 1 a 34. O grupo B, engloba as cultivares 2 a 14. Neste grupo distinguem-se dois subgrupos distintos: B₁, formado pelas cultivares 2 a 38, e B₂, formado pelas cultivares 21 a 27. Ao conjunto formado por estes dois subgrupos agregam-se, numa fase posterior, as cultivares 12, 9 e 14. Os dois primeiros grupos (A e B), formam no seu conjunto um grande grupo, ao qual se vai ligar o grupo C, constituído pelas cultivares 4 a 24. O grupo D é constituído pelas cultivares 15 a 29, o E pelas cultivares 3 e 7, o F pela 23, o G pelas 10, 30 e 40. O grupo H engloba as cultivares 20 e 22, e o I a cultivar 39, que aparece destacada das restantes.

As cultivares que se revelaram mais semelhantes entre si, em termos de proximidade espacial, são a Kale "K 269" (5) e a Couve de Bruxelas "Electra Group 1" (36); a Couve roxa "Kissendrup" (26) e a Marrowstem Kale "New Zealand" Medium (38); a Couve ornamental "Fiore Miscuglio" (21) e a Penca de Chaves (28); a Kale "Giant Jersey" (4) e a Kale "Jersey" (6); a Couve-flor "Romanesco Médio Precoce" (13) e a Couve-flor "Romanesco" (17); a Couve Glória de Portugal (31) e a Couve Algarvia (33); e finalmente a Couve galega "Tocha Frisada"(8) e a Coivão (32) A cultivar mais dissemelhante é a Couve lombarda "Brusselse Winter" (39). A distribuição espacial peculiar desta OTU é influenciada pelos elevados valores dos caracteres S1d, S1e, S1f, S1g, S2d, S2e, S2f e S2g no plano definido pelos eixos 1-2 e 1-3, e pelos valores relativamente baixos dos restantes caracteres, ou seja, mostra ser a mais susceptível a isolamentos de *A. candida* de origem não homóloga.

No fenograma das correlações entre cultivares, as cultivares em análise são agrupadas de uma forma bastante distinta da anterior (*cf.* Fig. 4.9). Ele revela a existência de três grandes grupos (A', B' e C'). O grupo A' é constituído por três grupos de menores dimensões (A'₁, A'₂ e A'₃). O A'₁ é formado pelas cultivares 1 a 40, e é quase coincidente com o anterior grupo A, estabelecido a partir do fenograma das distâncias (*cf.* Fig. 4.8); o A'₂ engloba as cultivares 10 e 30 (que formavam o núcleo central do anterior grupo G), e o A'₃ as cultivares 20, 22 e 39 (que constituíam os anteriores grupos H e I). As cultivares 2 a 7 constituem o grupo B' (são as

que constituíam os anteriores grupos B e E, à excepção da cultivar 23, que não aparece em B'), e as 4 a 29 constituem o grupo C'. Em C' podemos considerar cinco pequenos grupos (C'₁, constituído pelas cultivares 4, 6 e 11; C'₂, pelas 13 a 31; os grupos C'₃, C'₄ e C'₅, são constituídos pelas cultivares 8 e 15, 23 e 32, e 18 e 29, respectivamente, e encontram-se mais fracamente correlacionados com os restantes).

As cultivares do primeiro grande grupo (A') mais correlacionadas entre si são: a Kale "K 269" (5) e a Couve de Bruxelas "Electra Group 1" (36)¹; a Couve de Corte (34) e a *B. oleracea* de ciclo curto CrGC 3.4 (40); a Kale ornamental "Red on Green" (10) e a Couve de Valhascos (30); e finalmente a Couve repolho "Large Blood Red" (22) e a Couve lombarda "Brusselse Winter" (39)¹. As duas últimas estão correlacionadas com a Couve repolho "L. B. Sel. Smit" (20), constituindo um grupo, (A'₃), constituído pelas cultivares que se revelaram mais susceptíveis aos isolamentos de origem não homóloga, independentemente da origem do isolamento testado. A Couve lombarda "Brusselse Winter" (39) é, das três, a que apresenta maior susceptibilidade, o que explica o seu distanciamento das outras no fenograma das distâncias entre OTUs (*cf.* Fig.4.8), e a sua peculiar distribuição espacial segundo os dois planos definidos pelas três primeiras componentes principais (*cf.* Fig. 4.4 e 4.5).

No segundo grande grupo (B'), as cultivares mais correlacionadas entre si, são: a Couve roxa "Ruby Ball" (25) e a Couve roxa "Kissendrup" (26)¹, e a Couve ornamental "Fiore Miscuglio" (21) e a Penca de Chaves (28)¹. A Cavolo "Verza San Giovanni" (3) e a Kale (7) constituem um dos grupos existentes em B', fracamente correlacionado com os restantes, e têm como características comuns o facto de se mostrarem susceptíveis a todos os isolamentos de origem não homóloga, à excepção do Ac 506 de *B. rapa*, e de serem as cultivares mais susceptíveis ao isolamento Ac 513, de *R. sativus*.

No terceiro grupo (C'), as cultivares mais correlacionadas entre si, são: a Kale "Jersey" (6) e a Couve-flor "Romanesco Precoce" (11); a Couve-flor "Romanesco Medio Precoce" (13) e a Couve-flor "Romanesco" (17)¹; a Couve repolho "Bacalã" (24) e a Couve Algarvia (33)¹. Este grupo, engloba as cultivares que revelaram ter menor grau de susceptibilidade a *A. candida* de origem homóloga, e está negativamente correlacionado com os outros dois ($r = -0,273$). É neste grupo que se encontram as cultivares que potencialmente apresentam resistência a *A. candida*.

No Quadro 4.5 encontra-se a distribuição das 320 interações testadas cultivar x isolamento nos quatro grupos definidos por Classificação Automática, de acordo com a semelhança evidenciada entre elas. Cada grupo formado é caracterizado:

¹ Para um índice de correlação superior a 0,800.

Quadro 4.5 - Distribuição das interações *B. oleracea* - *A. candida* nos quatro grupos definidos por Classificação Automática.

Variedade/cultivar de <i>B. oleracea</i>	Isolamento de <i>A. candida</i>							
	Ac 501	Ac 502	Ac 503	Ac 506	Ac 508	Ac 509	Ac 510	Ac 513
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>:								
1 - Borecole "Sel. Dammer"	2	2	2	1	1	1	3	3
2 - Kale "Chembere Dzagumhana"	2	2	2	1	1	1	1	1
3 - Cavolo "Verza San Giovanni"	2	2	2	1	1	1	1	1
4 - Kale "Giant Jersey"	4	2	2	1	1	1	3	1
5 - Kale "K 269"	2	2	2	1	1	1	3	3
6 - Kale "Jersey"	4	4	4	1	1	1	3	1
7 - Kale	2	2	2	1	1	1	1	1
8 - Couve galega "Tocha Frisada"	4	2	4	1	1	1	3	3
9 - Couve galega "Branca"	4	2	2	1	1	1	1	1
10 - Kale ornamental "Red on Green"	2	2	2	3	3	1	3	3
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>:								
11 - Couve-flor "Romanesco Precoce"	4	3	4	1	1	1	1	3
12 - Couve-flor "Romanesco Natalino"	2	2	2	1	1	1	1	1
13 - Couve-flor "Romanesco Medio Precoce"	4	4	2	1	1	1	1	1
14 - Couve-flor "Autumn Italian Pyramid Type"	2	2	2	1	1	1	1	1
15 - Couve-flor "Winter Marzolo"	4	4	4	1	1	1	1	1
16 - Couve-flor "Autumn Tasman"	2	2	2	1	1	1	1	1
17 - Couve-flor "Romanesco"	4	4	4	1	1	1	1	1
18 - Couve-flor "Modelet"	4	4	2	1	1	1	1	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>:								
19 - Couve roxa "L. B. Graag Group 1"	2	2	2	1	1	1	1	1
20 - Couve repolho "L. B. Sel. Smit"	2	2	2	1	1	1	3	1
21 - Couve ornamental "Fiore Miscuglio"	2	2	2	1	1	1	3	1
22 - Couve repolho "Large Blood Red"	2	2	2	1	1	1	1	1
23 - Couve repolho "Bacalã"	4	2	2	1	1	1	3	1
24 - Couve repolho "Bacalã"	3	4	1	1	1	1	3	1
25 - Couve roxa "Ruby Ball"	2	2	2	1	1	1	1	1
26 - Couve roxa "Kissendrup"	2	2	2	1	1	1	1	1

Quadro 4.5 (Continuação) - Distribuição das interações *B. oleracea* - *A. candida* nos quatro grupos definidos por Classificação Automática.

Variedade/cultivar de <i>B. oleracea</i>	Isolamento de <i>A. candida</i>							
	Ac 501	Ac 502	Ac 503	Ac 506	Ac 508	Ac 509	Ac 510	Ac 513
<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>:								
27 - Penca de Mirandela	2	2	2	1	1	1	3	1
28 - Penca de Chaves	2	2	2	1	1	1	3	1
29 - Couve de Valhascos	4	4	2	1	1	1	1	1
30 - Couve de Valhascos	2	2	2	1	1	1	3	1
31 - Couve Glória de Portugal	4	2	2	1	1	1	3	3
32 - Coivão	4	2	2	1	1	1	3	1
33 - Couve Algarvia	2	4	2	1	1	1	3	1
34 - Couve de Corte	2	2	2	1	1	1	3	3
<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>:								
35 - Couve de Bruxelas "Gr. sel. v. Prooiem"	2	2	2	1	1	1	3	3
36 - Couve de Bruxelas "Electra Group 1"	2	2	2	1	1	1	3	3
37 - Couve de Bruxelas "de la Halle"	2	2	2	1	1	1	3	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>medullosa</i>:								
38 - Marrowstem Kale "New Zealand" Medium	2	2	2	1	1	1	1	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>sabauda</i>:								
39 - Couve lombarda "Brusselse Winter"	2	2	2	4	1	4	4	1
<i>B. oleracea</i> de Ciclo Curto:								
40 - <i>B. oleracea</i> CrGC 3.4 (testemunha)	2	2	2	1	1	1	3	3

i) pelo predomínio de um ou mais fenótipos de interacção (quando o valor do critério¹ para esses fenótipos é igual ou superior ao valor 2, e a probabilidade de terem sido incluídos ao acaso próxima do valor zero).

ii) pela baixa frequência de outro ou outros fenótipos de interacção (quando o valor da entidade critério para esses fenótipos é igual ou inferior ao valor -2, com probabilidade próxima de zero). No Anexo IV.3 encontra-se a caracterização dos grupos formados.

Por análise do Quadro 4.5 verifica-se que, 197 das 200 interacções não homólogas (98,5%) *B. oleracea* - *A. candida* testadas, foram incluídas nos grupos 1 e 3, caracterizados por elevadas frequências do fenótipo de interacção [(F)N+FN] (critério = 15,395; 164 interacções - grupo 1) e NN (critério = 15,391; 33 interacções - grupo 3), respectivamente (Anexo IV.3). As restantes três, correspondendo às interacções da Couve Lombarda "Brusselse Winter" (39) com os isolamentos Ac 506, Ac 509 e Ac 510 de *B. rapa*, foram incluídas no grupo 4, caracterizado por uma elevada frequência do fenótipo de interacção S₁ (critério = 14,307) e baixo valor de [(F)N+FN] (critério = - 4,992), revelador de susceptibilidade, o que está de acordo com os resultados anteriormente obtidos.

As 120 interacções homólogas foram incluídas na sua quase totalidade (117 das 120 interacções, ou seja, 97,5%) nos grupos 2 e 4 (*cf.* Anexo IV.3).

