COMPARAÇÃO PATOGENICA, CULTURAL, SEROLÓGICA E ELETROFORÉTICA
ENTRE ISOLADOS DE *Alternaria solani* DO TOMATE
E DA BATATA E VARIABILIDADE PATOGENICA DE
A. solani f.sp. *lycopersici* N.F.

MARIA ISABEL FANCELLI
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

F199c Fancelli, Maria Isabel
Comparação patogênica, cultural, serológica e eletrofo-
rética entre isolados de Alternaria solani do tomate e da
batata e variabilidade patogênica de A. solani F. sp
lycopersici N.F. Piracicaba, 1991.

80p. ilustr.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Batata - Doença 2. Fungo fitopatogênico - Patogenici-
dade 3. Pinta preta da batata - Patogenicidade 4. Pinta
preta do tomate - Patogenicidade 5. Tomate - Doença I. Es-
cola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 632.44

COMPARAÇÃO PATOGENICA, CULTURAL, SEROLÓGICA E ELETROFORÉTICA
ENTRE ISOLADOS DE *Alternaria solani* DO TOMATE
E DA BATATA E VARIABILIDADE PATOGENICA DE
A. solani f.sp. *lycopersici* N.F.

Maria Isabel Fancelli

Aprovada em: 11/03/1992

Comissão julgadora:

Dr.^o Raquel Ghini

EMBRAPA/CNPDA

Prof.^o Dr.^o Rosa Maria Gayoso Cardoso

IB/São Paulo

Prof. Dr. Ivan Bedendo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Tasso Leo Krüger

ESALQ/USP

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

ESALQ/USP

Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

Orientador

À Deus

pela força e inspiração.

Aos meus pais

RUBENS e ELIZABETH,

pela dedicação, apoio

e incentivo.

Ao JOÃO,

pela presença constante

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, por sua orientação e apoio durante o desenvolvimento da presente pesquisa;

À pesquisadora Erna E. Bach, pelo auxílio na realização dos trabalhos de eletroforese;

Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", que possibilitou a participação no Curso de Pós-Graduação e a realização deste trabalho;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pelos ensinamentos;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela colaboração;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo convívio e amizade;

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Características gerais de <i>A. solani</i>	03
2.2. Serologia aplicada ao estudo de fungos fitopatogênicos	08
2.3. Eletroforese aplicada ao estudo de fungos fitopatogênicos	10
3. MATERIAL E MÉTODO	13
3.1. Local e época de execução dos experimen- tos	13
3.2. Obtenção e conservação dos isolados	13
3.3. Desenvolvimento diametral médio de colô- nias e esporulação de isolados de <i>Alter- naria solani</i>	15
3.4. Desenvolvimento diametral médio de colô- nias de <i>Alternaria solani</i> em diferentes temperaturas	16
3.5. Esporulação de isolados de <i>A. solani</i> do tomateiro	17
3.6. Hidrólise de amido	18
3.7. Teste de eficiência <i>in vitro</i> de fungi- cidas para isolados de <i>A. solani</i> do toma- te e da batata	19

3.8. Frequência de aparecimento de setores em isolados de <i>A. solani</i> , a partir de discos de micélio	20
3.9. Teste de patogenicidade de isolados de <i>A. solani</i> em plântulas de tomate variedade Ângela e CICA 8	21
3.10. Efeito da concentração de inóculo de <i>A. solani</i> na manifestação de sintomas em hastes de tomateiro	22
3.11. Efeito da idade da planta na manifestação de sintomas, em tomateiros inoculados com <i>A. solani</i>	24
3.12. Comportamento de variedades de tomateiro inoculadas com diferentes isolados de <i>A. solani</i> provenientes do tomateiro	24
3.13. Caracterização serológica de isolados de <i>Alternaria solani</i>	25
3.13.1. Preparo do antígeno imunizante ..	25
3.13.2. Obtenção dos antissoros	26
3.13.3. Preparo dos antígeno para reação em dupla difusão em gel de ágar ..	27
3.13.4. Reação serológica dos isolados de <i>Alternaria solani</i> pelo teste de dupla difusão em gel de ágar ..	27
3.14. Eletroforese	28
3.14.1. Crescimento dos isolados de <i>Alternaria solani</i> em meio líquido	28
3.14.2. Extração de proteínas dos isolados de <i>Alternaria solani</i> , <i>A. dauci</i> e <i>A. porri</i>	29
3.14.3. Determinação da concentração de proteínas nas amostras	30

3.14.4. Preparo do gel de poliacrilamida	31
3.14.5. Aplicação das amostras e corrida eletroforética	32
3.14.6. Coloração	32
3.14.7. Preservação dos géis	33
3.14.8. Análise do perfil eletroforético	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Desenvolvimento diametral médio de colô- e esporulação de isolados de <i>A. solani</i> ..	34
4.2. Desenvolvimento diametral médio de colô- nias de isolados de <i>Alternaria solani</i> em diferentes temperaturas	36
4.3. Esporulação de isolados de <i>A. solani</i> do tomateiro	37
4.4. Hidrólise de amido	37
4.5. Teste de eficiência in vitro de fungici- das, para isolados de <i>A. solani</i> do tomate e da batata	39
4.6. Frequência de aparecimento de setores em isolados de <i>A. solani</i> , a partir de discos de micélio	41
4.7. Teste de patogenicidade de isolados de <i>A.</i> <i>solani</i> em plântulas de tomate variedade Ângela e CICA 8	41
4.8. Efeito da concentração de inóculo de <i>A.</i> <i>solani</i> na manifestação de sintomas em hastes de tomateiro	43
4.9. Efeito da idade da planta na manifestação de sintomas, em tomateiros inoculados com <i>A. solani</i>	45

Página

4.10. Comportamento de variedades de tomateiro com diferentes isolados de <i>A. solani</i> provenientes do tomateiro	45
4.11. Caracterização serológica de isolados de <i>A. solani</i>	48
4.12. Eletroforese	50
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

COMPARAÇÃO PATOGENICA, CULTURAL, SEROLÓGICA E ELETROFORÉTICA
ENTRE ISOLADOS DE *Alternaria solani* DO TOMATE
E DA BATATA E VARIABILIDADE PATOGENICA DE
A. solani f.sp. *lycopersici* N.F.

Autora: Maria Isabel Fancelli

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Foram feitas comparações patogênicas, culturais, serológicas e eletroforéticas de *Alternaria solani* do tomate e da batata.

Testes de patogenicidade em tomate mostraram que somente isolados congêniais conseguem reproduzir os sintomas típicos da doença, pelo que se propõe a nomenclatura de *Alternaria solani* f.sp. *lycopersici*, para os isolados do tomate. Adicionalmente, estes isolados apresentaram, em relação aos da batata, menor capacidade de hidrolisar amido, maior frequência de setores resistentes aos fungicidas iprodione e polioxina, maior crescimento em meio de cultura, maior dificuldade de esporulação *in vitro* e diferenças serológicas e eletroforéticas.

Testes de patogenicidade de dez isolados de *A. solani* do tomate em doze variedades de tomateiro evidenciaram a ocorrência de raças patogênicas (agressivas e virulentas, *sensu* VAN DER PLANK, 1968) dentro de *A. solani* f. sp. *lycopersici*.

PATHOGENIC, CULTURAL, SEROLOGICAL, AND ELECTROPHORETIC
COMPARISONS AMONG TOMATO AND POTATO ISOLATES OF
Alternaria solani AND PATHOGENIC VARIABILITY
OF *A. solani* f.sp. *lycopersici* N.F.

Author: Maria Isabel Fancelli

Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

Pathogenic, cultural, serological and electrophoretic comparisons were made among tomato and potato isolates of *Alternaria solani*.

Pathogenicity tests on tomato plants showed that only congenial isolates induced typical disease symptoms, suggesting the existence of physiologic specialization and the nomenclature *A. solani* f.sp. *lycopersici*, for the tomato isolates.

In addition, the tomato isolates showed smaller capacity for starch hydrolysis, greater frequency of resistant sectors to iprodione and polyoxin fungicides, greater growth on culture medium, greater difficulty for sporulation in vitro and serological and eletrophoretic differences, in relation to the potato isolates.

Pathogenicity tests of 10 *A. solani* isolates from tomato on 12 varieties of tomato plants evidenced the occurrence of pathogenic races, in terms of aggressiveness and virulence (sensu VAN DER PLANK, 1968) within *A. solani* f.sp. *lycopersici*.

1. INTRODUÇÃO

Nas culturas do tomate e batata, a doença denominada pinta preta, provocada por *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout, é um dos principais problemas em épocas de temperatura e umidade elevadas, podendo acarretar perdas consideráveis na produção.

Devido aos vários fatores semelhantes entre a pinta preta que ocorre no tomate e a que aparece na batata, dentre os quais as condições climáticas e o estágio de desenvolvimento da planta que favorecem a ocorrência da doença, tipo de lesão e principalmente a morfologia dos esporos, o agente causal de ambas foi determinado como *A. solani*. No entanto, dúvidas a respeito desta identidade foram levantadas, por ROSENBAUM (1920), que observou algumas características que diferenciavam os isolados provenientes do tomate e da batata. Mas, este trabalho, assim como outros posteriores, relacionados com este assunto, não tiveram expressão suficiente para estimular outros pesquisadores a realizar trabalhos mais convincentes e desta forma, até nossos dias é

afirmado que o agente da pinta preta em tomate e batata é o mesmo fungo.

Em vista destas informações, o objetivo deste trabalho foi observar a variabilidade existente entre os isolados do tomate e da batata, através de parâmetros como o crescimento em meio de cultura, esporulação, hidrólise de amido, crescimento em meio com fungicidas, inoculações em tomate, serologia (teste de dupla-difusão) e eletroforese (esterase). Sendo também importante a variabilidade existente dentro dos isolados provenientes de cada cultura, neste trabalho foi estudada esta característica com os isolados do tomate, através de inoculações em diversas variedades de tomateiro, pois informações desta natureza são importantes para trabalhos de melhoramento que visam a resistência a esta doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características Gerais de *A. solani*

O agente causal da pinta preta foi observado pela primeira vez por ELLIS & MARTIN (1882), sobre folhas de batata, o qual foi denominado de *Macrosporium solani*. No entanto, várias sinonímias são registradas na literatura, entre elas: *Alternaria solani*, Sorauer, 1896; *Sporidesmium solani* var. *varians* Vanha, 1904, *Alternaria porri* (Ell.) Neerg. f. sp. *solani* (Ell. & Martin) Neerg., 1945 e *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko f. sp. *solani* (Ell. & Martin) Neerg., 1945 (WALKER, 1965).

WILTSHIRE (1933), em estudos básicos deste grupo de hifomicetos, concluiu que *Macrosporium* deveria ser suprimido como um nomen ambiguum em favor de *Alternaria*. Assim, a designação mais aceita atualmente é *Alternaria solani* (RICH, 1983).

Alternaria solani é um fungo imperfeito que possui conídios com 9 a 11 septos transversais e poucos sep-

tos longitudinais. Os conídios são geralmente individuais, mas podem ser catenulados, retos ou ligeiramente curvos, elipsóides afinando-se em direção ao ápice, formando um bico comprido, sinuoso, ocasionalmente ramificado com 2,5 a 5,0 μm de comprimento, marrons, com dimensões de 15 a 19 x 150 a 300 μm . Os conidióforos ocorrem isolados ou em pequenos grupos, com 6 a 10 μm de diâmetro e 100 μm de comprimento (ELLIS, 1971; HOOKER, 1981).

A umidade é um fator importante para o aparecimento da doença, podendo ser conferida pelas chuvas (GRATZ, 1930) ou orvalho (MOORE, 1941; GUTHRIE, 1958; ROTEM & REICHER, 1964). No entanto, em termos de sobrevivência, ROTEM (1968) cita que *A. solani* é extremamente resistente ao calor e à seca.

O aumento da suscetibilidade à infecção está geralmente associado ao aumento da idade das plantas (MOORE & THOMAS, 1943; DOUGLAS & PAVEK, 1972), variedades precoces ou plantios antecipados (REILING, 1930, BARRAT & RICHARDS, 1944). Geralmente o patógeno inicia seu ataque nas folhas mais velhas, com o aparecimento de pequenas manchas necróticas pardo escuras que evoluem formando lesões de 0,5 a 2 cm, de formato circular a ovalado, com os característicos anéis concêntricos, bordos definidos e ocasionalmente halos cloróticos. Além das folhas, pode haver aparecimento de sintomas em hastes, pecíolos, frutos (no caso de tomate) e raramente em tubérculos (no caso da batata). Embora haja uma tendência

de tecidos maduros serem mais afetados, em tomate, o ataque do patógeno pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (TOKESHI & CARVALHO, 1980; HOOKER, 1981).

Uma característica comum a todas as espécies do gênero *Alternaria*, também observada em *A. solani* é a baixa capacidade ou mesmo ausência de esporulação em meio de cultura. Um grande número de trabalhos indicam diferentes métodos de indução da esporulação, como a utilização de luz ultravioleta (McCALLAN & CHAN, 1944; CHARLTON, 1953); luz fluorescente (JOHNSON & HALPIN, 1954; LUKENS, 1960; SINGH, 1967; DOUGLAS, 1972; STEVENSON & PENNYPACKER, 1988), iluminação solar (RANDS, 1917; LUKENS, 1960; SINGH, 1967; RATH & PADHI, 1973; PRASAD & DUTT, 1974), ferimento do micélio (RANDS, 1917; McCALLAN & CHAN, 1944; LUKENS, 1960; LUDWIG et alii, 1962), adição de substâncias ao meio de cultura como o carbonato de cálcio (SHAHIN & SHEPARD, 1979), tiamina, extrato de levedura (RATH & PADHI, 1973), potássio, zinco (RODIGIN, 1979), peróxido de hidrogênio e ozônio (CHARLTON, 1953). No entanto, para o sucesso da esporulação, outros fatores devem ser analisados como a idade da cultura (JOHNSON & HALPIN, 1954; RATH & PADHI, 1973; PRASAD & DUTT, 1974) temperatura (KLAUS, 1940; McCALLAN & CHAN, 1944; JOHNSON & HALPIN, 1954; SINGH, 1967; VERMA, 1969; DOUGLAS, 1972; RATH & PADHI, 1973) e umidade relativa (KLAUS, 1940; McCALLAN & CHAN, 1944).

Isolados de *A. solani* diferem consideravelmente em características culturais, como a coloração do micélio, pigmentação do meio de cultura e a facilidade com que formam setores (BONDE, 1929; THOMAS, 1943; HENNING & ALEXANDER, 1959; DOROZHUKIN et alii, 1975).

Com relação à gama de hospedeiros, há citações na literatura que além de batata e tomate (STEVEN, 1925; PITTMAN, 1929; ELLIS, 1971; TOKESHI & CARVALHO, 1980; HOOKER, 1981; RICH, 1983; CAMARGO, 1984) *A. solani* afeta outras solanáceas como berinjela, pimentão e jiló (TOKESHI & CARVALHO, 1980; HOOKER, 1981; CAMARGO, 1984) e até outros gêneros como *Brassica* spp. (ELLIOTT, 1917; BOLLE, 1924; HOOKER, 1981) e várias outras espécies de plantas (NEERGAARD, 1945).

No entanto, ROSENBAUM (1920) questiona em seu trabalho a identidade de *A. solani* proveniente da batata e do tomate, criticando trabalhos anteriores, que considerava os patógenos de ambas as culturas idênticos. Em seus trabalhos, esse autor encontrou um tipo de sintomatologia que diferenciava os isolados de tomate daqueles da batata, dividindo-os assim, em espécies distintas. Outros pesquisadores (BROCK, 1950; TESCHNER, 1953; JONES & DARLING, 1953; DOROZHUKIN et alii, 1975; BÓVEDA, 1986) observaram que isolados de *A. solani* provenientes do tomate eram mais patogênicos a esta planta, o mesmo ocorrendo para isolados da batata, mas não chegaram a ser tão categóricos como Rosenbaum.

BONDE (1927, 1929), PITTMAN (1929), MUKHERJI (1961) e REMNEVA & IVANYUK (1968) observaram a existência de diferenças entre isolados de *A. solani* da batata, sendo denominadas como raças fisiológicas por BONDE (1929). Estas diferenças foram na coloração e aparência do micélio, produção de pigmentos em BDA, esporulação, crescimento micelial, tendência a produzir setores, lesões em folhas destacadas e tubérculos, entre outras características.

Da mesma maneira, para *A. solani* do tomate também foram observadas diferenças entre isolados, sendo inclusive designados como raças por alguns pesquisadores (WELLMAN, 1943; STALL, 1957; HENNING & ALEXANDER, 1959; KING, 1967; DOROZHKIN et alii, 1977).

Com relação aos testes de patogenicidade em tomate, ANDRUS et alii (1942) identificaram um alto nível de resistência à lesão do caule provocada por *A. solani* em várias cultivares de tomate, indicando que esta resistência estava correlacionada com resistência foliar. Da mesma forma, GARDNER (1990) observou que plantas que exibiam resistência foliar no campo mostravam constantemente resistência no caule, em inoculações em casa de vegetação, indicando que a resistência neste caso era controlada pelo mesmo gene ou genes estreitamente relacionados. No entanto, este fato não foi sempre adequado para outras fontes de resistência a *A. solani*, pois BARKSDALE & STONER (1973) observaram no material estudado que os genes para lesão no caule e resistência

foliar segregavam independentemente. GARDNER (1988) também observou este fato, pois nos materiais estudados ocorreu apenas resistência foliar. Quando resistência foliar e no caule estão estreitamente relacionados, testes em casa de vegetação para resistência à lesão no caule, são adequados para a identificação da resistência (GARDNER, 1990). Em casa de vegetação, a identificação da resistência em folhas, geralmente não é bem sucedida, pois os sintomas não são suficientemente diferentes para discriminar plantas suscetíveis daquelas moderadamente resistentes (BARKSDALE, 1969; NASH & GARDNER, 1988). Assim, estes níveis de resistência são discriminados de uma forma mais satisfatória no campo (BARKSDALE, 1971; BARKSDALE & STONER, 1973; BARKSDALE & STONER, 1977; MAIERO et alii, 1989).

2.2. Serologia aplicada ao Estudo de Fungos Fitopatogênicos

A utilização da serologia vêm se evidenciando como uma das técnicas mais úteis no estudo das relações filogenéticas de fungos fitopatogênicos (FIGUEIREDO et alii, 1977), pois várias espécies e raças não se distinguem facilmente somente através de suas morfologias. A alta especificidade das reações serológicas permite a detecção de diferenças entre moléculas complexas dos microrganismos estuda-

dos, fornecendo informações de grande utilidade para a classificação e identificação taxonômica (SHATOCK, 1955).

No caso do gênero *Alternaria* não existe nenhum estudo de natureza serológica, mas em diversos gêneros de fungos onde foi aplicada tal técnica, esta possibilitou, na maioria das vezes, uma melhor compreensão das relações entre as espécies pesquisadas.

MADHOSINGH (1964) comparou, serologicamente, três espécies do gênero *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. moniliforme* e *F. solani*, observando maior proximidade entre os dois primeiros, que diferiram significativamente de *F. solani*, concordando assim, com a taxonomia baseada em caracteres morfológicos.

Em outros trabalhos, relacionados com a distinção de espécies através de técnicas serológicas, AMOS & BURREL (1967) separaram e identificaram espécies morfológicamente semelhantes de *Ceratocystis*; TERANISH et alii (1973) diferenciaram espécies de *Verticillium* e GHINI (1984) observou diferenças serológicas entre espécies de *Botrytis*.

A serologia também tem se mostrado útil na distinção de formaes especiais, como são os casos de TEMPEL (1957) que diferenciou *F. oxysporum* f.sp. *lupini* de *F. oxysporum* f. sp. *pisi*; BUXTON et alii (1961) que caracterizaram *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *F. oxysporum* f. sp. *pisi* e KIMATI (1975) que demonstrou diferenças antigênicas entre

Colletotrichum graminicola da cana de açúcar (f. sp. *sacchari*), do milho (f. sp. *zeae*) e do sorgo (f. sp. *sorghii*).

Ainda a serologia pode ajudar na distinção de raças fisiológicas, como no caso das raças 1 e 2 de *F. oxysporum lycopersici* (MORTON & DUKES, 1966); raças de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (BUXTON et alii, 1961).

Apesar da reconhecida utilidade da serologia na identificação e classificação de microrganismos, poucos trabalhos foram realizados até o momento nesta linha de pesquisa. Um dos fatores limitantes, segundo FIGUEIREDO et alii (1977) é a inexistência de uma metodologia adequada que permita o conhecimento e a purificação dos fatores antigênicos específicos de cada organismo estudado.

2.3. Eletroforese aplicada ao Estudo de Fungos Fitopatogênicos

O uso da eletroforese na taxonomia de fungos fitopatogênicos recebeu maior atenção depois que CHANG et alii (1962) demonstraram a utilidade da eletroforese para a separação de proteínas de *Neurospora*.

Esta técnica é especialmente útil na distinção de espécies com pequenas diferenças morfológicas ou que não esporulam em meio de cultura (ALFENAS, 1991). Segundo

BONDE et alii (1984), a utilidade da eletroforese como critério importante na taxonomia é devido à aproximação da variação isoenzimática e genética. BOSLAND & WILLIAMS (1987) dizem que as isoenzimas são consistentes em cada indivíduo, não sendo afetadas por fatores ambientais, portanto capazes de demonstrar diferenças entre populações de indivíduos diferentes.