O grupo 2, caracterizado por elevada frequência do fenótipo de interacção [S₂+S₃] (critério = 16,551), e por muito baixas frequências dos fenótipos de interacção [(F)N+FN] (critério = - 14,887) e NN (critério = - 5,045) inclui 91 das 120 interacções (75,8%), revelando grande susceptibilidade das cultivares aos respectivos isolamentos homólogos. O grupo 4, já anteriormente definido, agrupa as interacções representativas de susceptibilidade moderada, abrangendo 26 das 120 interacções homólogas (21,7%). As restantes três interacções homólogas, correspondem às interacções da couve-flor "Romanesco Precoce" (11) com o isolamento Ac 502, e às da Couve Repolho "Bacalã" (24) com os isolamentos Ac 501 e Ac 503, e distribuem-se pelos grupos 3, 3 e 1, respectivamente, pondo estas cultivares em situação de destaque, uma vez que revelam menor susceptibilidade àqueles isolamentos de origem homóloga.

A Classificação Automática permite ainda a conotação dos grupos formados com alguns dos isolamentos de *A. candida*. Enquanto o grupo 1 se identifica com as interacções de *B. oleracea* com os isolamentos Ac 508 (critério = 7,56), Ac 509 (critério = 7,56), Ac 506 (critério = 6,89) e, em menor grau, com o isolamento Ac 513 (critério = 3,42), o grupo 3

¹ Um determinado fenótipo de interacção (FI) caracteriza tanto melhor um grupo quanto mais o valor do critério for superior a 2; a baixa frequência de um FI num grupo é tanto mais relevante quanto mais o valor do critério for inferior a -2. Um critério forte, num sentido ou noutro, deve, em valor absoluto, afastar-se o mais possível do valor dois (St. Aubyn, comunicação pessoal).

identifica-se sobretudo com o isolamento Ac 510 (critério = 6,76), e em menor grau, com o Ac 513 (critério = 2,88). Por seu turno, o grupo 2, que abrange interacções altamente susceptíveis identifica-se fortemente com os isolamentos Ac 503 (critério = 7,84), Ac 502 (critério = 6,81) e Ac 501 (critério = 5,17), e o grupo 4, com interacções reveladoras de moderada susceptibilidade, identifica-se sobretudo com o isolamento Ac 501 (critério = 4,49), e em menor grau, com o Ac 502 (critério = 2,51).

Pelo anteriormente referido parece não haver dúvidas acerca da maior patogenicidade dos isolamentos de *A. candida* de natureza homóloga, quando comparados com os restantes, pelo que nos pareceu da maior conveniência fazer a análise em separado das interacções homólogas e não homólogas *B. oleracea* - *A. candida*, por forma a melhor poder averiguar das diferenças entre cultivares de *B. oleracea* e/ou entre isolamentos de *A. candida*.

4.4.1.1 - Interacções homólogas *B. oleracea* - *A. candida*.

Ao analisar os valores percentuais médios de infecção causados por isolamentos de *A. candida* de origem homóloga em *B. oleracea* (cf. Quadro 4.3), verifica-se a existência de uma gradação destes ao longo da sequência Ac 501 (Esposende) → Ac 502 (Lourinhã) → Ac 503 (Costa de Caparica), apesar daqueles valores não diferirem muito entre si (87,0%, para o Ac 501; 90,2%, para o Ac 502; e 90,9% para o Ac 503). Quando se compara, para cada um destes isolamentos, os valores percentuais médios de inclusão das cultivares por eles infectadas na classe de susceptibilidade máxima ([S₂+S₃]) (cf. Anexo IV.1), verifica-se uma gradação no mesmo sentido (75,1%, para o Ac 501; 79,1%, para o Ac 502; e 85,6%, para o Ac 503), o que nos leva a supor haver uma maior patogenicidade do isolamento Ac 503. O isolamento Ac 501 parece ser o menos patogénico, e o Ac 502 parece situar-se numa posição intermédia entre os dois anteriores. Este facto poderia explicar as diferença de valores verificados para a entidade critério no anterior grupo 2, de susceptibilidade máxima, mais conotado com o isolamento Ac 503 do que com os outros dois, e menos com o Ac 501 do que com o Ac 502 (cf. § 4.4.1); e também o facto de o anterior grupo 4, revelador de susceptibilidade moderada, se identificar mais com os isolamentos Ac 501 e Ac 502 (mas mais com o primeiro do que com o segundo).

Esta diferença de comportamento face aos isolamentos não existe nalgumas cultivares muito susceptíveis (como a Couve de Bruxelas "de la Halle" (37), entre outras, cujas plantas responderam com igual susceptibilidade, independentemente do isolamento de origem homóloga testado, sendo todos os fenótipos de interacção incluídos na classe [S₂+S₃]), mas sim naquelas em que ocorreram, em maior ou menor grau, fenótipos de interacção representativos de susceptibilidade moderada e/ou de resistência [Kale "Giant Jersey" (4), Kale "Jersey" (6), Couve galega "Branca" (9), Couve-flor "Romanesco Precoce"(11), Couve-

flor "Romanesco Natalino" (12), Couve-flor "Romanesco Medio Precoce" (13), Couve-flor "Winter Marzolo" (15), e a Couve repolho "Bacalã" (24), entre as menos susceptíveis; ou em cultivares com total susceptibilidade, como as Couves de Valhascos (29) e (30), mas nas quais existem plantas enquadradas na classe S1] (cf. Anexo IV.1). É à custa destas cultivares que se detecta esta tendência geral de maior patogenicidade ao longo da sequência Ac 501 → Ac 502 → Ac 503.

No Quadro 4.6 encontra-se a distribuição das 120 interações homólogas *B. oleracea* - *A. candida* nos quatro grupos formados por Classificação Automática. A caracterização dos grupos encontra-se no Anexo IV.4. No Quadro 4.7 encontra-se a distribuição percentual dos fenótipos de interação em cada um dos grupos formados por Classificação Automática, para as combinações homólogas *B. oleracea* - *A. candida*, e a sua distribuição percentual no conjunto dessas 120 interações.

O grupo 1, no qual se incluem 82 das 120 interações (68,3%), é caracterizado por uma elevada frequência do fenótipo de interação [S₂+S₃] (critério = 9,936) e muito baixas frequências dos restantes (Quadro 4.7 e Anexo IV.4). Inclui interações *B. oleracea* - *A. candida* altamente compatíveis, ou seja, cultivares muito susceptíveis ao respectivo isolamento testado.

Assim, verifica-se que nas cultivares Borecole "Sel. Dammer" (1), Kale "Chembere Dzagumhana" (2), Cavolo "Verza San Giovanni" (3), Kale "K 269" (5), Kale (7), Kale ornamental "Red on Green" (10), Couve-flor "Romanesco Natalino" (12), Couve-flor "Autumn talian Pyramid Type" (14), Couve-flor "Autumn Tasman" (16), Couve roxa "L. B. Graag Group 1" (19), Couve repolho L. B. Sel. Smit." (20), Couve ornamental "Fiore Musciglio" (21), Couve repolho "Large Blood Red" (22), Couve Roxa "Ruby Ball" (25), Couve Roxa "Kissendrup" (26), Penca de Mirandela (27), Penca de Chaves (28), Couve de Valhascos (30), Couve de Corte (34), Couve de Bruxelas "Gr. Sel. V. Prooim" (35), Couve de Bruxelas "Electra Group 1" (36), Couve de Bruxelas "de la Halle" (37), Marrowstem kale "New Zealand" Medium (38), Couve Lombarda "Brusselse Winter" (39) e CrGC 3.4 (40) de *B. oleracea*, apenas se verificam combinações altamente compatíveis, independentemente do isolamento homólogo de *A. candida* testado (cf. Quadro 4.6).

O grupo 2 engloba 23 interações e é caracterizado por uma elevada frequência do fenótipo de interação [(F)N+FN], baixo [S₂+S₃] e algum S₁ (critérios de 8,871, - 6,770 e 2,804, respectivamente, cf. Quadro 4.7 e Anexo IV.4). Este grupo tem a particularidade de ser o que apresenta a mais elevada frequência de interações reveladoras de resistência (32,5%). As cultivares "Couve-flor" Romanesco Médio Precoce" (13), Couve-flor "Romanesco" (17), Couves repolho "Bacalã" (23) e Couve Glória de Portugal (31), aparecem incluídas neste grupo (grupo 2), independentemente do isolamento de *A. candida* de origem homóloga testado.

Quadro 4.6 - Distribuição das interações homólogas isolamento-hospedeiro nos quatro grupos definidos por Classificação Automática.

Variedade/cultivar de <i>B. oleracea</i>	Isolamento de <i>A. candida</i>		
	Ac 501	Ac 502	Ac 503
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> :			
1 - Borecole "Sel. Dammer"	1	1	1
2 - Kale "Chembere Dzagumhana"	1	1	1
3 - Cavolo "Verza San Giovanni"	1	1	1
4 - Kale "Giant Jersey"	2	3	2
5 - Kale "K 269"	1	1	1
6 - Kale "Jersey"	3	3	2
7 - Kale	1	1	1
8 - Couve galega "Tocha Frisada"	3	1	2
9 - Couve galega "Branca"	3	1	1
10 - Kale ornamental "Red on Green"	1	1	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> :			
11 - Couve-flor "Romanesco Precoce"	2	3	2
12 - Couve-flor "Romanesco Natalino"	1	1	1
13 - Couve-flor "Romanesco Medio Precoce"	2	2	2
14 - Couve-flor "Autumn Italian Pyramid Type"	1	1	1
15 - Couve-flor "Winter Marzolo"	2	4	4
16 - Couve-flor "Autumn Tasman"	1	1	1
17 - Couve-flor "Romanesco"	2	2	2
18 - Couve-flor "Modelet"	4	4	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> :			
19 - Couve roxa "L. B. Graag Group 1"	1	1	1
20 - Couve repolho "L. B. Sel. Smit"	1	1	1
21 - Couve ornamental "Fiore Miscuglio"	1	1	1
22 - Couve repolho "Large Blood Red"	1	1	1
23 - Couve repolho "Bacalã"	2	2	2
24 - Couve repolho "Bacalã"	3	2	2
25 - Couve roxa "Ruby Ball"	1	1	1
26 - Couve roxa "Kissendrup"	1	1	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i> :			
27 - Penca de Mirandela	1	1	1
28 - Penca de Chaves	1	1	1
29 - Couve de Valhascos	4	4	1
30 - Couve de Valhascos	1	1	1
31 - Couve Glória de Portugal	2	2	2
32 - Coivão	1	1	2
33 - Couve Algarvia	3	3	2
34 - Couve de Corte	1	1	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> :			
35 - Couve de Bruxelas "Gr. sel. v. Prooitem"	1	1	1
36 - Couve de Bruxelas "Electra Group 1"	1	1	1
37 - Couve de Bruxelas "de la Halle"	1	1	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>medullosa</i> :			
38 - Marrowstem Kale "New Zealand" Medium	1	1	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>sabauda</i> :			
39 - Couve lombarda "Brusselse Winter"	1	1	1
<i>B. oleracea</i> de Ciclo Curto:			
40 - <i>B. oleracea</i> CrGC 3.4 (testemunha)	1	1	1

Quadro 4.7 - Distribuição dos fenótipos de interacção de combinações homólogas *A. candida* - *B. oleracea* nos quatro grupos definidos por Classificação Automática e na totalidade das interacções.

Fenótipo de Interacção	Percentagem de inclusão				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Geral
NN	0,25	1,98	15,28	0,57	1,72
[(F)N + FN]	1,45	32,54	20,40	3,43	8,93
S ₁	2,91	16,68	16,00	56,35	9,20
[S ₂ + S ₃]	95,40	48,80	48,32	39,64	80,15

As cultivares Kale "Giant Jersey" (4) e Couve-flor "Romanesco Precoce" (11) aparecem incluídas neste grupo quando os isolamentos testados são o Ac 501 e Ac 503. As interacções da Couve Repolho "Bacalã" (24) com os isolamentos Ac 502 e Ac 503 aparecem também incluídas neste grupo, assim como a interacção da Couve-flor "Winter Marzolo" (15) com o isolamento Ac 501. As interacções das cultivares Kale "Jersey" (6), Couve galega Tocha Frisada (8), Coivão (32) e Couve Algarvia (33) são também incluídas neste grupo quando o isolamento testado é o Ac 503, que aparece relacionado com este grupo, embora fracamente (critério = 1,86), (*cf.* Anexo IV.4).

O grupo 3 engloba nove interacções. É caracterizado por uma elevada frequência do fenótipo de interacção NN (critério = 9,261), por baixo [S₂+S₃] (critério = - 4,020) e algum [(F)N+FN] (critério = 2,521). É o grupo que apresenta a mais elevada frequência de interacções reveladoras de imunidade (15,28%), apresentado um total de 35,7% de interacções representativas de imunidade e/ou resistência. Pertencem a este grupo as interacções das cultivares Kale "Giant Jersey" (4) e Couve-flor "Romanesco Precoce" (11), com o isolamento Ac 502; as das cultivares Kale "Jersey" (6); e Couve Algarvia (33) com os isolamentos Ac 501 e Ac 502, e os das cultivares Couve Galega "Tocha Frisada" (8) e Couve Galega "Branca"(9) com o isolamento Ac 501, que também aparece relacionado com este grupo, embora fracamente (critério = 1,77).

Por último, o grupo 4, apresenta a característica de ser o que engloba maior número de interacções representativas de susceptibilidade moderada, com um elevado valor do fenótipo de interacção S₁ (critério = 8,337) e baixo valor de [S₂+S₃] (critério = - 4,122; *cf.* Quadros 4.7 e Anexo IV.4). É composto por seis interacções, correspondendo às interacções da Couve-flor "Winter Marzolo" (15) com os isolamentos Ac 502 e Ac 503, e às da Couve-flor "Modelet" (18)

e Couve de Valhascos (29) com os isolamentos Ac 501 e Ac 502. Esta classe é conotada com o isolamento Ac 502, embora fracamente (critério = 1,31).

A tendência geral é para haver um predomínio de susceptibilidade das cultivares de *B. oleracea* aos isolamentos homólogos de *A. candida*, independentemente do grupo em que estão incluídas (cf. Quadro 4.7). O grupo 1 abrange cultivares que apresentam grande susceptibilidade aos isolamentos homólogos de *A. candida*, verificando-se infecções percentuais superiores a 80,0% (cf. Quadros 4.3 e 4.6), atingindo na maior parte dos casos valores que se situam entre os 93,3 e os 100,0%, com o valor médio de 98,3%, sendo o fenótipo de interacção [S₂+S₃] largamente predominante (95,4% no grupo). É neste grupo de cultivares que se verifica a maior patogenicidade de *A. candida* independentemente do isolamento de origem homóloga testado. Seguem-se-lhe as cultivares que constituem o grupo 4, onde os níveis de infecção por *A. candida* rondam os 96,0%, mas com um predomínio do fenótipo de interacção S₁ (56,4% no grupo), representativo de susceptibilidade moderada, evidenciando uma menor patogenicidade de *A. candida* relativamente a estas cultivares. A patogenicidade de um isolamento varia em função da maior ou menor susceptibilidade das cultivares, mas, para uma dada cultivar, pode também variar em função do isolamento. Assim, verifica-se que a Couve-flor "Modelet" (18) e a Couve de Valhascos (29) apresentam uma resposta diferencial ao isolamento Ac 503 (Costa de Caparica), cujas interacções são incluídas no grupo de maior susceptibilidade, enquanto que as interacções com os outros dois isolamentos homólogos se enquadram na classe 4, representativa de susceptibilidade moderada.

Nos grupos 2 e 3, com valores de infecção médios de 65,5 e 64,3%, respectivamente (cf. Quadro 4.7) encontram-se as cultivares para as quais se verificou haver menor patogenicidade de *A. candida*, mas que são bastante heterogéneas entre si.

A partir do Quadro 4.3 podemos estabelecer entre as interacções homólogas *B. oleracea* - *A. candida* incluídas nos grupos 2 e 3 (cf. Quadro 4.6) alguns subgrupos, consoante as percentagens de infecção verificadas. Com o objectivo de avaliar a potencialidade das cultivares como fonte de plantas resistentes a *A. candida*, considerou-se o menor dos valores de resistência obtidos nas interacções com os três isolamentos por cultivar para o estabelecimento dos subgrupos, uma vez que este valor pode variar consideravelmente com o isolamento testado (é o caso da Couve Repolho "Bacalã" (24), em que este valor varia de 48,3% para interacções com o isolamento Ac 502, até 70,0%, quando a interacção ocorre com o isolamento Ac 501). Os subgrupos formados encontram-se no Quadro 4.8. Por análise deste Quadro destacam-se, pela percentagem de plantas resistentes, três cultivares: a Couve-flor "Romanesco Precoce" (11) com um mínimo de 30,0% de plantas resistentes, a Couve Algarvia (33) com 33,3%, e por último a Couve repolho Bacalã (24), com um mínimo de 48,3%, parecendo esta última bastante promissora como fonte de resistência ao patogénio, nas condições em que decorreu o ensaio. Em futuros estudos seria oportuno testar de novo estas cultivares com estes e outros isolamentos

homólogos para confirmação dos resultados obtidos, uma vez que os fenótipos de interacção obtidos podem variar bastante em função do isolamento testado.

Quadro 4.8 - Percentagem mínima de plantas incluídas em classes fenotípicas representativas de imunidade e/ou resistência, por cultivar de *B. oleracea* totalmente incluída nos grupos 2 e 3.

Variedade / Cultivar	% mínima de plantas resistentes		
	20-29	30-39	40-49
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> :			
11 - Couve-flor "Romanesco Precoce"		x	
13 - Couve-flor "Romanesco Medio Precoce"	x		
17 - Couve-flor "Romanesco"	x		
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> :			
23 - Couve repolho "Bacalã" (HRI 11490)	x		
24 - Couve repolho "Bacalã" (HRI 11555)			x
<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i> :			
31 - Couve Glória de Portugal	x		
33 - Couve Algarvia		x	

4.4.1.2 - Interacções não homólogas *B. oleracea* - *A. candida*

De entre os isolamentos de origem não homóloga, o Ac 513, proveniente de *R. sativus*, revelou ser o menos patogénico em *B. oleracea* (cf. § 4.4.1).

Entre os isolamentos de *B. rapa*, verificou-se que os isolamentos Ac 508 (Lourinhã) e Ac 510 (Póvoa do Varzim1) tiveram maior capacidade de infecção em *B. oleracea* (com 60,0% e 45,0% de cultivares infectadas, respectivamente, contra 22,5% e 35,0%, dos isolamentos Ac 506 e Ac 509; cf. Quadro 4.3). Nas cultivares infectadas em comum pelos quatro isolamentos [Kale "Chembere Dzagumhana" (2), Couve repolho L. B. Sel. Smit." (20), Couve Repolho "Large Blood Red" (22), Couve de Valhascos (30), Couve Lombarda "Brusselse Winter" (39) e CrGC 3.4 (40)], a percentagem de plantas infectadas é também, por norma, superior nas interacções com aqueles dois isolamentos (constitui excepção a Couve repolho " L. B. Sel. Smit." (20), em que as infecções causadas pelos isolamentos Ac 506 e Ac 509 revelaram ser superiores às causadas pelos outros dois), e maioritariamente incluídas na classe fenotípica representativa de maior susceptibilidade, [S2+S3] (cf. Anexo IV.2), enquanto que as interacções com os isolamentos Ac 506 e Ac 509 se distribuem mais equitativamente pelas classes de susceptibilidade S1 e [S2+S3], muitas vezes predominantemente na primeira, revelando menor

agressividade. Isto verifica-se na generalidade das cultivares infectadas. Mesmo numa cultivar bastante susceptível a infecções cruzadas, como a Couve Lombarda "Brusselse Winter" (39), se verifica esta tendência.

Nas cultivares exclusivamente infectadas pelos isolamentos de *B. rapa* Ac 508 e Ac 510 [Kale "K 269" (5), Couve galega "Branca"(9), Couve-flor "Modelet" (18), Couve roxa "L. B. Graag Group 1" (19), Couve Roxa "Kissendrup" (26), Couve de Bruxelas "Electra Group 1" (36) e Couve de Bruxelas "de la Halle" (37)], verifica-se haver uma ligeira tendência do isolamento Ac 508 para causar maior susceptibilidade nalgumas destas cultivares (o que poderá estar relacionado com a maior semelhança verificada entre os caracteres S1 e S2 deste isolamento e os caracteres S1 e S2 dos isolamentos de origem homóloga (cf. § 4.4.1)).

No Quadro 4.9 encontra-se a distribuição das 200 interacções não homólogas *B. oleracea* - *A. candida* nos três grupos formados pelo método de Classificação Automática, e no Anexo IV.5 a caracterização dos grupos formados. No Quadro 4.10 encontra-se a distribuição percentual dos fenótipos de interacção em cada um dos grupos formados, e no conjunto das 200 interacções não homólogas.

O grupo 1 abrange 153 das 200 interacções testadas (76,5%), e é caracterizado por uma elevadíssima frequência do fenótipo de interacção [(F)N+FN], associado a baixas frequências dos fenótipos de interacção NN, S₁ e [S₂+S₃] (critérios de 11,688; -10,722; - 5,284, e - 4,507, respectivamente). Neste grupo há 96,0% de interacções que apresentam como fenótipo de interacção [(F)N+FN], indicador de elevada resistência a isolamentos de origem não homóloga (cf. Quadro 4.10).

Por análise do Quadro 4.10 verifica-se que o fenótipo de interacção [(F)N+FN] é largamente predominante, quer na globalidade das interacções (89,8%), quer em cada um dos grupos formados por Classificação Automática (96,0% no grupo 1; 72,4% no grupo 2, e 60,7% no grupo 3), o que salienta em termos gerais uma elevada resistência de *B. oleracea* a infecções de *A. candida* de origem não homóloga.

As interacções das 40 cultivares com os isolamentos Ac 506, Ac 508 e Ac 509 enquadram-se na sua quase totalidade no grupo 1 (cf. Quadro 4.9). À excepção das cultivares Kale Ornamental "Red on Green" (10), Couve Repolho" L. B. Sel. Smit" (20), Couve Repolho "Large Blood Red" (22), Couve de Valhascos (30) e Couve Lombarda "Brusselse Winter" (39), todas as outras se enquadram no grupo 1 quando os isolamentos testados são o Ac 506, Ac 508 e Ac 509 de *B. rapa*, os que estão mais fortemente relacionados com este grupo (critérios = 2,13, 2,65 e 3,22, respectivamente; cf. Anexo IV.5). Também se incluem neste grupo todas as interacções das oito cultivares de *B. oleracea* var. *botrytis*, para os isolamentos Ac 510 e Ac 513 [à excepção da cultivar Couve-flor "Romanesco Precoce" (11) para o isolamento Ac 513] e todas as interacções das oito cultivares de *B. oleracea* var. *capitata* para o isolamento Ac 513, de *R. sativus* (cf. Quadro 4.9).

Quadro 4.9 - Distribuição das interações não homólogas isolamento-hospedeiro nos três grupos definidos por Classificação Automática.