CLARE & ZENTMEYER (1966) observaram diferenças entre os padrões eletroforéticos de *Phytophthora cinnamomi*, *P. citrophthora* e *P. palmivora*, quando utilizada a atividade enzimática da peroxidase. No caso de *Cylindrocylidium*, ALFENAS (1991) observou que espécies morfologicamente distintas exibem índices mais elevados de similaridade para padrões de proteínas, em relação às isoesterases. GILL & POWELL (1968) observaram diferenças entre os padrões proteicos de *P. fragariae* e *P. cactorum*. BURDON & MARSHALL (1981) conseguiram diferenciar várias espécies e *formae speciales* de *Puccinia* através de diversas análises enzimáticas com a técnica eletroforética.

Para a identificação de raças e detecção de variabilidade de fungos fitopatogênicos, a análise de proteínas e isoenzimas tem se mostrado como uma técnica bastante promissora (ALFENAS, 1991).

GILL & POWELL (1968) não conseguiram diferenciar raças fisiológicas de *P. fragariae* utilizando a eletroforese. No entanto, JUNQUEIRA et alii (1987) e ALFENAS et

alii (1984), analisando os padrões enzimáticos de isolados de *Microcyclus ulei* e *Cryphonectria cubensis*, respectivamente, mostraram uma correlação com a virulência dos mesmos.

A integração da técnica eletroforética com outras técnicas para uma precisa identificação de espécies, foi sugerida por GILL & ZENTMEYER (1978). Desta maneira BOSLAND & WILLIAMS (1987), trabalhando com isolados de *Fusarium oxysporum*, determinaram diferenças através da caracterização enzimática, testes de patogenicidade e compatibilidade vegetativa, cujos resultados levaram à divisão desta espécie em três *formae speciales*.

No caso de *Alternaria*, não há nenhum relato na literatura quanto aos estudos eletroforéticos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Local e época de execução dos experimentos

Os experimentos do presente trabalho foram executados nos laboratórios e casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", no período de maio de 1990 a dezembro de 1991.

3.2. Obtenção e conservação dos isolados

Os isolamentos foram realizados a partir de materiais vegetais provenientes de diversos locais (Tabela 1), retirando-se esporos individuais das lesões e colocando-os em ágar-água (20g de ágar e 1000 ml de água) ou cortando-se pequenos pedaços de tecido da zona de transição entre a parte doente e sadia, desinfestando-os e colocando-os neste mesmo meio de cultura. Após quatro dias de incubação a 25°C, as colônias desenvolvidas foram repicadas para BDA

(água de infusão de 200g de batata, 20g de dextrose, 18 g de ágar e água destilada até completar 1000 ml).

Tabela 1. Isolados de *Alternaria solani* utilizados nos experimentos do presente trabalho.

Isolado	Hospedeiro	Procedência	Data do isolamento
T ₁	Tomate	Piracicaba	03/05/90
T ₂	Tomate	Sta. B. D'Oeste	09/05/90
T ₃	Tomate	Rafard	18/05/90
T ₄	Tomate	Rafard	18/05/90
T ₅	Tomate	Piedade	18/05/90
T ₆	Tomate	Piracicaba	24/07/90
T ₇	Tomate	Piracicaba	07/08/90
T ₈	Tomate	Tietê	02/08/90
T ₉	Tomate	Tietê	07/08/90
T ₁₀	Tomate	Tietê	07/08/90
T ₁₁	Tomate	Botucatu	09/10/90
T ₁₃	Tomate	Turvolândia	11/12/90
T ₁₄	Tomate	Turvolândia	11/12/90
T ₁₅	Tomate	Turvolândia	11/12/90
T ₁₉	Tomate	Atibaia	11/12/90
T ₂₀	Tomate	Atibaia	11/12/90
B ₁	Batata	Águas da Prata	16/05/90
B ₂	Batata	Rafard	18/05/90
B ₃	Batata	Itapetininga	06/06/90
B ₄	Batata	Bragança Paulista	22/06/90
B ₅	Batata	Bragança Paulista	22/06/90
B ₆	Batata	Monte Mor	01/06/90
B ₇	Batata	Piracicaba	01/09/90

Cont.

Tabela 1. Continuação

Isolado	Hospedeiro	Procedência	Data do isolamento
B ₈	Batata	Monte Mor	29/08/90
B ₉	Batata	Piracicaba	08/10/90
B ₁₀	Batata	Piracicaba	08/10/90
B ₁₁	Batata	Piracicaba	08/10/90
B ₁₃	Batata	Monte Mor	08/10/90
B ₁₄	Batata	Capão Bonito	11/12/90
B ₁₅	Batata	Capão Bonito	11/12/90
B ₁₆	Batata	Capão Bonito	11/12/90
B ₁₇	Batata	Capão Bonito	11/12/90

Após a identificação dos isolados, de acordo com as metodologias 3.3. e 3.5, estes foram conservados de acordo com o método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967).

3.3. Desenvolvimento diametral médio de colônias e esporulação de isolados de *Alternaria solani*

Este ensaio foi realizado com a finalidade de se observar diferenças no desenvolvimento das colônias de isolados de *Alternaria solani* do tomate (T₁, T₂, T₃ e T₅) e da batata (B₁, B₂, B₃ e B₄).

Discos de meio de cultura contendo micélio com 0,4 cm de diâmetro foram colocados no centro de placas de Petri contendo BDA e incubados a temperatura de 22°C sob luz constante. No quinto dia de incubação, para estimular a esporulação, as placas foram deixadas no escuro, mantendo-se a temperatura de 22°C. No dia seguinte, retornou-se à condição inicial.

A avaliação do crescimento médio foi realizada no quinto dia de incubação, tomando-se valores do diâmetro em dois sentidos perpendiculares.

A avaliação da esporulação foi efetuada no oitavo dia de incubação, contando-se, através de hemocítomero, o número de conídios que estavam contidos em uma suspensão formada pela adição de 10 ml de água destilada em cada cultura.

O delineamento experimental para o ensaio de crescimento micelial foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições.

3.4. Desenvolvimento diametral médio de colônias de isolados de *Alternaria solani* em diferentes temperaturas

Com a finalidade de verificar se ocorrem temperaturas ótimas distintas atuando no desenvolvimento de

colônias de *A. solani* do tomate (T₂, T₃ e T₅) e da batata (B₁, B₃ e B₅), foi realizada a incubação dos isolados, em temperaturas de 15°C, 20°C e 25°C.

O inóculo consistiu de discos de micélio de 0,4 cm de diâmetro, colocados no centro de placas de Petri contendo BDA.

As avaliações foram realizadas no 6º dia de incubação, medindo-se o crescimento diametral médio das colônias, em dois sentidos perpendiculares entre si.

O delineamento experimental foi fatorial 3x6, com 3 repetições.

3.5. Esporulação de isolados de *A. solani* do tomateiro

Para contornar a dificuldade com relação à esporulação dos isolados de *A. solani* do tomateiro, foram realizados tratamentos adicionais aos descritos no item 3.3.

Inóculos de 0,4 cm de diâmetro foram colocados no centro de placas de Petri contendo BDA. Os isolados utilizados foram T₁, T₂, T₃ e T₅, sendo submetidos durante um período de cinco dias a uma temperatura de 22°C e luz constante. No sexto dia, as placas permaneceram no escuro, mantendo-se a temperatura. No dia seguinte, a luz foi restabelecida e no nono dia de incubação foi realizado

ferimento no micélio, isto é, adicionou-se água destilada às colônias e com um pincel, retirou-se o micélio. Após este processo, as placas permaneceram na luz, mas sem a tampa, durante um dia. Dois dias após este tratamento, foi realizada a avaliação, adicionando-se água destilada a estas colônias, obtendo-se uma suspensão de esporos, quantificados através de um hemocitômetro.

3.6. Hidrólise de amido

Para verificar se os isolados de *A. solani* do tomate diferem dos isolados da batata quanto à hidrólise de amido, discos de meio de cultura contendo micélio de 0,4 cm dos isolados T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈, T₉, T₁₀, B₁, B₂, B₃, B₄ e B₆ foram cultivados em meio de cultura, com a seguinte constituição: amido solúvel 2g, extrato de levedura 5g, extrato de carne 5g, peptona 5g, ágar 15g e água 1000 ml.

No quarto dia de incubação das colônias, verteu-se uma solução de lugol na superfície do meio de cultura, para se verificar a ocorrência da hidrólise do amido. Segundo TUIE (1969), nas reações positivas aparece um halo descolorido ao redor das colônias e nas reações negativas, todo o meio de cultura se torna azulado.

Devido aos resultados quantitativos, foi realizada análise estatística com delineamento experimental inteiramente casualizado com 3 repetições.

3.7. Teste de eficiência in vitro de fungicidas para isolados de *A. solani* do tomate e da batata

Com a finalidade de se detectar diferenças no comportamento de isolados de *A. solani* do tomate e da batata, testando-se fungicidas já utilizados ou em fase de experimentação (Tabela 2), os isolados T₂, T₃, T₅, B₁, B₂, B₃ e B₄ foram incubados em 0, 1, 10 e 100 µg/ml do princípio ativo de cada produto.

Tabela 2. Fungicidas utilizados nos experimentos.

Nome técnico	Nome comercial	Formulação	Concentração do ingrediente ativo
Iprodione	Rovral	Pó-molhável	50%
Polioxina	Polyoxin AL	Pó-molhável	10%
Defenoconazole*	Score	Conc.emulsionável	25%
Tebuconazole*	Folicur	Conc.emulsionável	25%

* Produtos experimentais.

A técnica utilizada para preparação do meio de cultura com o fungicida consistiu em se dissolver quantidade adequada do produto em 100 ml de água destilada estéril. Desta suspensão estoque, foram feitas diluições em série, obtendo-se as concentrações desejadas, adicionando-se 1 ml de cada suspensão em 99 ml de meio de cultura (BDA), a uma temperatura de 45°C a 50°C.

O inóculo utilizado consistiu de um disco de meio de cultura contendo micélio, medindo 0,4 cm de diâmetro, obtido da periferia de colônia de cinco dias de idade, incubada a 22°C. O experimento contou com 3 repetições (placas) para cada tratamento.

A avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares entre si, no 7º dia após a colocação do inóculo nas placas. O crescimento do fungo foi avaliado em termos de porcentagem em relação à testemunha.

3.8. Frequência de aparecimento de setores em isolados de *A. solani*, a partir de discos de micélio

Neste teste, os isolados T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈, T₁₀, T₁₁, T₁₃, T₁₄, T₁₅, T₂₀, B₁, B₃, B₄, B₆, B₈, B₉, B₁₀, B₁₁, B₁₃, B₁₄, B₁₅, B₁₆ e B₁₇ foram incubados em BDA por cinco dias e logo a seguir, transferidos sob a forma de discos de meio de cultura com micélio para placas

de BDA contendo 500 $\mu\text{g/ml}$ de iprodione, 500 $\mu\text{g/ml}$ de polioxina e a mistura de ambos nesta mesma concentração.

A avaliação foi feita aos 7 e 10 dias, contando-se o número de discos de micélio que desenvolviam colônias. O ensaio contou com 10 repetições.