Variedade/cultivar de <i>B. oleracea</i>	Isolamento de <i>A. candida</i>				
	Ac 506	Ac 508	Ac 509	Ac 510	Ac 513
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> :					
1 - Borecole "Sel. Dammer"	1	1	1	2	2
2 - Kale "Chembere Dzagumhana"	1	1	1	1	1
3 - Cavolo "Verza San Giovanni"	1	1	1	1	3
4 - Kale "Giant Jersey"	1	1	1	2	1
5 - Kale "K 269"	1	1	1	2	2
6 - Kale "Jersey"	1	1	1	2	1
7 - Kale	1	1	1	3	1
8 - Couve galega "Tocha Frisada"	1	1	1	2	2
9 - Couve galega "Branca"	1	1	1	1	1
10 - Kale ornamental "Red on Green"	2	2	1	2	2
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> :					
11 - Couve-flor "Romanesco Precoce"	1	1	1	1	2
12 - Couve-flor "Romanesco Natalino"	1	1	1	1	1
13 - Couve-flor "Romanesco Medio Precoce"	1	1	1	1	1
14 - Couve-flor "Autumn Italian Pyramid Type"	1	1	1	1	1
15 - Couve-flor "Winter Marzolo"	1	1	1	1	1
16 - Couve-flor "Autumn Tasman"	1	1	1	1	1
17 - Couve-flor "Romanesco"	1	1	1	1	1
18 - Couve-flor "Modelet"	1	1	1	1	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> :					
19 - Couve roxa "L. B. Graag Group 1"	1	1	1	1	1
20 - Couve repolho "L. B. Sel. Smit"	1	1	3	2	1
21 - Couve ornamental "Fiore Miscuglio"	1	1	1	2	1
22 - Couve repolho "Large Blood Red"	3	3	3	3	1
23 - Couve repolho "Bacalã"	1	1	1	2	1
24 - Couve repolho "Bacalã"	1	1	1	2	1
25 - Couve roxa "Ruby Ball"	1	1	1	1	1
26 - Couve roxa "Kissendrup"	1	1	1	1	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i> :					
27 - Penca de Mirandela	1	1	1	2	1
28 - Penca de Chaves	1	1	1	2	1
29 - Couve de Valhascos	1	1	1	1	1
30 - Couve de Valhascos	2	2	1	2	1
31 - Couve Glória de Portugal	1	1	1	2	2
32 - Coivão	1	1	1	2	1
33 - Couve Algarvia	1	1	1	2	1
34 - Couve de Corte	1	1	1	2	2
<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> :					
35 - Couve de Bruxelas "Gr. sel. v. Prooitem"	1	1	1	2	2
36 - Couve de Bruxelas "Electra Group 1"	1	1	1	2	2
37 - Couve de Bruxelas "de la Halle"	1	1	1	2	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>medullosa</i> :					
38 - Marrowstem Kale "New Zealand" Medium	1	1	1	1	1
<i>B. oleracea</i> var. <i>sabauda</i> :					
39 - Couve lombarda "Brusselse Winter"	3	3	3	3	1
<i>B. oleracea</i> de Ciclo Curto:					
40 - <i>B. oleracea</i> CrGC 3.4 (testemunha)	2	1	1	2	2

Quadro 4.10 - Distribuição dos fenótipos de interacção de combinações não homólogas *A. candida* - *B. oleracea* nos três grupos definidos por Classificação Automática e na totalidade das interacções.

Fenótipo de Interacção	Percentagem de inclusão			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Geral
NN	1,87	25,26	4,25	6,21
[(F)N+FN]	96,02	72,42	60,68	89,83
S1	0,52	0,84	12,22	1,22
[S2+S3]	1,59	1,47	22,85	2,74

O grupo 2 engloba 36 das 200 interacções (18,0%). É caracterizado por uma elevada frequência do fenótipo de interacção NN (critério = 12,218), e por baixos valores de [(F)N+FN] (critério = - 8,533). Nele estão incluídas as interacções das cultivares Kale Ornamental "Red on Green" (10) e Couve Glória de Portugal (31) com os isolamentos Ac 506 e Ac 508, a da *B. oleracea* de ciclo curto (CrGC3.4) com o isolamento Ac 506, e muitas das interacções das cultivares testadas com os isolamentos Ac 510 e Ac 513 (*cf.* Quadro 4.9), os mais fortemente relacionados com este grupo, especialmente o primeiro (critério = 5,64 e 1,50, respectivamente).

O grupo 3 é composto por onze interacções, e caracterizado pela existência de elevadas frequências dos fenótipos de interacção S1 e [S2+S3] (critério = 11,070 e 10,557, respectivamente) e muito baixa frequência do fenótipo de interacção [(F)N+FN] (critério = - 7,357) como pode ser observado nos Quadros 4.9 e 4.10. Este grupo engloba interacções *B. oleracea* - *A. candida* altamente compatíveis, apesar de a infecção ocorrer num hospedeiro não homólogo. Os fenótipos de interacção da cultivar Cavolo "Verza San Giovanni" (3) com o isolamento Ac 513 de *R. sativus*, e da cultivar Kale (7) com o isolamento Ac 510 enquadram-se neste grupo, assim como o da Couve repolho "L. B. Sel. Smit" (20) relativamente ao isolamento Ac 509. Todos os fenótipos de interacção da Couve repolho "Large Blood Red" (22) e da Couve Lombarda "Brusselse Winter" (39) se enquadram no grupo 3, de grande susceptibilidade, qualquer que seja o isolamento de *B. rapa* testado. Não se encontrou correlação entre este grupo e qualquer dos cinco isolamentos não homólogos de *A. candida* testados (*cf.* Quadro 4.9).

Verifica-se que, nas interações entre as cultivares de *B. oleracea* testadas e isolamentos não homólogos, a nota dominante é a resistência, tomando o fenótipo de interação [(F)N+FN] valores médios de 89,8% (cf. Quadro 4.10), o que vem corroborar a existência de raças fisiológicas em *A. candida*, descrita por diversos autores ((Pound & Williams, 1963; Verma *et al.*, 1975; Delwiche & Williams, 1977; Pidskalny & Rimmer, 1985; Hill *et al.*, 1988). No entanto existem cultivares de *B. oleracea* que apresentam susceptibilidade a isolamentos não homólogos de *A. candida*, como é o caso das cultivares Couve repolho "Large Blood Red" (22) e Couve lombarda "Brusselse Winter" (39), em que se verificou haver o maior número de infecções cruzadas (cf. Quadro 4.3), independentemente do isolamento de *A. candida* proveniente de *B. rapa* testado, e que atingem nesta última cultivar valores próximos dos 50%. Relativamente às infecções causadas pelo isolamento Ac 513, proveniente de *R. sativus*, elas são mais evidentes nas cultivares Cavolo "Verza San Giovanni" (3) e Kale (7), assumindo em ambas, o fenótipo de interação [S₁] grande importância relativa (Anexo IV.2).

É de salientar que as cultivares em que a existência de infecções cruzadas se revelou mais significativa [Couve Lombarda "Brusselse Winter" (39), Couve repolho "Large Blood Red" (22), Cavolo "Verza San Giovanni" (3) e "Kale" (7)] pertencem todas ao anterior grupo 1 (cf. § 4.4.1.1.), que abrange cultivares com grande susceptibilidade a isolamentos homólogos, provenientes de *B. oleracea* (cf. Quadro 4.6). Verifica-se também que estas cultivares são susceptíveis a infecções cruzadas, quer os isolamentos não homólogos sejam provenientes de *B. rapa* ou de *R. sativus* (cf. Quadro 4.3).

Nas cultivares anteriormente incluídas nos grupos de maior resistência a isolamentos de origem homóloga (grupos 2 e 3), verifica-se uma tendência no mesmo sentido. Das nove cultivares incluídas nesta classe independentemente do isolamento homólogo testado, apenas ocorreram infecções cruzadas nas cultivares Kale "Giant Jersey" (4), quando testada com o isolamento Ac 513, na Couve repolho "Bacalã" (24), quando testada com o isolamento Ac 508, e na Couve Algarvia (33), quando testada com o isolamento Ac 509, com valores de 3,3, 3,4 e 5,0%, respectivamente.

Verifica-se que os isolamentos provenientes de *B. rapa* conseguem infectar maior número de cultivares de *B. oleracea*, causando por norma maiores níveis de infecção do que os de *R. sativus* (cf. Quadro 4.3), o que não é de estranhar visto haver uma maior proximidade genética entre espécies do mesmo género (*B. oleracea* e *B. rapa*) do que entre espécies de géneros diferentes (*B. oleracea* e *R. sativus*), pelo que é natural que os isolamentos oriundos de *B. rapa* causem maior patogenicidade em *B. oleracea*.

4.4.1.3 - Conclusões

No conjunto das interacções testadas, os isolamentos de origem homóloga, Ac 501 (Esposende), Ac 502 (Lourinhã) e Ac 503 (Costa de Caparica), revelaram ser os mais patogénicos em *B. oleracea*, causando maiores níveis de infecção. O grupo formado por Classificação Automática, em que foram incluídas as interacções em que houve predomínio do fenótipo de interacção [S2+S3], de grande susceptibilidade, foi conotado com estes três isolamentos, embora um pouco mais com o Ac 503. Este isolamento conseguiu, em média, infectar mais plantas, provocando-lhes sintomas mais graves do que os outros dois isolamentos, mais correlacionados entre si (*cf.* Fig. 4.7). As diferenças entre eles apenas puderam ser avaliadas em cultivares com algum nível genético de resistência e/ou tolerância, uma vez que as de maior susceptibilidade responderam com iguais sintomas aos três isolamentos.

Dos restantes isolamentos, o Ac 513 (Portimão), proveniente de *R. sativus*, revelou ser o menos patogénico, quer pelo reduzido número de cultivares infectadas, quer pelas baixas frequências de infecção verificadas (*cf.* Quadro 4.3).

Os isolamentos provenientes de *B. rapa* revelaram uma patogenicidade intermédia, mas também aqui se notaram diferenças entre os isolamentos, verificando-se um aumento crescente da patogenicidade ao longo da sequência Ac 506 (Portimão) —> Ac 509 (Costa de Caparica) —> Ac 510 (Póvoa do Varzim1) —> Ac 508 (Lourinhã). Também aqui as maiores diferenças entre isolamentos foram detectadas nas cultivares menos susceptíveis a infecções cruzadas.

5 - DISCUSSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste estudo apontam no sentido de os isolamentos portugueses de *A. candida*, provenientes de *B. oleracea*, de *B. rapa* e de *R. sativus*, serem heterotáticos.

Nos isolamentos provenientes de *B. oleracea* detectaram-se dois grupos com "mating types" compatíveis: um, englobando os isolamentos Ac 501 de Esposende, Ac 502 da Lourinhã e Ac 504 de Torres Vedras, e outro, englobando os isolamentos Ac 503 de Costa de Caparica e Ac 505 de Loures (cf. Quadro 3.3). Os IPU's de Ac 501 e Ac 502, mostraram ter capacidade de produzir oósporos, embora em reduzido número, comportando-se no entanto como heterotáticos quando em presença de IPU's homólogos pertencentes ao "mating type" complementar (cf. Quadros 3.2 e 3.3). Este comportamento distingue-os dos restantes isolamentos homólogos, e leva a supor estarmos em presença de dois casos de homotalismo secundário, já verificado nalguns outros fungos da classe Oomiceta, nomeadamente em *Phytophthora* spp. (Mortimer *et al.*, 1977), em *P. parasitica* (Sherriff & Lucas, 1989b), e em *B. lactucae* (Michelmores & Ingram, 1982). Na determinação dos sistemas sexuais verificou-se que, nos cotilédones onde as pústulas atingiam maiores dimensões, se atingiam também as maiores densidades de esporulação sexuada, o que está de acordo com os resultados obtidos por Liu (1992).

Os sete isolamentos provenientes de *B. rapa* revelaram pertencer todos ao mesmo "mating type", uma vez que, independentemente das combinações entre IPU's formados (cf. Quadro 3.4), nunca foi detectada a presença de oósporos.

O isolamento Ac 513, proveniente de *R. sativus*, revelou ser heterotático, apesar de se ter detectado a existência de dois "mating types" compatíveis (cf. Quadro 3.2).

Quanto à patogenicidade dos isolamentos, esta foi testada recorrendo apenas a cultivares de *B. oleracea* (cf. Quadro 4.1), em plântulas na fase cotiledonar, e apenas foram testados oito dos treze isolamentos inicialmente sujeitos a estudo para caracterização sexual (cf. Quadro 4.2). Verificou-se uma maior patogenicidade por parte dos isolamentos homólogos, provenientes de *B. oleracea* (cf. Quadro 4.3 e § 4.4.1) o que está de acordo com a hipótese de existir uma elevada especialização fisiológica em *A. candida*, referida por diversos autores (Pound & Williams, 1963; Verma *et al.*, 1975; Delwiche & Williams, 1977; Pidskalny & Rimmer, 1985; Hill *et al.*, 1988). Apesar dessa especialização detectou-se a existência de infecções cruzadas, causadas mais frequentemente por isolamentos de *B. rapa*, mas também pelo de *R. sativus*, o que vem confirmar o facto de os isolamentos de *A. candida* poderem também ser capazes de causar infecção em alguns génotipos de outras espécies da família das crucíferas, tal como foi referido por Pound & Williams (1963), Petrie (1988), e Liu & Rimmer (1991).

As cultivares em que a existência de infecções cruzadas se revelou mais significativa, independentemente da proveniência dos isolamentos não homólogos como a Cavolo "Verza San Giovanni" (3), a "Kale" (7), a Couve Repolho "L. B. Sel. Smit" (20), a Couve Repolho "Large

Blood Red" (22) e a Couve Lombarda "Brusselse Winter" (39), revelaram também grande susceptibilidade aos isolamentos de *A. candida* de origem homóloga (embora o recíproco nem sempre possa ser aplicável). Nas mesmas cultivares verificou-se que, para a maioria das plântulas observadas, a intensidade e o padrão de esporulação presentes dentro de cada classe fenotípica reveladora de compatibilidade eram análogos, independentemente de a infecção ter sido causada por um isolamento homólogo ou não. No entanto, em muitas outras cultivares onde se detectaram infecções cruzadas, nomeadamente na Couve de Valhascos (30) e na Couve de Corte (34), verificou-se que as interacções "planta - patógeno" para isolamentos não homólogos se enquadravam em classes fenotípicas reveladoras de menor susceptibilidade, ou nas mesmas classes fenotípicas, mas apresentando menor intensidade de esporulação assexuada, quando comparadas com as obtidas para isolamentos homólogos, o que está de acordo com o referido por Pound & Williams (1963), que admitem a hipótese de este facto ser explicado pela existência de reacções de compatibilidade apenas parciais entre raças fisiológicas de *A. candida* e hospedeiros não homólogos. Independentemente do padrão e da intensidade de esporulação obtidos, constata-se que as percentagens de infecção obtidas são notoriamente superiores nas combinações homólogas, qualquer que seja a cultivar de *B. oleracea* testada (cf. Quadro 4.3).

Segundo Pound & Williams (1963), os factores responsáveis pela resposta diferencial das espécies hospedeiras às raças fisiológicas de *A. candida*, apenas desempenham totalmente o seu papel com a maturação da planta (cf. § 2.5). Embora não fizesse parte dos objectivos deste estudo, constatou-se ainda que plantas de *B. oleracea* susceptíveis a infecções cruzadas na fase cotiledonar, quando inoculadas com os isolamentos para os quais haviam mostrado susceptibilidade, na fase de cinco a seis folhas definitivas, mantinham essa susceptibilidade inicial, pelo que, a verificar-se o anterior, deverá ocorrer numa fase mais avançada de maturação das plantas.

De entre os isolamentos não homólogos, o colhido em *R. sativus* (Ac 513, Portimão) revelou ser o menos patogénico em *B. oleracea*. A cultivar Cavolo "Verza San Giovanni" (3) mostrou ser-lhe a mais susceptível, com 20,7% de plantas infectadas, igualmente distribuídas pelas classes fenotípicas S1 e [S2+S3], revelando maior susceptibilidade a este isolamento do que aos restantes não homólogos. De entre as cultivares sujeitas a infecções cruzadas, a Kale "Giant Jersey" (4) foi a única a ser exclusivamente infectada por este isolamento.

Foram em maior número as cultivares susceptíveis aos isolamentos colhidos em *B. rapa* (cf. Quadro 4.3), sobressaindo a Couve repolho "Large Blood Red" (22) e a Couve Lombarda "Brusselse Winter" (39) pelos níveis médios de infecção atingidos (iguais ou superiores a 20,0 e 46,7%, respectivamente), e pelo facto de serem susceptíveis a todos os isolamentos de *B. rapa* testados [o mesmo aconteceu nas cultivares Kale "Chembere Dzagumhana" (2), Couve repolho L. B. Sel. Smit." (20), Couve de Valhascos (30) e na testemunha *B. oleracea* de ciclo curto CrGC 3.4 (40), mas com níveis de infecção mais baixos]. As cultivares Cavolo "Verza San Giovanni" (3) e "Kale" (7), mostraram ser susceptíveis a três dos quatro isolamentos de *B. rapa*

(Ac 508, Lourinhã; Ac 509, Costa de Caparica; e Ac 510, Póvoa do Varzim 1). No entanto, muitas das cultivares onde ocorreram infecções cruzadas só se mostraram susceptíveis a um ou dois dos isolamentos de *B. rapa* testados, em combinações variadas (cf. Quadro 4.3). Estes factos denotam variabilidade de resposta das cultivares aos isolamentos, e também a variabilidade dos próprios isolamentos, tendo-se verificando um aumento crescente da patogenicidade ao longo da sequência Ac 506 (Portimão) → Ac 509 (Costa de Caparica) → Ac 510 (Póvoa do Varzim1) → Ac 508 (Lourinhã), (cf. § 4.4.1.2).

Dos isolamentos de origem homóloga, o Ac 503 (Costa de Caparica) causou, em média, maiores níveis de infecção por cultivar e sintomatologia mais severa nas plantas infectadas, revelando-se como o mais patogénico dos três. Em termos de patogenicidade, os isolamentos Ac 501 (Esposende) e Ac 502 (Lourinhã) revelaram maior semelhança entre si, tal como havia sucedido em termos de caracterização sexual, verificando-se um aumento da patogenicidade dos isolamentos ao longo da sequência Ac 501 (Esposende) → Ac 502 (Lourinhã) → Ac 503 (Costa de Caparica). A maior semelhança verificada entre aqueles dois isolamentos poderá estar relacionada com o facto de ambos terem sido colhidos em couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), enquanto que o isolamento Ac 503 foi colhido em couve tronchuda (*B. oleracea* var. *costata*).

Foram as cultivares com algum nível de resistência a *A. candida* e/ou cultivares totalmente susceptíveis, mas com interacções fenotípicas reveladoras de susceptibilidade moderada (S1), que permitiram pôr em evidência esta diferença de comportamento entre os isolamentos de origem homóloga, uma vez que nas cultivares em que todas as interacções fenotípicas eram de elevada susceptibilidade ([S2+S3]), não foi detectado qualquer tipo de resposta diferencial aos isolamentos.

Embora a tendência geral seja haver uma grande susceptibilidade nas cultivares de *B. oleracea* aos isolamentos homólogos, há cultivares que se revelaram como potenciais fontes de genes de resistência a *A. candida* (cf. § 4.4.1.1), entre as quais se destacaram a Couve-flor "Romanesco Precoce" (11), a Couve Algarvia (33) e a Couve repolho Bacalã (24), entre outras, parecendo esta última bastante promissora como fonte de resistência ao patogénio, nas condições em que decorreu o presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N., 1988. *Plant pathology*. 3 rd edition. Academic Press Inc., London. 803 pp.
- ALEXOPOULOS, C.J. & MIMS, C.W., 1979. *Introductory mycology* 3 rd edition. John Wiley & Sons Inc., New York. 632 pp.
- ANÓNIMO, 1996. Agroenergética. *Revista de Ciências Agrárias*, **19** (2): 117 - 119.
- ARNALDO, L. S., 1985. *Contribuição para o conhecimento e estudo do vinho de pasto da região demarcada do Douro*. Relatório final de estágio. Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. pp 103 - 150.
- BAINS, S. S. & JHOOTY, J. S., 1979. Mixed infections by *Albugo candida* and *Peronospora parasitica* on *Brassica juncea* inflorescence and their control. *Indian Phytopathology*, **32**: 268 - 271. (cit. Lahiri & Bhowmik, 1993).
- BERLIN, J.D. & BOWEN, C.C., 1964. The host-parasite interface of *Albugo candida* on *Raphanus sativus*. *Am. J. Bot.*, **51**: 445 - 452.
- BERNIER, C.C., 1972. Diseases of rapeseed in Manitoba in 1971. *Can. Plant Dis. Surv.* **52** (3): 108.
- BIGA, M. L., 1955. Riesaminazione della specie del genero *Albugo* in base alla morfologia dei conidi. *Sidowia*, **9**: 339 - 358. (cit. Pound & Williams, 1963).
- BISHT, I. S. ; AGRAWAL, R. C. & SINGH, R., 1994. White rust (*Albugo candida*) severity on mustard (*Brassica juncea*) varieties and its effects on seed yields. *Plant Varieties and Seeds*, **7**: 85 - 89.
- BONNET, A., 1981. Resistance to white rust in radish (*Raphanus sativus* L.). *Cruciferae Newsletter*, **6**: 60 - 60.
- BRUZZESE, E. & HASAN, S., 1983. A whole leaf clearing and staining technique for host specificity studies of rust fungi. *Plant Pathology*, **32**: 335 - 338.
- CABRAL, J. M.; CARVALHO, A. H. & LIMA, M. B., 1977. Aplicação de métodos de taxonomia numérica na classificação de águas minerais de Portugal Continental. *Comunic. Serv. Geol. Port.*, **16**: 343 - 363.
- CATEN, C.E. & DAY, A.W., 1977. Diploidy in plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **15**: 295 - 318. (cit. Liu, 1992).
- CLAYTON, E.E., 1945. Resistance of tobacco to blue mold (*Peronospora tabacina*). *Journal of Agricultural Research*, **70**: 79 - 87. (cit. Dickinson & Crute, 1974).

- COFFEY, M. D., 1975. Ultrastructural features of the haustorial apparatus of the white blister fungus *Albugo candida*. *Can. J. Bot.*, **53**: 1259-1346.
- CORTET, E. & PRIEUR, R., 1991. Le marché européen des choux. *In*: I Colóquio Nacional de Produção de Brássicas. Associação Portuguesa de Horticultura e Fruticultura, Lisboa. pp. 135 - 141.
- CRUZ, B. B.; SILVEIRA, A. P.; DEMATTE, M. P. & SILVEIRA, S. P., 1973. Comportamento de variedades de rabanete em relação à ferrugem branca. *O Biológico*, **39** (8): 203 - 205.
- DELWICHE, P. A. & WILLIAMS, P. H., 1977. Genetic studies in *Brassica nigra* (L.) Koch. *Cruciferae Newsletter*, **2** : 39.
- DICKINSON, C.H. & CRUTE, I.R., 1974. The influence of seedling age and development on the infection of lettuce by *Bremia lactucae* . *Ann. Appl. Biol.*, **76**: 49 -61.
- DICKSON, M. H. & PETZOLDT, R., 1993. Plant age and isolate source affect expression of downy mildew resistance in broccoli. *Hortscience*, **28** (7): 730 - 731.
- DIGBY, P. G. & KEMPTON, R. A., 1987. *Multivariate analysis of ecological communities*. Population and community biology series. Chapman and Hall Eds., London. 206 pp.
- EBERHARDT, A., 1904. Contribution a l'étude de *Cystopus candidus*. *Lev. Zentr. Bakt. Parasitenk* , **12**: 614 - 631.(cit. Raabe & Pound, 1952).
- EBRAHIMI, A.G; DELWICHE, P. A. & WILLIAMS, P. H., 1976. Resistance of *Brassica juncea* to *Peronospora parasitica* and *Albugo candida* race 2. *Proc. Am. Phytopathol. Soc.*, **3**: 273. (cit. Fan *et al.*, 1983).
- ERWIN, A.T., 1920. Control of downy mildew of lettuce. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, **17**, 161 - 168 (cit. Dickinson & Crute, 1974).
- FAN, Z.; RIMMER, S.R. & STEFANSSON, B.R., 1983. Inheritance of resistance to *Albugo candida* in rape (*B. napus* L.). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, **25** (5): 420 - 424.
- GARDÉ, A. & GARDÉ, N. 1981. *Culturas hortícolas*. 5ª edição. Coleção Técnica Agrária. Livraria Clássica Editora, Lisboa. 457 pp.
- HARLAN, J. R., 1977. Sources of genetic-defense. *Annals New York Academy of Sciences*, **287**: 345 - 356. (cit. Williams, 1989).
- HEATH, M. C., 1971. Haustorial sheath formation in cowpea leaves immune to rust infection. *Phytopathology*, **61**: 383 - 388.