3.9. Teste de patogenicidade de isolados de *A. solani* em plântulas de tomate variedade Ângela e CICA 8

Os isolados T₁, T₂, T₃, T₅, T₆, B₁, B₂, B₃, B₄ e B₆ foram cultivados a 22°C sob luz constante até o quinto dia, quando foram transferidos para o escuro por um dia, restabelecendo-se a condição inicial nos dias posteriores. Os isolados de tomateiro sofreram o tratamento adicional descrito no item 3.5 para estimular a produção de esporos.

A suspensão de conídios foi obtida com a adição de água destilada sobre a colônia, removendo-se os conídios com o auxílio de um pincel. A suspensão foi calibrada em hemocitômetro, determinando-se a concentração de 10^4 conídios/ml.

As plantas de tomate, mantidas em casa de vegetação, cresceram em um substrato esterilizado constituído de uma mistura de esterco de curral, areia e solo argiloso na proporção de 1,5 : 1,0 : 3,0 respectivamente, contidos em copos plásticos de capacidade de 300 ml.

Quando as plantas atingiram aproximadamente 25 dias de idade, foram inoculadas, através da pulverização dos conídios, até o início do escorrimento. Em seguida, as plantas permaneceram em câmara úmida durante quarenta e oito horas.

A avaliação foi realizada quinze dias após a inoculação, observando-se a presença ou ausência de sintomas do tipo lesão, na haste de cada plântula.

O ensaio contou com 4 repetições (copos plásticos) com 3 plantas em cada recipiente.

3.10. Efeito da concentração de inóculo de *A solani* na manifestação de sintomas em hastes de tomateiro

Para se determinar diferenças entre isolados de *A. solani* do tomateiro e da batata, quanto à manifestação de sintomas em hastes de tomateiro, foi realizado este ensaio, empregando os isolados T₄, T₆, B₃ e B₄.

O inóculo foi obtido conforme metodologia descrita no item 3.5 e calibrados inicialmente a uma concentração de 10^4 esporos/ml e por meio de diluição, foram obtidas as concentrações de 10^3 , 10^2 e 10^1 esporos/ml. Estas suspensões foram pulverizadas em plântulas com aproximadamente 25 dias de idade, em condições idênticas às descritas no item 3.9.

O ensaio contou com 6 repetições, representadas por plantas individuais e a avaliação foi realizada determinando-se a quantidade média de lesões, de acordo com os tipos de sintomas presentes na haste, determinado por uma escala, cujas características são apresentadas na Figura 1.

Figura 1. Escala adotada para a avaliação das lesões na haste, provocadas por isolados de *Alternaria solani* em plantas de tomateiro, onde:
1 = lesões menores que 0,5 cm;
2 = lesões entre 0,5 e 3 cm;
3 = lesões maiores que 3 cm;
4 = lesões que envolvem a haste.

3.11. Efeito da idade da planta na manifestação de sintomas, em tomateiros inoculados com *A. solani*

Plantas de tomateiro com 50, 40, 30, 20 e 10 dias de idade foram inoculadas com os isolados T₃ e B₃, para verificar se ocorrem diferenças entre ambos, quando testados em relação à idade da planta.

As plantas foram cultivadas em vasos de capacidade de 2 l, contendo substrato esterilizado de composição idêntica ao descrito no item 3.9. Em cada vaso, cultivou-se três plantas e cada tratamento contou com três repetições (vasos).

A quantidade de inóculo utilizada foi 10⁹ conídios/ml e as condições de obtenção de esporos e inoculação foram semelhantes às descritas no item 3.9.

A avaliação foi realizada 15 dias após a inoculação, observando-se sintomas em hastes e folhas.

3.12. Comportamento de variedades de tomateiro inoculadas com diferentes isolados de *A. solani* provenientes do tomateiro

Neste ensaio, os isolados do tomateiro T₂, T₃, T₅, T₆, T₇, T₉, T₁₁, T₁₃, T₁₅ e T₂₀ foram inoculados nas variedades cereja Rubi AG-551, Roquesso AG-591, Tropic, Floradade, Principe Gigante AG-590, Santa Clara I-5300,

Barão Vermelho AG-561, Santa Cruz Kada AG-373, Angela Gigante I-5100, Santa Adélia, Agrocica 8 e Agrocica 16, com a finalidade de se detectar as diferenças existentes entre isolados, assim como entre variedades.

A obtenção de inóculo, plantas e inoculação foram de maneira semelhante ao descrito no item 3.9. O inóculo utilizado foi 10^2 conídios/ml.

O experimento foi delineado como fatorial 10×11 inteiramente ao acaso, com 3 repetições.

As avaliações foram realizadas 15 dias após a inoculação de acordo com os sintomas nas hastes.

A escala para a determinação de danos na haste foi apresentada no item 3.10.

3.13. Caracterização serológica de isolados de

Alternaria solani

3.13.1. Preparo do antígeno imunizante

Os isolados B2 e T5 foram cultivados conforme metodologia descrita no item 3.5. Os esporos obtidos sob tais condições, foram suspensos em solução salina tamponada (NaCl 8,5g; KH_2PO_4 , 0,38g, K_2HPO_4 , 1,21g em 1 l de água destilada) e foram lavados por filtração (Millipore).

Em seguida, metade da quantidade de esporos obtida de cada isolado foi colocada no congelador em um

recipiente, para facilitar o processo de maceração. Realizada esta etapa, os esporos macerados ou não, foram conservados no congelador em solução salina tamponada, em frascos de 5 ml.

3.13.2. Obtenção dos antissoros

Os antígenos dos isolados Bz e Ts, macerados e não macerados, foram injetados em quatro coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 2 kg de peso, para a obtenção do antissoro. Em adjuvante completo de Freund, adicionou-se 2,5 ml do antígeno para homogeneização, até a obtenção de uma emulsão. A emulsão (2 ml) foi injetada via hipodermal (11) e intramuscular (2), 2 vezes por semana. Antes da primeira imunização, foi feita uma sangria para a obtenção do soro normal, que serviu de controle.

Foram realizadas 5 sangrias, espaçadas de 10 dias, iniciando aos 25 dias após a primeira injeção. O soro foi obtido a partir de sangue coagulado, que permaneceu sob refrigeração por uma noite.

O plasma sanguíneo foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 10 minutos e guardados em frascos de vidros esterilizados de 5 ml, juntamente com a adição de 0,5 ml de azida de sódio a 1% e conservados em congelador.

3.13.3. Preparo dos antígenos para reação em dupla difusão em gel de ágar

Discos de micélio dos isolados B₂, B₃, B₄, B₆, B₇, B₁₇, T₂, T₄, T₅, T₆, T₇, T₉, T₁₃ e T₁₉ de *A. solani*, dois isolados de *A. porri*, provenientes do alho e da cebola e um isolado de *A. dauci* da cenoura, obtidos da periferia de colônias de 5 dias de idade, cultivados em BDA, foram colocados em meio líquido com a seguinte composição: sacarose, 10g; L-asparagina, 2g; extrato de levedura, 2g; KH₂PO₄, 1g; MgSO₄.7H₂O, 0,1g; ZnSO₄.7H₂O, 0,44 mg; FeCl₃.6H₂O, 0,48 mg; MnCl₂.H₂O, 0,36 mg, em 100 ml de água destilada e pH 5,3 (ALFENAS et alii, 1991). Após um período de oito dias de incubação a $\pm$ 25°C, os micélios desenvolvidos foram retirados do meio, lavados e submetidos a uma leve secagem. Logo a seguir, foram macerados e armazenados em congelador, em frascos de 5 ml. A esses macerados, foi adicionado 10% de azida de sódio a 1%, antes da armazenagem.

3.13.4. Reação serológica dos isolados de *Alternaria solani* pelo teste de dupla difusão em gel de ágar

Em lâminas de vidro foram colocados cinco ml de meio constituído de ágar DIFCO 1 g e solução salina tamponada 100 ml.

Posteriormente, foram feitos orifícios no gel, com o aparelho "Furagar" (LEITE & OLIVEIRA, 1975) de 0,25 cm de diâmetro e de distribuição hexagonal.

Depois de abertos com auxílio de uma bomba de vácuo, os orifícios foram preenchidos 2 vezes com antígenos, preparados de acordo com o item anterior, e antissoros dos isolados da batata ou do tomate.

As lâminas permaneceram no interior das placas de Petri e para assegurar umidade, chumaços pequenos de algodão embebidos em água, foram colocados no interior das placas mantidas a temperatura ambiente.

A avaliação do teste serológico foi feita 42 e 72 horas após o preparo da reação, observando-se as bandas de precipitação formadas.

3.14. Eletroforese

3.14.1. Crescimento dos isolados de *Alternaria solani* em meio líquido

Para efetuar a extração de proteínas e analisar o perfil eletroforético dos isolados T2, T3, T5, T6, T7, T14, B1, B2, B3, B4, B8 e B15 de *Alternaria solani*, um isolado de *A. dauci* e dois de *A. porri* provenientes da cebola e de alho, foi realizado o cultivo destes fungos em meio líquido com a seguinte composição: sacarose, 10g; L-

asparagina, 2g; extrato de levedura, 2g; KH_2PO_4 , 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,44 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,48 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,36 mg em 1000 ml de água destilada e pH 5,3 (ALFENAS et alii, 1991). Este meio foi distribuído numa quantidade de 30 ml, em erlenmeyers com capacidade de 125 ml. O inóculo para o cultivo dos fungos neste meio consistiu de discos de micélio de 5 mm de diâmetro, provenientes da periferia de colônias de 5 dias de idade crescidas em BDA. Para cada isolado foi utilizado 5 erlenmeyers, que foram incubados a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 8 dias.

Após este período, o micélio contido em cada frasco foi retirado separadamente e lavado com água destilada estéril, por filtração em funil Buchner e papel de filtro (Whatmann nº 1). Em seguida, os micélios foram secados a temperatura ambiente e pesados, obtendo-se o peso fresco do micélio. O peso seco do micélio foi obtido colocando-se vidros de penicilina a 80°C por 24 horas, tarando-os em seguida e colocando-se nestes mesmos vidros, uma certa quantidade de peso fresco dos micélios, que foram mantidos em estufa a 80°C , até a obtenção de peso constante.

3.14.2. Extração de proteínas dos isolados de

Alternaria solani, *A. dauci* e *A. porri*

50 mg de peso seco de micélio de todos os isolados testados, foram triturados em almofariz, em banho

de gelo, com 1 ml de tampão Tris-glicina 0,125 M, pH = 8,2 + 10% sacarose + 300 mg de polivinilpirrolidona (PVP). Após a trituração, as amostras foram mantidas a 4°C por um período de 4 horas, sendo depois filtradas em gaze. A parte filtrada constituiu-se de extrato proteico.

3.14.3. Determinação da concentração de proteínas nas amostras

Através do método de Lowry (LOWRY et alii, 1951) foi estimada a concentração de proteínas nos extratos.

Para realizar estas quantificações foi necessário preparar previamente vários reagentes. O reagente B₁ consistiu de 1% de sulfato de cobre pentahidratado em água destilada, o B₂ foi formado colocando-se tartarato de sódio a 2% em água destilada, o A consistiu de 2% de carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 N. A solução reagente C foi preparada misturando-se 0,5 ml de cada reagente B e 49 ml do reagente A.