- HILL, C.B.; CRUTE, I.R. ; SHERRIFF, C. & WILLIAMS, P.H., 1988. Specificity of *Albugo candida* and *Peronospora parasitica* pathotypes toward rapid-cycling crucifers. *Cruciferae Newsletter*, **13** : 112-113.
- HORST, R.K., 1990. *Westcott's plant disease handbook*. VNR, New York. 953 pp.
- KAYS, S. J. & DIAS, J. S., 1995. Common names of commercially cultivated vegetables of the world in 15 languages. *Economic Botany*, **49** (2): 115 - 152.
- KAYS, S. J. & DIAS, J. S., 1996. Cultivated vegetables of the world. Latin binomial common names in 15 languages, edible part, and method of preparation. Exon Press, Athens, Georgia. 170 pp.
- KHAN, S. R., 1977. Light and electron microscopic observation of sporangium formation in *Albugo candida* (*Peronosporales*; *Oomycetes*). *Can. J. Bot.*, **55**: 730 - 739.
- KOLTE, S. J., 1985. *Diseases of annual edible oilseed crops*. II. Rapeseed-mustard and Sesame diseases. CRC Press, Florida. 135 pp.
- KUMAR, V.; KAUSHIK, C. D.; SAHARAN, G. S. & GUPTA, P.P., 1986. Role of environment and cultivar interaction on the epidemiology of white rust of mustard. *Cruciferae Newsletter*, **11**: 108 - 109.
- LAHIRI, I. & BHOWMIK, T. P., 1993. Growth of white rust fungus *Albugo candida* in callus tissue of *Brassica juncea*. *Journal of General Microbiology*, **139**: 2875-2878.
- LAKRA, B. S. & SAHARAN., G. S., 1988. Factors affecting sporangial germination of *Albugo candida* causing white rust of mustard. *Indian Phytopath.*, **41**: 287. (cit. Lakra & Saharan, 1991).
- LAKRA, B. S. & SAHARAN, G. S., 1991. Influence of thermo-hydro and potencial evapotranspiration on white rust epidemic of mustard. *Cruciferae Newsletter*, **14/15**: 150 - 151.
- LEACH, L.D., 1931. Downy mildew of the beet caused by *Peronospora schachtii* Fuckel *Hilgardia*, **6** : 203 - 251. (cit. Dickinson & Crute, 1974).
- LEBART, L. & MORINEAU, A., 1985. *Système portable pour l'Analyse des données*. (SPAD). C.E.S.I.A., Paris.
- LECKIE, D.; ASTLEY, D; CRUTE, I; ELLIS, P.; PINK, D.; BOUKEMA, I; MONTEIRO, A. A. & DIAS, J.S., 1996. The location and exploitation of genes for pest and disease resistance in european gene bank collections of horticultural brassicas. *Acta Horticulturae*, **407**: 95 - 102.

- LEPIK, E., 1928. Differential staining of *Peronosporaceae*. *Phytopathology* , **18**: 869 - 874. (cit. Dickinson & Crute, 1974).
- LIU, Q., 1992. *A methodology for genetic studies with Albugo candida*. PhD Thesis, Univ. of Manitoba. Winnipeg, Manitoba, Canadá. 96 pp.
- LIU, Q. & RIMMER, S.R., 1988. Histology of primary infection of *Brassica* species by *Albugo candida* race 7. 7th Int. Rapeseed Conf., Saskatoon, Saskatchewan. pp. 1199 - 1203.
- LIU, Q. & RIMMER, S.R., 1990. Effects of host genotype, inoculum concentration, and incubation temperature on white rust development in oilseed rape. *Can. J. Plant Pathol.*, **12**: 389 - 392 .
- LIU, Q. & RIMMER, S.R., 1991. Inheritance of resistance in *Brassica napus* to an Ethiopian isolate of *Albugo candida* from *Brassica carinata*. *Can. J. Plant Pathol.*, **13** : 197-201.
- LIU, Q. & RIMMER, S.R. & SCARTH, R., 1989. Histopathology of compatibility and incompatibility between oilseed rape and *Albugo candida*. *Plant Pathology*, **38**: 176 - 182.
- MENCE, M.J.& PEGG, G.F., 1971. The biology of *Peronospora viciae* on pea: factors affecting the susceptibility of plants to local infection and systemic colonization. *Annals of Applied Biology*, **67**: 297 - 308. (cit. Dickinson & Crute, 1974).
- MICHELMORE, R. W. & INGRAM, D. S., 1980. Heterothallism in *Bremia lactucae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **75**: 47 - 56.
- MICHELMORE, R. W. & INGRAM, D. S., 1982. Secondary homothallism in *Bremia lactucae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **78**: 1 - 9.
- MICHELMORE, R. W. & SANSOME, E. R., 1982. Cytological studies of heterothallism and secondary homothallism in *Bremia lactucae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **79**: 291 - 297.
- MONTEIRO, A. A. & WILLIAMS, P. H., 1989. The exploration of genetic resources of portuguese cabbage and kale for resistance to several *Brassica* diseases. *Euphytica*, **41**: 215 - 225.
- MORTIMER, A. M.; SHAW, D. S. & SANSOME, E. R., 1977. Genetical study of secondary homothallism in *Phytophthora drechsleri*. *Arch. Microbiol.*, **111**: 255 - 259. (cit. Liu, 1992).
- MUKERJI, K. G., 1975. *Albugo candida*. *CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria*. No 460. Commow. Mycol. Inst., Kew. (cit. Williams, 1985).

- PETERSON, C. E., 1975. Plant introductions in the improvement of vegetable cultivars. *Hortscience*, **10**: 575 - 579. (cit. Williams, 1989).
- PETRIE, G. A., 1973. Diseases of *Brassica* species in Saskatchewan, 1970-72. I. Staghead and aster yellows. *Can. Plant Dis. Surv.*, **53**: 19 - 25. (cit. Petrie *et al.*, 1985).
- PETRIE, G. A., 1975. Prevalence of oospores of *Albugo cruciferarum* in *Brassica* seeds samples from Western Canada, 1967-73. *Can. Plant Dis. Surv.*, **55**: 19 - 24.
- PETRIE, G. A., 1985 a. Yield losses in Saskatchewan rapeseed canola crops from basal stem cankers of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) in 1982, with notes on other diseases. *Can Plant Dis. Surv.*, **65** (2): 43 - 46.
- PETRIE, G. A., 1985b. Saskatchewan rapeseed/canola disease survey, 1983. *Can. Plant Dis. Surv.*, **65** (2): 47 - 49.
- PETRIE, G. A., 1986. *Albugo candida* on *Raphanus sativus* in Saskatchewan. *Can. Plant Dis. Surv.*, **66** (2): 43 - 46.
- PETRIE, G. A., 1988. Races of *Albugo candida* (white rust and staghead) on cultivated cruciferae in Saskatchewan. *Can. J. Plant Pathol.*, **10**: 142 - 150.
- PETRIE, G. A. & VERMA, P. R., 1974. A simple method for germinating oospores of *Albugo candida*. *Can. J. Plant Sci.*, **54**: 595 - 596. (cit. Liu, 1992).
- PETRIE, G. A.; MORTENSEN, K. & DUECK, J., 1985. Blackleg and other diseases of rapeseed in Saskatchewan, 1978 to 1981. *Can. Plant Dis. Surv.*, **65** (2): 35 - 41.
- PIDSKALNY, R.S. & RIMMER, S.R., 1985. Virulence of *Albugo candida* from turnip rape (*Brassica campestris*) and mustard (*Brassica juncea*) on various crucifers. *Can. J. Plant Pathol.*, **7** : 283- 286.
- PORTAS, C. & COSTA, P. C., 1977. Produção, comercialização e consumo hortícolas em Portugal Continental. I. Subsector das culturas hortícolas. *In*: I Colóquio Nacional de Horticultura e Floricultura, Associação Portuguesa de Horticultura e Fruticultura, Lisboa. pp. 9 - 30.
- POUND, G. S. & WILLIAMS, P. H., 1963. Biological races of *Albugo candida*. *Phytopathology* , **53** (10): 1146 - 1149.
- RAABE, R. D. & POUND, G. S., 1952. Relation of certain environmental factors to initiation and development of the white rust of spinach. *Phytopathology*, **42**: 448 - 452.
- ROHLF, F. J. & SOKAL, R. R., 1965. Coefficients of correlation and distance in numerical taxonomy. *Kans. Univ. Sci. Bull.*, **45**, 3 - 27. (cit. Cabral *et al.*, 1977).

- ROHLF, F. J. & KIRK, D., 1993. *Numerical taxonomy system of multivariate statistical programs (NTSYS)*. Applied Biostatistics, Inc.
- SANSOME, E., 1980. Reciprocal translocation heterozygosity in heterothallic species of *Phytophthora* and its significance. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **74**: 175 - 185.
- SANSOME, E. & SANSOME, F. W., 1974. Cytology and life history of *Peronospora parasitica* on *Capsella bursa-pastoris* and of *Albugo candida* on *C. bursa-pastoris* and on *Lunaria annua*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **62**: 323-332.
- SANTOS, M. P.; DIAS, J. S. & MONTEIRO, A. A., 1996. Avaliação de uma coleção de germoplasma para detecção de resistência cotiledonar ao *Albugo candida* (Pers.) Kuntze. 1ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia (Resumos alargados). pp.192 - 194.
- SAVAGE, E. J.; CLAYTON, C. W.; HUNTER, J. H; BRENNEMAN, J. A.; LAVIOLA, C. & GALLELY, M. E., 1968. Homothallism, heterothallism and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology.*, **58**: 1004 - 1021.
- SCHULTZ, H. & RÖDER, K., 1938. Die anfälligkeit verschiedener varietäten und sorten von salat (*Lactuca sativa* L. und *Lactuca scariola* L.) gegen den falschen meltau (*Bremia lactuca* Regel). *Züchter*, **10**: 185 - 194. (cit. Dickinson & Crute, 1974).
- SHAW, D. S., 1983. The cytogenetics and genetics of *Phytophthora*. pp. 81 - 94. In : Erwin, D. C.; Bartnicki - Garcia, S., Tsao, P.H. (Eds.). *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, Mn. (cit. Liu, 1992).
- SHAW, D. S., 1988. The *Phytophthora* species. pp. 27-51. In : Sidhus, G.; Ingram, D. S. & Williams, P. H. (Eds). *Advances in plant pathology*, vol. 6. Academic Press, London. (cit. Liu, 1992).
- SHEN, C. Y.; BOWER, L. A; ERWIN, D. C. & TSAO, P. H., 1983. Formation of sex organs in the A₁ mating type of *Phytophthora infestans* induced chemically by A₂ isolates of other species of *Phytophthora*. *Can. J. Bot.*, **61**: 1462 - 1466.
- SHERRIFF, C. & LUCAS, J. A., 1989a. Cytogenetic study of heterothallic and homothallic isolates of *Peronospora parasitica*. *Mycol. Res.*, **92**: 302 - 310.
- SHERRIF, C.& LUCAS, J., 1989b. Heterothallism and homothallism in *Peronospora parasitica*. *Mycol. Res.*, **92** (3): 311 - 316 .
- SHIPTON , W. A. & BROWN, J. F., 1962. A whole - leaf clearing and staining technique to demonstrate host - pathogen relationships of wheat stem rust. *Phytopathological notes*: p. 1313.