Assim, o método consistiu em adicionar a cada 0,2 ml das amostras, 1 ml da solução reagente C, agitá-las e após 10 minutos adicionar 0,1 ml do reagente Folin Ciocalteu 2N (Geel-Ind Quim. São Paulo, SP) previamente diluído em água destilada (1:1, v/v). As amostras foram agitadas e após 30 minutos, foi realizada a determinação das respectivas absorbâncias no comprimento de onda de 500 nm, em espectrofotômetro ultravioleta. A concentração de proteínas

em cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de soro-albumina bovina por ml (Eq μg SAB/ml) (Sigma Chem. Co.) foi determinada utilizando-se curvas padrão de diferentes concentrações de SAB, variando de 500 a 1700 $\mu\text{g}/\text{ml}$, em função de suas respectivas absorbâncias a 500 nm.

3.14.4. Preparo do gel de poliacrilamida

Para a análise eletroforética dos isolados testados, foi utilizado o gel de poliacrilamida, que consiste numa reação de polimerização entre a Acrilamida (AA) e metileno-bis-acrilamida (BIS) na concentração de 5%.

Após a dissolução de AA e do BIS em tampão Tris-glicina 0,125 M, pH = 8,2, foi adicionado 0,1 ml de tetrametildiamina (TEMED) e 2,8 ml de persulfato de amônio na concentração de 2%. Tal mistura foi colocada imediatamente com o auxílio de uma seringa de 25 ml, entre 2 placas (19 x 19,5 cm) sendo uma de vidro e outra de polietileno, separadas entre si por intermédio de um espaçador de polietileno de 2 mm de espessura, contendo incluso um pente para 12 amostras. Após a polimerização completa do gel, o espaçador foi retirado e a placa de polietileno removida, ficando o gel na placa de vidro, que foi colocado em uma cuba de sistema horizontal, contendo tampão Tris-glicina 0,125 M, pH 8,2, fazendo-se uma conexão do gel com a solução, com papel de filtro Whatmann n° 3.

3.14.5. Aplicação das amostras e corrida eletroforética

Em cada cavidade do gel, formada pelo pente, foi aplicado 28 μ l do extrato contendo 50 μ g em equivalente de SAB. Imediatamente, foi realizada a corrida em aparelho horizontal marca Permatron, mantendo-se a corrente em 5 mA até o corante marcador sair da cavidade, passando depois para 10 mA até o final da corrida. O corante marcador utilizado foi o azul de bromofenol a 0,25% em tris-glicina pH 8,2 mais sacarose a 10%.

As corridas eletroforéticas foram realizadas a temperatura de 10°C. Para cada amostra foi repetida a corrida por três vezes.

3.14.6. Coloração

Após a corrida eletroforética, os géis foram retirados das placas e imersos imediatamente na solução corante da esterase, que consistiu na dissolução de 50 mg de "Fast red TR" em 100 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH = 6,5, e a adição de 2 ml de solução 1% de α -naftil acetato em 50% de acetona. O gel foi deixado nesta solução por uma hora e depois fixado com ácido acético a 7% (JVO & STOTAKY, 1973 modificado por BACH, 1989).

3.14.7. Preservação dos géis

Após a coloração, os géis foram imersos em solução de metanol, ácido acético e água na proporção de 50:75:100, contendo 10% de glicerina (v/v) durante uma hora. Duas folhas de papel celofane também foram colocadas nesta solução por alguns minutos.

Uma placa de vidro foi envolta por uma das folhas de papel celofane, dobrando-se as bordas laterais deste por baixo da placa, tendo-se o cuidado de não deixar bolhas de ar entre a placa e o papel. Em seguida, colocou-se o gel sobre o celofane na placa, e, com a outra folha, cobriu-se o gel retirando-se todas as bolhas de ar existentes, envolvendo-o na placa de acordo com o procedimento anterior, deixando-se secar a temperatura ambiente. Depois da secagem, retirou-se o gel da placa de vidro, recortando-se o excesso de papel celofane.

3.14.8. Análise do perfil eletroforético

Os perfis foram analisados com base no número, posição e intensidade das bandas e fotografados.

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento diametral médio das colônias e esporulação de isolados de *A. solani*

De um modo geral, pode-se dividir os isolados em 2 grupos: os do tomate que apresentaram maior desenvolvimento e os da batata, cuja capacidade de crescimento nas condições do ensaio foi menor do que os isolados do tomate. Mas, observa-se também que ocorre variabilidade entre os isolados do tomate e da batata, pois T₂ cresceu menos em relação aos outros isolados do tomate e B₄ apresentou maior desenvolvimento, em comparação com os outros isolados da batata. Os valores de crescimento entre estes dois isolados foram muito próximos, mas a diferença estatística ainda persistiu neste caso (Tabela 3).

Quanto à capacidade de esporulação, observa-se na Tabela 4 que os isolados do tomate não esporularam nas condições estabelecidas no ensaio. No entanto, os isolados da batata esporularam satisfatoriamente, diferindo assim dos isolados do tomate.

Tabela 3. Desenvolvimento diametral médio de colônias de *Alternaria solani*.

Isolado	Desenvolvimento diametral *	
T ₅	5.175	A
T ₄	5,125	A
T ₆	5,038	A
T ₂	4,560	B
B ₄	4,340	C
B ₂	4,038	D
B ₃	4,025	D
B ₁	3,925	D

* Médias tomadas aos 5 dias de incubação (em centímetros). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (DMS = 0,21 e CV = 2,79%).

Tabela 4. Esporulação de isolados de *Alternaria solani*.

Isolados	Produção média de esporos*/ placa em BDA
B ₂	7,1 x 10 ⁴
B ₁	6,2 x 10 ⁴
B ₄	5,3 x 10 ⁴
B ₃	4,9 x 10 ⁴
T ₃	0
T ₅	0
T ₂	0
T ₁	0

* Média de 4 repetições. Culturas com 8 dias de idade.

4.2. Desenvolvimento diametral médio de colônias de isolados de *Alternaria solani* em diferentes temperaturas

Na Tabela 5 observa-se que houve uma influência da temperatura no desenvolvimento de os todos isolados. Com a aumenta da temperatura, o crescimento também aumentou.

Com relação aos isolados, em todas as temperaturas foi observada a formação de 2 grupos: os isolados do tomate que tiveram um maior crescimento e os da batata, com desenvolvimento menor.

Tabela 5. Desenvolvimento diametral de isolados de *Alternaria solani* em diferentes temperaturas.

Isolados*	Desenvolvimento diametral *		
	15°C	20°C	25°C
T ₅	4,08 A a	5,71 A b	7,23 A b
T ₄	4,00 A a	5,55 AB a	7,43 A c
T ₂	3,85 A a	5,35 B b	7,28 A c
B ₄	3,01 B a	4,48 CD b	5,55 C c
B ₁	2,91 B a	4,63 C b	6,00 B c
B ₃	2,73 B a	4,16 D b	5,56 C c

* Médias tomadas aos 6 dias de incubação (em centímetros). Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula na coluna e minúscula na linha) não diferem ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (DMS entre isolados = 0,34, DMS entre temperaturas = 0,27, CV = 2,80%).

4.3. Esporulação de isolados de *A. solani* do tomateiro

Na Tabela 6 observa-se que a esporulação dos isolados de *A. solani* provenientes do tomateiro, é possibilitada através da realização de fermentos no micélio das colônias produzidas pelos isolados.

Tabela 6. Esporulação de isolados de *Alternaria solani* do tomate.

Isolados	Produção média de esporos/placa em BDA*	
	Sem fermento	Com fermento
T ₃	0	$5,15 \times 10^4$
T ₅	0	$3,20 \times 10^4$
T ₁	0	$3,16 \times 10^4$
T ₂	0	$2,45 \times 10^4$

* Média de 4 repetições. Culturas com 12 dias de idade.

4.4. Hidrólise de amido

Todos os isolados hidrolisaram o amido, mas houve uma diferença quantitativa, representada pelo halo formado no meio de cultura. Desta forma, observando-se a

Tabela 7, nota-se que os isolados da batata, que formaram um halo maior, diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, de todos os isolados do tomate, exceto o T₉, que não diferiu de B₁ e B₄, mas que também não diferiu dos outros isolados do tomate.

Tabela 7. Hidrólise de amido de isolados de *Alternaria solani*.

Isolados	Halo (cm)*
B ₆	1,40 A
B ₂	1,26 A
B ₃	1,23 A
B ₁	1,01 AB
B ₄	1,00 AB
T ₉	0,53 BC
T ₂	0,50 C
T ₁	0,48 C
T ₅	0,45 C
T ₆	0,28 C
T ₃	0,28 C
T ₈	0,26 C
T ₁₀	0,16 C
T ₁₄	0,11 C
T ₇	0,10 C

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (DMS = 0,48; C.V. = 16,69%).

4.5. Teste de eficiência in vitro de fungicidas, para isolados de *A. solani* do tomate e da batata

Com relação à eficiência dos fungicidas iprodione, polioxina, defenoconazole e tebuconazole na inibição do crescimento micelial in vitro, não foram observadas diferenças no comportamento de isolados de *A. solani*, de tal forma que distinguíssem isolados do tomate e da batata. Observando-se a Tabela 8, onde são apresentados os ED₅₀ e ED₉₀ destes produtos, nota-se que os valores foram semelhantes para todos os isolados e fungicidas, exceto polioxina que apresentou ED₅₀ maior em relação aos outros produtos e o isolado T₂ que diferiu dos demais pelo menor desenvolvimento neste fungicida. Já para os valores de ED₉₀ ocorreram maiores variações. Para o fungicida iprodione, os isolados T₂, B₁, B₃ e B₄ tiveram menor desenvolvimento, T₅ e B₂ tiveram um desenvolvimento intermediário e T₃ apresentou maior desenvolvimento. Para polioxina, os valores de T₃ e T₅ foram superiores aos valores obtidos para os demais isolados. Para o defenoconazole, T₃, T₅ e B₁ desenvolveram mais do que os outros isolados e para o tebuconazole, os valores obtidos para todos os isolados foram semelhantes, exceto para T₂, que apresentou menor crescimento.

Tabela 8 - ED₅₀ e ED₉₀ dos fungicidas testados para a inibição do crescimento micelial dos isolados de *Alternaria solani*.

Isolados	ED ₅₀ dos fungicidas (µg/ml)				ED ₉₀ dos fungicidas (µg/ml)			
	Iprodione	Polioxina	Defeno- conazole	Tebuco- nazole	Iprodione	Polioxina	Defeno- conazole	Tebuco- nazole
T ₂	<1	<1	<1	<1	1-10	10-100	10-100	1-10
T ₃	<1	1-10	<1	<1	>100	>100	>100	10-100
T ₅	<1	1-10	<1	<1	10-100	>100	>100	10-100
B ₁	<1	1-10	<1	<1	1-10	10-100	>100	10-100
B ₂	<1	1-10	<1	<1	10-100	10-100	10-100	10-100
B ₃	<1	1-10	<1	<1	1-10	10-100	10-100	10-100
B ₄	<1	1-10	<1	<1	1-10	10-100	10-100	10-100

* Avaliação das colônias aos 7 dias de incubação.