- SKIDMORE, D. I.; SHATTOCK, R. C. & SHAW, D. S., 1984. Oospores in cultures of *Phytophthora infestans* resulting from selfing by the presence of *P. drechsleri* isolated from blighted potato foliage. *Plant Pathol.*, **33**: 173 - 183.
- SMITH, I.M. ; DUNEZ, J. ; LELLIOT, R.A; PHILLIPS, D.H. & ARCHER, S.A., 1988. *European handbook of plant diseases*. Blackwell Scientific Publications., London. 583 pp.
- SNEATH, P. H. & SOKAL, R. R., 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. W. F. Freeman, San Francisco, 573 pp. (cit. Cabral *et al.*, 1977).
- TEWARI, J. P. & SKOROPAD, W. P., 1976. Relationship between epicuticular wax and blackspot caused by *Alternaria brassicae* in three lines of rape. *Can J. Plant Sci.*, **56**: 781 - 785 (cit. Fan *et al.*, 1983).
- U, N., 1935. Genome - analysis in *Brassica* with special reference to experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan. J. Bot.*, **7**: 389 - 452. (cit. Liu, 1992).
- VANTERPOOL, T.C., 1959. Oospore germination in *Albugo candida*. *Can J. Bot.*, **37**: 169 - 172.
- VERMA, P. R. & PETRIE, G. A., 1975. Germination of oospores of *Albugo candida*. *Can. J. Bot.*, **53**: 836-842. (cit. Liu, 1992).
- VERMA, P. R. & PETRIE, G. A., 1980. Effect of seed infestation and flower bud inoculation on systemic infection of turnip rape by *Albugo candida*. *Can. J. Plant Sci.*, **60**: 267 - 271.
- VERMA, P. R.; HARDING, H.; PETRIE, G. A. & WILLIAMS, P. H., 1975. Infection and temporal development of mycelium of *Albugo candida* in cotyledons of four *Brassica* species. *Can. J. Bot.*, **53**: 1016-1020.
- VERMA, P.P.; SPURR, D. T. & PETRIE, G. A., 1983. Influence of age and time of detachment on development of white rust in detached *Brassica campestris* leaves at different temperatures. *Can. J. Plant Pathol.*, **5**: 154 - 157.
- VERMA, U. & BHOWMIK, T. P., 1989. Inheritance of resistance to a *Brassica juncea* pathotype of *Albugo candida* in *B. napus*. *Can J. Plant Pathol.*, **11**: 443 - 444. (cit. Lahiri & Bhowmik, 1993).
- WILLIAMS, P. H., 1962. *Variability in the host-parasite relationships of Albugo candida (Pers.) Kuntze*. PhD Thesis, Univ. of Wisconsin, Madison, Wisconsin, EUA. (cit. Petrie, 1986).

- WILLIAMS, P. H., 1985. *Crucifer genetics cooperative resource book*. Dept. of Plant Pathology, Univ. of Wisconsin, Madison, Wisconsin, EUA. 124 pp.
- WILLIAMS, P. H., 1989. Screening for resistance to diseases. In Brown, A. H.; Frankel, O. H.; Marshall, D. R. & Williams, J. T. (Eds.). *The Use of Plant Genetic Resources*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 335 - 352.
- WILLIAMS, P. H. & POUND, G. S., 1963. The host-parasite interface of *Albugo candida* on *Raphanus sativus*. *Phytopathology* , **53** (10): 1150-1153.
- WILSON, A. R. & JARVIS, W. S., 1963. New or uncommon plant diseases and pests. *Plant Pathol.*, **12**: 91. (cit. Fan *et al.*, 1983).
- WOODS, D. L. & PETRIE, G. A., 1989. Scimitar brown mustard. *Can. J. Plant Sci.*, **69**: 247 - 249.

ANEXOS

Anexo IV.1 - Fenótipos de interação obtidos nas combinações homólogas *B. oleracea* - *A. candida*.

Cultivares/Variedades	ISOLAMENTO TESTADO											
	Ac 501				Ac 502				Ac 503			
	NN	(F)N+	S1	S2+	NN	(F)N+	S1	S2+	NN	(F)N+	S1	S2+
	+FN		+S3		+FN		+S3		+FN		+S3	
1-Borecole "Sel. Dammer"	0,0	0,0	7,1	92,9	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
2-Kale "Chembere Dzagumhana"	0,0	3,3	13,3	83,3	0,0	3,3	3,3	93,3	0,0	3,4	0,0	96,6
3-Cavolo "Verza San Giovanni"	0,0	6,7	0,0	93,3	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
4-Kale "Giant Jersey"	3,3	43,3	13,3	40,0	13,3	20,0	10,0	56,7	0,0	16,7	13,3	70,0
5-Kale "K 269"	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	10,3	89,7	0,0	0,0	0,0	100,0
6-Kale "Jersey"	13,8	24,1	20,7	41,4	10,3	10,3	17,2	62,1	0,0	17,2	20,7	62,1
7-Kale	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
8-Couve galega "Tocha Frisada"	0,0	13,3	23,3	63,3	3,3	10,0	13,3	73,3	0,0	13,3	23,3	63,3
9-Couve galega "Branca"	10,0	10,0	23,3	56,7	0,0	3,4	6,9	89,7	0,0	6,7	6,7	86,7
10-Kale ornamental "Red on Green"	0,0	3,4	0,0	96,6	0,0	0,0	3,3	96,7	0,0	0,0	0,0	100,0
11-Couve-flor "Romanesco Precoce"	7,4	33,3	33,3	25,9	26,7	10,0	13,3	50,0	0,0	30,0	23,3	46,7
12-Couve-flor "Romanesco Natalino"	6,7	13,3	10,0	70,0	3,3	6,7	3,3	86,7	0,0	0,0	3,3	96,7
13-Couve-flor "Romanesco Medio Precoce"	7,1	35,7	25,0	32,1	0,0	39,3	17,9	42,9	0,0	27,6	3,4	69,0
14-Couve-flor "Autumn Italian Pyramid Type"	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
15-Couve-flor "Winter Marzolo"	0,0	46,7	33,3	20,0	3,4	17,2	72,4	6,9	0,0	3,3	46,7	50,0
16-Couve-flor "Autumn Tasman"	0,0	0,0	10,0	90,0	0,0	0,0	3,3	96,7	0,0	0,0	0,0	100,0
17-Couve-flor "Romanesco"	6,7	20,0	30,0	43,3	3,3	23,3	30,0	43,3	0,0	30,0	16,7	53,3
18-Couve-flor "Modelet"	0,0	0,0	70,0	30,0	0,0	0,0	70,0	30,0	0,0	3,3	10,0	86,7
19-Couve roxa "L. B. Graag Group"	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
20-Couve repolho "L. B. Sel. Smit"	0,0	0,0	16,7	83,3	0,0	0,0	13,3	86,7	0,0	0,0	0,0	100,0

Anexo IV.1 (cont.) - Fenótipos de interacção obtidos nas combinações homólogas *B. oleracea* - *A. candida*.

Cultivares/Variedades	ISOLAMENTO TESTADO											
	Ac 501				Ac 502				Ac 503			
	NN	(F)N+	S1	S2+	NN	(F)N+	S1	S2+	NN	(F)N+	S1	S2+
	+FN		+S3		+FN		+S3		+FN		+S3	
21-Couve ornamental "Fiore Miscuglio"	0,0	0,0	3,3	96,7	0,0	0,0	3,3	96,7	0,0	0,0	0,0	100,0
22-Couve repolho "Large Blood Red"	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
23-Couve repolho "Bacalã"	0,0	33,3	26,7	40,0	0,0	37,9	10,3	51,7	0,0	37,9	6,9	55,2
24-Couve repolho "Bacalã"	26,7	43,3	6,7	23,3	6,9	41,4	17,2	34,5	0,0	58,6	3,4	37,9
25-Couve roxa "Ruby Ball"	0,0	0,0	3,3	96,7	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
26-Couve roxa "Kissendrup"	0,0	3,3	0,0	96,7	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
27-Penca de Mirandela	0,0	4,0	4,0	92,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	3,3	0,0	96,7
28-Penca de Chaves	0,0	6,7	3,3	90,0	0,0	3,3	6,7	90,0	0,0	0,0	0,0	100,0
29-Couve de Valhascos	0,0	0,0	35,7	64,3	0,0	0,0	43,3	56,7	0,0	0,0	16,7	83,3
30-Couve de Valhascos	0,0	0,0	8,0	92,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
31-Couve Glória de Portugal	7,1	25,0	14,3	53,6	3,6	32,1	7,1	57,1	0,0	42,3	3,8	53,8
32-Coivão	0,0	11,5	19,2	69,2	0,0	18,5	3,7	77,8	0,0	30,0	3,3	66,7
33-Couve Algarvia	13,0	34,8	8,7	43,5	10,3	31,0	20,7	37,9	0,0	33,3	6,7	60,0
34-Couve de Corte	0,0	4,0	12,0	84,0	0,0	0,0	10,7	89,3	0,0	3,3	6,7	90,0
35-Couve de Bruxelas "Gr. sel. v. Prooieim"	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	3,3	96,7	0,0	0,0	0,0	100,0
36-Couve de Bruxelas "Electra Group 1"	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
37-Couve de Bruxelas "de la Halle"	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
38-Marrowstem Kale "New Zealand" Medium"	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
39-Couve lombarda "Brusselse Winter"	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
40- <i>B. oleracea</i> CrGC 3.4 (testemunha)	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0

Anexo IV.2 - Fenótipos de interação obtidos nas combinações não homólogas *B. oleracea* - *A. candida*.