Os valores apresentados são baseados na porcentagem de crescimento em relação à testemunha.

4.6. Frequência de aparecimento de setores em isolados de *A. solani*, a partir de discos de micélio

Analisando-se a Tabela 9, observa-se que os isolados de *A. solani* provenientes da batata tem menor capacidade de produção de setores, em iprodione e polioxina, quando comparados com os isolados do tomate. Além disso, observa-se que o aparecimento de setores em polioxina ocorre em maior quantidade, à medida que é aumentado o período de incubação

4.7. Teste de patogenicidade de isolados de *A. solani* em plântulas de tomate variedade Ângela e CICA 8

Quando isolados de *A. solani* são inoculados em plântulas de tomate, é possível diferenciar os isolados provenientes da batata e do tomate, pois os primeiros não manifestam lesões nos caules dos tomateiros.

Os sintomas produzidos por estes isolados podem ser vistos na Figura 2.

Tabela 9. Aparecimento de setores, a partir de discos de micélio em 500 µg/ml de polioxina e iprodione, separadamente e juntos.

Isolados	Nº de setores aos 7 dias			Nº de setores aos 10 dias		
	I	P	I+P	I	P	I+P
B11	1	-	-	1	-	-
B17	2	-	-	3	-	-
B8	-	-	-	-	-	-
B1	2	-	-	2	-	-
B14	1	-	-	1	-	-
B19	-	-	-	-	-	-
B10	-	-	-	-	1	-
B16	-	-	-	-	1	-
B9	-	-	-	2	-	-
B3	1	-	-	1	3	-
B15	-	-	-	2	-	-
B4	2	-	-	2	-	-
B6	-	-	-	-	-	-
T8	2	2	-	3	10	-
T11	1	1	-	1	2	-
T15	3	1	-	4	9	-
T20	3	1	-	4	10	-
T7	3	-	-	4	9	-
T6	-	-	-	1	4	-
T4	3	-	-	4	3	-
T14	2	4	-	3	10	-
T3	2	4	-	5	10	-
T13	1	1	-	1	10	-
T10	3	4	-	5	10	-
T5	1	-	-	1	1	-
T2	2	3	-	2	8	-
T1	1	1	-	2	8	-

I = Iprodione

P = Polioxina

I + P = Iprodione + Polioxina

Figura 2. Hastes de tomateiro inoculadas com *A. solani* proveniente da batata (A) e do tomate (B), na concentração de 10^4 esporos/ml.

4.8. Efeito da concentração de inóculo de *A. solani* na manifestação de sintomas em hastes de tomateiro

Na Tabela 10, observa-se que apenas os isolados do tomateiro produziram sintomas em hastes. Além disso, ocorreram diferenças entre os isolados de tomateiro empregados, pois o T₃ provocou sintomas mesmo na concentração mais baixa empregada no ensaio, enquanto que T₆ começou a ser estatisticamente diferente dos isolados da batata, apenas na concentração de 10^3 esporos/ml. Assim, o T₃ foi mais patogênico que o T₆.

Tabela 10. Efeito da concentração de inóculo de isolados de *Alternaria solani*, na manifestação de sintomas em hastes de tomateiro.

Isolados	Índice de doença nas concentrações de inóculo*			
	10 ⁴ (x)	10 ³ (x)	10 ² (x)	10 ¹ (x)
T ₃	9,72 A a	7,78 A b	4,24 A c	2,56 A d
T ₆	5,11 B a	2,56 B b	0,41 B c	0,00 B c
B ₄	0,00 C a	0,00 C a	0,00 B a	0,00 B a
B ₃	0,00 C a	0,00 C a	0,00 B a	0,00 B a

* Médias seguidas pela mesma letra (maiúsculas entre isolados e minúsculas entre concentrações) não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (DMS = 0,58%; CV = 4,16%).

Para análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

4.9. Efeito da idade da planta na manifestação de sintomas, em tomateiros inoculados com *A. solani*

Uma das diferenças mais marcantes quando se inocula isolados de *A. solani* do tomate e da batata em plantas de tomate de diferentes idades, é a precocidade de aparecimento de sintomas, ocasionada pelo isolado do tomate. Tal fato não é observado para o isolado da batata, que é capaz apenas de produzir sintomas atípicos, como a ausência de lesões na haste e necroses pardo claras nas folhas, sem os característicos círculos concêntricos (Tabela 11).

4.10. Comportamento de variedades de tomateiro inoculadas com diferentes isolados de *A. solani* provenientes do tomateiro

Neste ensaio, a variedade cereja rubi AG-551 não apresentou sintomas nas hastes, sendo considerada resistente e não incluída nas análises estatísticas. Com relação às outras variedades (Tabela 12) de uma maneira geral, Roqueso AG-591 e Floradade foram as mais resistentes e CICA 8 a mais suscetível.

Tabela 11. Tipos de sintomas em plântulas com diferentes idades inoculadas com isolados de *Alternaria solani*.

Sintomas	Isolado T ₃					Isolado B ₃				
	Plantas com idade (dias)					Plantas com idade (dias)				
	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
Tombamento	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lesões na haste	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Pontos necróticos nas folhas	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Amarelecimento de folhas*	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Secamento de folhas*	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Lesões típicas nas folhas**	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Riscos superficiais na haste	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Lesões atípicas nas folhas***	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

* Folhas mais velhas: ** Lesões com círculos concêntricos pardo-escuros; *** Lesões necróticas pardo-claras. (+) Sintomas observados; (-) Sintomas não observados.

Tabela 12. Patogenicidade de isolados de *Alternaria solani*, em diferentes variedades de tomate, através de sintomas nas hastes.

Índice de doença nas variedades *										
Isolados	Roquesso AG-591	Tropic	Flora- dade	Pr. Gigante AG-590	St. Clara I-5300	Bar. Verm. AG-591	St. Cruz Kada AG-373	Ângela Gigante I-5100	Sta. Ade- lia	Cica 8 Cica 16
T ₃	1,41 A g	4,24 A e	2,94 A f	6,69 A b	3,28 B f	5,72 A c	4,92 A d	4,44 A de	5,94 A c	8,44 A a
T ₆	0,19 CDE d	1,05 CDE c	0,11 E d	2,33 C a	1,50 CD bc	2,03 D ab	2,02 C ab	2,05 CD ab	2,52 CD a	2,27 D a
T ₂	0,13 CDE b	0,28 F b	0,19 E b	0,25 F b	0,30 F b	0,47 F b	0,61 EF b	0,47 G b	1,49 F a	1,61 E a
T ₁₃	0,11 DE b	0,49 EF ab	0,64 E ab	0,61 F ab	0,47 EF ab	0,45 F ab	0,39 F ab	0,22 G ab	0,22 G ab	0,74 F ab
T ₅	0,66 BCD de	0,41 EF e	0,53 E de	1,94 CDE a	1,11 DE bcd	0,83 EF cde	1,16 DE bcd	1,13 EF bcd	1,39 F abc	1,61 E ab
T ₁₅	0,77 ABC d	1,61 C bc	1,69 BC bc	1,33 E cd	2,14 C b	1,30 E cd	0,89 EF d	0,77 FG d	2,00 DEF b	3,64 C a
T ₁₁	0,22 CDE g	0,89 DEF f	1,30 CD ef	2,06 CD bcd	1,00 DE f	2,72 C ab	1,77 CD cde	1,47 DE def	1,74 EF cde	2,28 D bc
T ₉	1,38 A f	1,47 CD f	0,69 DE g	4,72 B bc	4,36 A c	4,99 A abc	5,55 A a	2,81 B e	3,03 C de	5,08 B ab
T ₇	1,13 AB f	2,69 B cd	2,28 B de	1,61 DE f	1,25 DE f	2,77 C cd	2,69 B cd	1,67 DE ef	3,77 B b	5,08 B a
T ₂₀	0,00 E h	0,78 ED fg	0,72 DE g	1,42 DE ef	3,44 B a	2,64 CD bc	2,02 C cde	2,32 BC bcd	2,28 DE bcd	2,80 D ab

*Médias seguidas pela mesma letra (maíscula nas colunas e minúsculas nas linhas) não diferem ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (DMS entre variedades = 0,66; DMS entre isolados = 0,65; C.V. = 12,71%).

Os isolados de tomate testados apresentaram também variabilidade, sendo que de um modo geral, T₃, T₇ e T₁₀ foram os mais patogênicos; T₂ e T₁₃ os menos patogênicos e o restante com atuação intermediária entre estes isolados.

No entanto, o comportamento dos isolados e das variedades não foi constante, indicando a existência de resistência horizontal e vertical nos hospedeiros e virulência e agressividade nos patógenos.

4.11. Caracterização serológica de isolados de

A. solani

Para diferenciação dos isolados de tomate dos de batata, as melhores reações serológicas foram obtidas com os antissoros das 2a. e 3a. sangrias de isolados de *A. solani* de batata, com esporos não macerados e macerados, respectivamente e a 5a. sangria do isolado de tomate com esporos macerados. No entanto, estes antissoros tiveram um baixo título, demonstrando reações até a diluição 1/2. Com relação aos antígenos, as reações ocorreram até as diluições 1/2 para alguns isolados e para outros até 1/8. Porém, as reações mais nítidas ocorreram com antissoros e antígenos não diluídos.

As reações observadas foram esquematizadas nas Figuras 3 e 4.

Figura 3. Reações serológicas em dupla difusão em gel de agar, entre antígenos de *Alternaria solani* da batata (B₂, B₃, B₄, B₆, B₇ e B₁₇), do tomate (T₂, T₄, T₅, T₇, T₉, T₁₃, T₁₉), *A. porri* do alho (A), cebola (Ceb) e *A. dauci* (Cen), com antissoro de *A. solani* da batata (B).

Figura 4. Reações serológicas em dupla difusão em gel de agar entre antígenos de *Alternaria solani* do tomate (T₂, T₄, T₅, T₆, T₇, T₉ e T₁₃), da batata (B₃, B₆, B₂, B₄, B₁₇ e B₇), *A. porri* do alho (A), cebola (Ceb) e *A. dauci* (Cen), com antissoro de *A. solani* do tomate (T).

Na Figura 3 observa-se que as reações serológicas utilizando antissoro de *A. solani* da batata só foi possível com antígenos de isolados da batata e *A. porri* da cebola, mas a diferença entre estas duas espécies foi a formação de um esporão na linha de precipitação em isolados de *A. solani*.

Na Figura 4, utilizando-se antissoro de *A. solani* do tomate, todos os antígenos de tomate testados apresentaram reações idênticas, mas os isolados da batata tiveram reações diversas. Isolados de *A. porri* da cebola e *A. dauci* mostraram certos componentes antigênicos comuns com alguns isolados de *A. solani*.

Assim, o antissoro que diferenciou melhor os isolados de *A. solani* foi o da batata.

4.12. Eletroforese

Nas Figuras 5 e 6, observam-se os perfis eletroforéticos, envolvendo esterase, de isolados de *A. solani* do tomate e da batata, *A. dauci* e *A. porri* da cebola e do alho.

Para os isolados de *A. solani* do tomate nota-se a ocorrência de dois tipos diferentes de perfis. Os isolados T2, T6, T3 e T14 apresentaram 3 bandas com valores de Rm 0,55, 0,74 e 0,92. O isolado T5, além destes valores,

apresentou uma banda adicional de R_m 0,85. Para os isolados da batata foi observado dois tipos de perfis, que foram também diferentes dos perfis eletroforéticos dos isolados do tomate. Na Figura 6 observa-se que B₈, B₁, B₃ e B₁₅ difere de B₄ e B₂ (que não aparece na figura, mas apresenta perfil idêntico ao isolado B₄).

Os outros isolados envolvidos no estudo apresentaram perfis diferentes entre eles e entre os isolados de *A. solani*.

Figura 5. Perfis eletroforéticos de *Alternaria solani* do tomate (T2 a T7) e *A. dauci*, em gel de poliacrílamida corado para a visualização das enzimas da esterase.

Figura 6. Perfis eletroforéticos de *Alternaria porri* (Ceb e A) e *A. solani* (B4 a B15) em gel de poliacrilamida para a visualização das enzimas da esterase.

5. DISCUSSÃO

A classificação de espécies de *Alternaria*, mais especificamente *A. solani*, tem sido modificada por diversos pesquisadores, devido principalmente aos diferentes enfoques relacionados com os aspectos morfológicos, fisiológicos, culturais e patogênicos, resultando em diversas maneiras de classificar e agrupar as espécies do gênero. Assim, ELLIOTT (1917) agrupou espécies de *Alternaria* de acordo com a morfologia e tamanho dos esporos, colocando *A. solani* no mesmo grupo de *A. dauci* e *A. brassicae*. NEERGAARD (1945) classificou espécies de *Alternaria* de acordo com a morfologia, aspectos culturais e espectro de hospedeiros, conferindo à *A. solani* as nomenclaturas *A. porri* f.sp. *solani* ou *A. dauci* f.sp. *solani*. Esta última denominação, seguiu o trabalho de GROVES & SKOLKO (1944) que classificaram sete espécies de *Alternaria* (*A. tenuis*, *A. brassicae*, *A. dauci*, *A. linicola*, *A. raphani*, *A. oleraceae* e *A. radicina*), de acordo com a morfologia dos esporos, características culturais e espectro de hospedeiros.

JOLY (1964) classificou espécies de *Alternaria* em três grupos, de acordo com critérios fisiológicos como germinação de esporos, desenvolvimento *in vitro* e biologia dos isolados. ELLIS (1971) tomou como parâmetros para a classificação o nível de transição, mais ou menos abrupto, do corpo para o bico do esporo, comprimento do bico em relação ao corpo e espectro de hospedeiros.

Apesar da morfologia semelhante observada entre os isolados de *A. solani* que atacam as solanáceas em geral, verificada em todas as classificações citadas anteriormente, aparecem na literatura relatos que denotam certa especialização a nível de hospedeiro, principalmente no caso do tomate e batata, que são consideradas culturas importantes e estudadas no mundo todo. Estas citações se iniciaram em 1920, quando Rosembaum determinou que a pinta preta do tomate era causada por uma espécie diferente daquela que incitava a mesma doença na batata. Logo depois, BROCK (1950) realizando testes de inoculação com isolados de *A. solani* proveniente da batata, tomate e *Solanum nigrum*, observou variações de patogenicidade em tomate e batata. TESCHNER (1953), observou em testes de inoculação em batata, que os isolados provenientes desta cultura eram mais agressivos que os do tomate. JONES & DARLING (1953) também realizando inoculações em batata, observaram que os isolados desta cultura eram altamente patogênicos e que necessariamente não atacavam tomate com igual severidade. DOROZHKIN

et alii (1975) verificaram que existem isolados que atacam batata e aqueles que são específicos para tomate. BÓVEDA (1986) inoculando isolados de *A. solani* provenientes do tomateiro, berinjela, jiló, fumo e batata, em plantas de tomate, determinou que os isolados de tomate eram os mais patogênicos.

Os resultados do presente trabalho, mostrando que somente isolados de *A. solani* do tomate causam sintomas típicos da doença em tomate (Tabelas 10 e 11, Figura 2) estão de acordo com o grupo de pesquisadores mencionados anteriormente. Entretanto, na literatura fitopatológica existem aqueles que defendem a inespecificidade de *A. solani*, cujo espectro de hospedeiros se amplia, além de plantas solanáceas, as Brassicas (ELLIOTT, 1917; BOLLE, 1924) e até cenoura, cebola, alface e outras espécies (NEERGAARD, 1945).

Um dos motivos deste fato, ou seja, esta ampla gama de hospedeiros, está relacionado provavelmente às inoculações drásticas realizadas nestes trabalhos. YOUNG (1926) já apontava o problema das inoculações artificiais utilizadas para definir o espectro de hospedeiros. De um modo geral, estas condições foram anormais, como o crescimento de plantas em tubos, técnica utilizada por NEERGAARD (1945); doses muito elevadas de inóculo, seja pela não padronização ou utilização de micélio, devido à dificuldade de obtenção de esporos, observado no trabalho de ELLIOTT (1917). Este último caso é observado também em outras

pesquisas cujo assunto, embora não sendo especificamente este, nota-se as dificuldades encontradas na época para a obtenção e padronização de inóculo, detectado nos trabalhos de BONDE (1929) e HENNING & ALEXANDER (1959) entre outros. Além disso, YOUNG (1926) também advertia que plantas em câmara úmida eram fisiologicamente diferentes daquelas encontradas no campo, citando o exemplo de plantas de repolho, que permaneceram três dias em câmara úmida, e que logo após a remoção, era observado o murchamento e morte das mesmas. Estas plantas estavam em condições anormais de crescimento e não conseguiram suportar uma rápida perda de água. Assim, a própria câmara úmida já é um fator que confere estresse à planta, havendo uma alteração na transpiração, que pode estar correlacionada com a suscetibilidade. Quando ocorre as condições descritas, YOUNG (1926) observou que os fungos *Alternaria* e *Helminthosporium* infectam muitas plantas. Assim, os resultados de uma ampla gama de hospedeiros observado no passado para *A. solani* foi devido a estes erros metodológicos, pois para se observar diferenças entre isolados, formas mais brandas de inoculação, que se assemelham às condições naturais são indicadas para discriminar isolados. No entanto, no caso de *A. solani* do tomate e batata, mesmo nas condições mais elevadas de concentração de inóculo foi possível observar diferenças, devido aos sintomas produzidos por estes isolados, nas hastes do tomateiro. Em testes de concentração de inóculo foi observado

que as quantidades mais baixas de esporos de *A. solani* da batata não causam sintomas em plantas de tomate. Além disso, foi observado no teste de idade das plantas de tomate que mesmo utilizando uma concentração considerada alta, que estes isolados começam a afetar a planta bem mais tarde do que os isolados do tomate, além de causar sintomas atípicos.

Diante deste fato, a citação de WHEELER (1968) torna-se importante, ao afirmar que alguns fungos são capazes de parasitar um amplo espectro de plantas hospedeiras, enquanto outros são restritos a um único hospedeiro. Porém, entre estes dois extremos existem vários graus de especialização, uns se limitando a parasitar espécies vegetais intimamente relacionadas e outros sendo restritos a um único gênero ou família vegetal, ou seja entre fungos capazes de infectar um amplo espectro de plantas, há muitos que desenvolvem formas ou raças distintas, que são morfologicamente semelhantes, mas cada um restrito ao seu hospedeiro ou espectro de hospedeiros, como é o caso agora descrito para isolados de *A. solani* do tomate e da batata.

Assim, no atual estágio de conhecimento da taxonomia de fungos do gênero *Alternaria*, admitindo-se o ponto de vista fitopatológico de que espécies devem ser determinadas principalmente por características morfológicas (JOHNSON, 1968), e de que características fisiológicas como a patogenicidade devem ser representadas por formas especializadas, podemos admitir a criação de *formae specia-*

les em *A. solani*, pois BOMPEIX & COLENO (1984), definem este termo como a população de um patógeno especializada em parasitar uma espécie de hospedeiro.

Diante disso, pode-se sugerir a nomenclatura *A. solani* f.sp. *lycopersici* para isolados do tomate e *A. solani* f.sp. *solani* para os isolados da batata, em vista dos resultados diferentes em termos de patogenicidade.

Essa diferenciação patogênica entre isolados de *A. solani* do tomate e da batata foi acompanhada por diferenças culturais, serológicas e eletroforéticas, observadas no presente trabalho.

Quanto aos aspectos culturais, em relação ao crescimento micelial em meio de cultura (BDA), foi observado um comportamento constante dos dois grupos de isolados: em diversas temperaturas testadas, sempre os isolados do tomate apresentaram maior crescimento em relação aos isolados da batata (Tabelas 3 e 5). Na maior temperatura testada (25°C), ocorreu um maior desenvolvimento dos isolados. BONDE (1929), POUND (1951) e VERMA (1969) observaram que isolados de *A. solani* apresentaram crescimento ótimo em temperaturas que variam de 25°C a 28°C. Desta forma, as temperaturas ótimas para o crescimento dos isolados não diferem, mas geralmente os isolados do tomate apresentam um crescimento maior quando comparado com os isolados da batata. Em estudos semelhantes, EDGERTON (1915) diferenciou diversas espécies de *Colletotrichum* através da taxa de

crescimento em meio de cultura. Mais recentemente, IGARASHI (1984) e SMITH (1990) diferenciaram através deste mesmo parâmetro, os isolados de *C. acutatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides*.

A produção de esporos em meio de cultura por *A. solani* sempre foi considerada difícil (RANDS, 1917; Mc-CALLAN & CHAN, 1944; CHARLTON, 1953; JOHNSON & HALPIN, 1954; LUKENS, 1960; SINGH, 1967; DOUGLAS, 1972; RATH & PADHI, 1973; PRASAD & DUTT, 1974; SHAHIN & SHEPARD, 1979; RODIGIN, 1979; STEVENSON & PENNYPACKER, 1988). Várias técnicas foram desenvolvidas para facilitar a esporulação deste fungo e entre estas, a exposição à luz é um fator primordial em praticamente todos os métodos testados. Neste estudo, comparando-se isolados de *A. solani* do tomate e da batata, houve uma maior dificuldade para a obtenção de esporos para os isolados do tomate (Tabela 4). Vários pesquisadores (THOMAS, 1943; CHARLTON, 1953; RODIGIN, 1979) encontraram dificuldades para a obtenção de esporos, no caso de isolados de *A. solani* do tomate. No entanto, variabilidade quanto a este aspecto também pode ocorrer, pois THOMAS (1943) conseguiu encontrar um isolado do tomate que esporulava mais facilmente em relação a outros. No que se refere aos isolados da batata, DOUGLAS (1972) conseguiu facilmente esporulação a 25°C, sob luz contínua, o que vem confirmar os resultados do presente estudo, onde se observou que a indução luminosa é suficiente para a esporulação de isolados da batata, enquanto

que isolados de tomate necessitam de um tratamento adicional, que consiste no fermento do micélio (Tabela 6).