Cultivares/Varietades	ISOLAMENTO TESTADO																			
	Ac 506				Ac 508				Ac 509				Ac 510				Ac 513			
	NN	(F)N+	S ₁	S ₂₊	NN	(F)N+	S ₁	S ₂₊	NN	(F)N+	S ₁	S ₂₊	NN	(F)N+	S ₁	S ₂₊	NN	(F)N+	S ₁	S ₂₊
	+FN	+S ₃			+FN	+S ₃			+FN	+S ₃			+FN	+S ₃			+FN	+S ₃		
1-Borecole "Sel. Dammer"	3,6	96,4	0,0	0,0	0,0	86,2	0,0	13,8	0,0	96,6	0,0	3,4	21,4	78,6	0,0	0,0	31,0	69,0	0,0	0,0
2-Kale "Chembere Dzagumhana"	0,0	96,6	3,4	0,0	0,0	86,2	0,0	13,3	0,0	96,7	3,3	0,0	10,0	86,7	0,0	3,3	3,4	96,6	0,0	0,0
3-Cavolo "Verza San Giovanni"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	96,7	0,0	3,3	0,0	93,3	0,0	6,7	10,0	86,7	0,0	3,3	3,4	75,9	10,3	10,3
4-Kale "Giant Jersey"	3,3	96,7	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	23,3	76,7	0,0	0,0	0,0	96,7	0,0	3,3
5-Kale "K 269"	3,3	96,7	0,0	0,0	3,6	92,9	0,0	3,6	0,0	100,0	0,0	0,0	28,6	67,9	0,0	3,6	23,3	76,7	0,0	0,0
6-Kale "Jersey"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	20,7	79,3	0,0	0,0	7,1	92,9	0,0	0,0
7-Kale	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	96,7	0,0	3,3	0,0	86,2	3,4	10,3	0,0	75,0	10,7	14,3	0,0	92,9	7,1	0,0
8-Couve galega "Tocha Frisada"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	20,0	76,7	0,0	3,3	16,7	83,3	0,0	0,0
9-Couve galega "Branca"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	96,7	3,3	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	10,0	86,7	3,3	0,0	3,3	93,3	3,3	0,0
10-Kale ornamental "Red on Green"	20,0	80,0	0,0	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	3,3	96,7	0,0	0,0	60,7	39,3	0,0	0,0	24,1	75,9	0,0	0,0
11-Couve-flor "Romanesco Precoce"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	3,7	96,3	0,0	0,0	20,0	80,0	0,0	0,0
12-Couve-flor "Romanesco Natalino"	3,6	92,9	0,0	3,6	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	13,3	86,7	0,0	0,0	6,9	93,1	0,0	0,0
13-Couve-flor "Romanesco Medio Precoce"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	13,3	86,7	0,0	0,0	3,8	96,2	0,0	0,0
14-Couve-flor "Autumn Italian Pyramid Type"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	20,0	0,0	100,0	0,0	0,0	3,3	96,7	0,0	0,0	6,7	86,7	0,0	6,7
15-Couve-flor "Winter Marzolo"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	96,7	0,0	3,3	0,0	100,0	0,0	0,0	3,3	96,7	0,0	0,0	10,0	90,0	0,0	0,0
16-Couve-flor "Autumn Tasman"	0,0	96,7	0,0	3,3	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	6,7	93,3	0,0	0,0	0,0	96,7	0,0	3,3
17-Couve-flor "Romanesco"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	6,7	93,3	0,0	0,0	6,7	93,3	0,0	0,0
18-Couve-flor "Modelet"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	92,0	8,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	7,1	89,3	0,0	3,6	0,0	100,0	0,0	0,0
19-Couve roxa "L. B. Graag Group"	3,4	96,7	0,0	0,0	0,0	90,0	0,0	10,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	93,3	3,3	3,3	3,4	96,6	0,0	0,0
20-Couve repolho "L. B. Sel. Smit"	3,3	83,3	6,7	6,7	0,0	93,3	6,7	0,0	6,7	66,7	10,0	16,7	26,7	66,7	3,3	3,3	6,7	90,0	0,0	3,3

Anexo IV.2 (cont.) - Fenótipos de interação obtidos nas combinações não homólogas *B. oleracea* - *A. candida*.

Cultivares/Varietades	ISOLAMENTO TESTADO																			
	Ac 506				Ac 508				Ac 509				Ac 510				Ac 513			
	NN	(F)N+	S ₁	S ₂₊	NN	(F)N+	S ₁	S ₂₊	NN	(F)N+	S ₁	S ₂₊	NN	(F)N+	S ₁	S ₂₊	NN	(F)N+	S ₁	S ₂₊
	+FN		+S ₃		+FN		+S ₃		+FN		+S ₃		+FN		+S ₃		+FN		+S ₃	
21-Couve ornamental "Fiore Miscuglio"	3,3	96,7	0,0	0,0	0,0	96,7	0,0	3,3	0,0	100,0	0,0	0,0	23,3	76,7	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
22-Couve repolho "Large Blood Red"	0,0	80,0	13,3	6,7	0,0	60,0	6,7	33,3	0,0	80,0	10,0	10,0	10,0	60,0	3,3	26,7	0,0	93,3	0,0	6,7
23-Couve repolho "Bacalã"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	10,0	90,0	0,0	0,0	20,0	80,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
24-Couve repolho "Bacalã"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	96,6	0,0	3,4	0,0	100,0	0,0	0,0	26,7	73,3	0,0	0,0	6,7	93,3	0,0	0,0
25-Couve roxa "Ruby Ball"	3,3	96,7	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	96,7	3,3	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
26-Couve roxa "Kissendrup"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	96,7	0,0	3,3	0,0	100,0	0,0	0,0	6,7	90,0	0,0	3,3	0,0	100,0	0,0	0,0
27-Penca de Mirandela	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	96,7	3,3	0,0	17,9	78,6	3,6	0,0	3,3	93,3	0,0	3,3
28-Penca de Chaves	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	93,3	0,0	6,7	0,0	96,7	0,0	3,3	20,0	80,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
29-Couve de Valhascos	3,6	96,4	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	10,7	85,7	3,6	0,0	3,3	90,0	0,0	6,7
30-Couve de Valhascos	13,3	83,3	3,3	0,0	13,3	73,3	10,0	3,3	0,0	92,6	3,7	3,7	33,3	54,2	0,0	12,5	0,0	100,0	0,0	0,0
31-Couve Glória de Portugal	3,6	96,4	0,0	0,0	3,7	96,3	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	24,1	75,9	0,0	0,0	14,8	85,2	0,0	0,0
32-Coivão	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	96,3	0,0	3,7	0,0	100,0	0,0	0,0	20,0	80,0	0,0	0,0	3,4	96,6	0,0	0,0
33-Couve Algarvia	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	95,0	5,0	0,0	16,0	84,0	0,0	0,0	13,8	86,2	0,0	0,0
34-Couve de Corte	7,7	92,3	0,0	0,0	3,4	96,6	0,0	0,0	0,0	95,0	5,0	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	39,3	57,1	0,0	3,6
35-Couve de Bruxelas "Gr. sel. v. Prooiem"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	86,7	0,0	13,3	0,0	100,0	0,0	0,0	30,0	70,0	0,0	0,0	16,7	83,3	0,0	0,0
36-Couve de Bruxelas "Electra Group 1"	3,4	96,6	0,0	0,0	0,0	96,7	0,0	3,3	0,0	100,0	0,0	0,0	30,0	66,7	0,0	3,3	33,3	66,	0,0	0,0
37-Couve de Bruxelas "de la Halle"	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	90,0	3,3	6,7	0,0	100,0	0,0	0,0	20,7	72,4	3,4	3,4	3,3	96,7	0,0	0,0
38-Marrowstem Kale "New Zealand" Medium	0,0	96,7	0,0	3,3	0,0	93,3	0,0	6,7	0,0	100,0	0,0	0,0	6,7	93,3	0,0	0,0	6,7	93,3	0,0	0,0
39-Couve lombarda "Brusselse Winter"	16,7	36,7	23,3	23,3	0,0	50,0	10,0	40,0	0,0	50,0	23,3	26,7	10,0	33,3	13,3	43,3	6,7	90,0	0,0	3,3
40- <i>B. oleracea</i> CrGC 3.4 (testemunha)	13,3	83,3	3,3	0,0	0,0	86,7	0,0	13,3	0,0	88,9	0,0	11,1	36,7	43,3	3,3	16,7	43,3	56,7	0,0	0,0

Anexo IV.3 - Caracterização dos grupos formados por Classificação Automática para a globalidade das interações *A. candida* - *B. oleracea*.

	Interações incluídas	Critério¹	Probabi- lidade	Média no grupo	Média geral	Desvio-padrão no grupo	Desvio-padrão geral	Inércia intra-grupos	Distância²
Grupo 1	165							0,037939	0,3465
	NN	-5,039	0,000	0,021	0,045	0,036	0,089		
	[(F)N+FN]	15,395	0,000	0,942	0,595	0,085	0,415		
	S ₁	-5,907	0,000	0,011	0,042	0,026	0,099		
	[S ₂ +S ₃]	-13,165	0,000	0,027	0,318	0,063	0,407		
Grupo 2	91							0,031431	1,0301
	NN	-5,045	0,000	0,006	0,045	0,022	0,089		
	[(F)N+FN]	-14,887	0,000	0,046	0,595	0,101	0,415		
	[S ₂ +S ₃]	16,551	0,000	0,916	0,318	0,135	0,407		
Grupo 3	35							0,035503	1,6729
	NN	15,391	0,000	0,264	0,045	0,090	0,089		
	S ₁	-2,064	0,020	0,010	0,042	0,026	0,099		
	[S ₂ +S ₃]	-4,343	0,000	0,035	0,318	0,094	0,407		
Grupo 4	29							0,075061	1,8266
	[(F)N+FN]	-4,992	0,000	0,227	0,595	0,153	0,415		
	S ₁	14,307	0,000	0,292	0,042	0,162	0,099		

Inércia inter-grupos - 0,820066

¹ Quando é superior a 2, indica elevada probabilidade de a inclusão não ser devida ao acaso.

² Representa a distância euclidiana ao centro de gravidade do sistema.

Anexo IV.4 - Caracterização dos grupos formados por Classificação Automática para interacções homólogas *A. candida* - *B. oleracea*.

	Interacções incluídas	Critério ¹	Probabi- lidade	Média no grupo	Média geral	Desvio-padrão no grupo	Desvio-padrão geral	Inércia intra-grupos	Distância ²
Grupo 1	82							0,051915	0,2418
NN		-5,202	0,000	0,002	0,017	0,010	0,045		
[(F)N+FN]		-8,478	0,000	0,014	0,089	0,033	0,141		
S ₁		-7,123	0,000	0,029	0,092	0,048	0,142		
[S ₂ +S ₃]		9,936	0,000	0,954	0,801	0,072	0,246		
Grupo 2	23							0,082694	1,1738
[(F)N+FN]		8,871	0,000	0,325	0,089	0,104	0,141		
S ₁		2,804	0,003	0,167	0,092	0,099	0,142		
[S ₂ +S ₃]		-6,770	0,000	0,488	0,801	0,133	0,246		
Grupo 3	9							0,060116	2,8632
NN		9,261	0,000	0,153	0,017	0,062	0,045		
[(F)N+FN]		2,521	0,006	0,204	0,089	0,133	0,141		
[S ₂ +S ₃]		-4,020	0,000	0,483	0,801	0,123	0,246		
Grupo 4	6							0,024993	3,5061
S ₁		8,337	0,000	0,564	0,092	0,148	0,142		
S ₂ +S ₃		-4,122	0,000	0,396	0,801	0,194	0,242		

Inércia inter-grupos - 0,780282

¹ Quando é superior a 2, indicia elevada probabilidade de a inclusão não ser devida ao acaso.

² Representa a distância euclídiana ao centro de gravidade do sistema.

Anexo IV.5 - Caracterização dos grupos formados por Classificação Automática para interações não homólogas *A. candida* - *B. oleracea*

	Interações incluídas	Critério¹	Probabi- lidade	Média no grupo	Média geral	Desvio-padrão no grupo	Desvio-padrão geral	Inércia intra-grupos	Distância²
Grupo 1	153							0,130248	0,1157
	NN	-10,722	0,000	0,019	0,062	0,032	0,103		
	[(F)N+FN]	11,688	0,000	0,960	0,898	0,046	0,135		
	S ₁	-5,284	0,000	0,005	0,012	0,015	0,034		
	[S ₂ +S ₃]	-4,507	0,000	0,016	0,027	0,033	0,065		
Grupo 2	36							0,097045	1,2836
	NN	12,218	0,000	0,253	0,062	0,096	0,103		
	[(F)N+FN]	-8,533	0,000	0,724	0,898	0,109	0,135		
Grupo 3	11							0,110600	6,2281
	[(F)N+FN]	-7,357	0,000	0,607	0,898	0,159	0,135		
	S ₁	11,070	0,000	0,122	0,012	0,059	0,034		
	[S ₂ +S ₃]	10,557	0,000	0,228	0,027	0,119	0,065		

Inércia inter-grupos - 0,662106

¹ Quando é superior a 2, indica elevada probabilidade de a inclusão não ser devida ao acaso.

² Representa a distância euclidiana ao centro de gravidade do sistema.