Um outro fator que diferenciou isolados de *A. solani* do tomate e da batata, foi a hidrólise de amido, um teste realizado comumente para a classificação de bactérias, mas pouco utilizado para a caracterização de fungos. Tal diferença, evidenciada pelo maior halo de hidrólise de amido dos isolados da batata (Tabela 7), pode estar relacionada com diferenças fisiológicas presentes nos isolados, que os dividem exatamente por atuarem em hospedeiros diferentes, interferindo de forma diversa nas relações patógeno-hospedeiro e conseqüentemente com o desenvolvimento da doença.

Com o objetivo de se verificar diferenças entre isolados, testando-se produtos químicos, foi observado uma das características mais comuns entre isolados de *A. solani*, que é a formação de setores. Esta característica foi observada com maior intensidade entre os isolados do tomate, quando discos de micélio foram incubados em polioxina e iprodione (Tabela 9). A causa do aparecimento destes setores, além de ser uma característica própria do fungo, está relacionada com a seletividade destes produtos, atuando em poucos processos metabólicos vitais e também, provavelmente, ao efeito fungistático dos mesmos, permitindo o aparecimento de núcleos mutantes ou a seleção de núcleos adaptados já existentes a estes fungicidas. Os outros dois

produtos testados, o defenoconazole e o tebuconazole, não induziram o aparecimento de setores. Isto se deve ao fato destes compostos pertencerem ao grupo de inibidores de biossíntese de esteróis, reconhecidamente difícil de induzir problemas de resistência (WAARD & FUCHS, 1982).

Com relação à inibição do crescimento micelial, induzida por estes fungicidas, existiram variações entre isolados, mas que não permitiram dividi-los em grupos distintos (Tabela 8).

A serologia, através do teste de dupla difusão em ágar, também permitiu a distinção dos isolados do tomate em relação aos da batata. Comparando-se os antígenos de diversos isolados com antissoro de *A. solani* da batata, foi observada uma completa especificidade aos antígenos homólogos, sendo possível diferenciar os isolados da batata e do tomate. No entanto, semelhanças antigênicas dos isolados de diferentes hospedeiros foram evidenciadas nos testes com antissoros de *A. solani* do tomate. De acordo com SEELIGER (1968), as reações serológicas com antígenos e antissoros fúngicos não são absolutamente específicas, sendo frequentes as reações cruzadas, especialmente entre as espécies de um gênero ou entre fungos relacionados, e além disso, o grau de especificidade serológica de um determinado antissoro depende da duração do processo de imunização, tornando-se possível demonstrar mais anticorpos que se sobrepõem quanto maior a duração do período de imunização.

Assim, tal fato deve ter ocorrido para os antissoros do tomate, pois só foi possível obter reações nítidas após 65 dias do início das inoculações. No entanto, os antissoros da batata apresentaram reações melhores, possivelmente devido à obtenção de soros aos 35 e 45 dias após a primeira inoculação. Assim, a especificidade demonstrada pelos antissoros da batata, possivelmente se deve ao menor período de imunização em relação aos antissoros do tomate.

A eletroforese, cada vez mais empregada na caracterização diagnóstica de espécies fúngicas, é segundo BURDON & ROELFS (1985), uma técnica rápida, relativamente independente e seletivamente neutra na identificação de variabilidade genética, em nível de população, tornando a análise de isoenzimas, uma ferramenta útil nos estudos de variabilidade genética de fungos fitopatogênicos.

No entanto, a maioria dos trabalhos de eletroforese se refere à distinção de espécies. Alguns relacionados com *formae speciales* são os de GILL & POWELL (1968), BURDON & MARSHALL (1981) e BOSLAND & WILLIAMS (1982).

GILL & ZENTMEYER (1978) sugerem que a técnica eletroforética seja integrada a outras técnicas. Assim, através de técnicas integradas (eletroforese, patogenicidade e compatibilidade vegetativa), BOSLAND & WILLIAMS (1987) conseguiram dividir o fungo *Fusarium oxysporum* em três *formae speciales*. Assim, a tendência da aplicação

deste método, principalmente no caso de estabelecer diferenças entre fungos, é a sua utilização juntamente com outras técnicas, para fornecer dados mais conclusivos sobre um determinado aspecto em estudo, semelhantemente ao realizado neste trabalho, que foi possível estabelecer diferenças entre isolados de *A. solani* não apenas em eletroforese (esterase), mas também em outros parâmetros já citados anteriormente.

Com relação à avaliação dos danos provocados pelo fungo, existem diversas metodologias que podem ser aplicadas, como o método McKinney (HORSFALL & HEUBERGER, 1942) que toma como base a área foliar atacada pelo fungo, folhas destacadas (LOCKE, 1948; WELLMAN, 1943) e sintomas no caule (ANDRUS, 1942), que foi o sistema adotado neste trabalho. GARDNER (1991) afirma que este é um bom parâmetro para se avaliar a resistência em casa de vegetação, mas uma ressalva é feita: deve ser aplicado com moderação no caso de trabalhos que visam melhoramento, pois nem sempre a resistência foliar está associada à resistência no caule. Como o melhoramento não foi a questão abordada no presente estudo e sim, apenas a avaliação de resistência em genótipos disponíveis no mercado, e também devido às afirmações de BARKSDALE (1969) e NASH & GARDNER (1988) de que níveis moderados de resistência e suscetibilidade são difíceis de discriminar em casa de vegetação, através de sintomas nas folhas, as avaliações relacionando os danos com lesões no caule, apre-

sentaram resultados satisfatórios para discriminar isolados e variedades.

Desta maneira, no presente trabalho, demonstrou-se também a variabilidade patogênica dos isolados de *A. solani* provenientes do tomate, inoculando-os em diversas variedades de tomateiro. Os resultados observados na Tabela 12 indicam a impossibilidade de ordenar os isolados conforme a patogenicidade, e as variedades de tomate conforme a resistência, independente de variedades e isolados, respectivamente. Tal fato evidencia a presença de virulência e resistência vertical, segundo VAN DER PLANK (1968). No entanto, a virulência e a resistência vertical observadas são do tipo incompleto (ROBINSON, 1971), pois as variações foram essencialmente quantitativas. Além disso, a resistência observada atua contra todos os isolados do patógeno, o que podemos determinar também a presença de resistência horizontal, segundo VAN DER PLANK (1968).

Admitindo-se que a resistência vertical incompleta é aquela que pode ser quebrada mais prontamente (ROBINSON, 1971), podemos considerá-la no presente trabalho representada pelos menores níveis de doença que os isolados são capazes de provocar em cada variedade, e o nível de resistência horizontal, representado pelo máximo de doença que cada variedade pode sofrer quando inoculada com os diferentes isolados do patógeno. Assim, considerando os índices máximos de doença, podemos classificar as variedades

CICA 8, Príncipe Gigante AG-590, Santa Adélia, Barão Vermelho AG-561, Santa Cruz Kada AG-373, CICA 16, Ângela Gigante I-5100, Tropic, Santa Clara I-5300, Floradade e Roqueso AG-591, em ordem crescente de resistência.

Da mesma forma para os isolados, admitindo o menor índice de doença como a agressividade e o maior índice de doença que cada isolado pode causar, como virulência, podemos classificar o isolado T₂₀ como o menos agressivo e T₇ e T₃ como os mais agressivos. Quanto à virulência, os que apresentaram maiores níveis foram os isolados T₃, T₉ e T₇.

A extrema variabilidade presente nos isolados estudados vem confirmar os resultados de WELLMAN, 1943; STALL, 1957; HENNING & ALEXANDER, 1959; KING, 1967 e DOROZHUKIN et alii, 1977, e determinar a existência de raças agressivas e virulentas em isolados de *A. solani* provenientes do tomate.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem distinguir dois grupos de isolados de *A. solani* (tomate e batata) através de diferenças culturais, serológicas e eletroforéticas. Com a realização dos testes de patogenicidade, pode-se observar a especificidade dos isolados do tomate em plantas de tomateiro. Assim, é sugerida a nomenclatura *A. solani* f.sp. *lycopersici* para os isolados do tomate.

Além disso, diferenças na patogenicidade de *A. solani* f.sp. *lycopersici* em diversas variedades de tomateiro, indicaram a existência de raças patogênicas, com níveis variados de agressividade e virulência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. Aplicações da eletroforese de proteínas e isoenzimas em fitopatologia. In: III Encontro sobre aplicação da eletroforese na agropecuária. Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 1991. p.14-29.
- ALFENAS, A.C.; JENG, R.; HUBBES, M. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, 62: 1756-62, 1984.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.D. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. SIF/UFV, Viçosa, 1991. 242p.
- AMOS, R.E. & BURRELL, R.G. Serological differentiation in *Ceratocystis*. *Phytopathology*, St. Paul, 57: 32-34, 1967.
- ANDRUS, C.F.; REYNARD, G.B.; JORGENSEN, H.; EADES, J. Collar rot resistance in tomatoes. *J. Agr. Res.*, Washington, 65: 339-46, 1942.
- BACH, E.E. Utilização da eletroforese no estudo de alterações enzimáticas na interação planta-patógeno. In: I Encontro sobre aplicações da eletroforese na agropecuária. Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 1989, p.1-4.

- BARKSDALE, T.H. Resistance of tomato seedlings to early blight. *Phytopathology*, St. Paul, 59: 443-6, 1969.
- BARKSDALE, T.H. Field evaluation for tomato early blight resistance. *Plant Dis. Repr.*, Washington, 5: 807-9, 1971.
- BARKSDALE, T.H. & STONER, A.K. Segregation for horizontal resistance to tomato early blight. *Plant Dis. Repr.*, Washington, 57: 964-5, 1973.
- BARKSDALE, T.H. & STONER, A.K. A study of the inheritance of tomato early blight resistance. *Plant Dis. Repr.*, Washington, 61: 63-5, 1977.
- BARRAT, R.W. & RICHARDS, M.C. Physiological maturity in relation to *Alternaria* blight in the tomato. *Phytopathology*, Lancaster, 34: 997, 1944 (Resumo).
- BOLLE, P.C. Die durch schwärzepilze (Phaeodictyae) erzeugten Pflanzenkrankheiten. *Meded. Phytopath. Lab. 'Willie Commelin Scholten'*, Baarn, 77 pag., 1924. Apud *Review of Applied Mycology*, Oxford, 4: 60-1, 1925.
- BOMPEIX, G. & COLENO, A. Problèmes de terminologie des subdivisions intraspécifiques des plantes hôtes et des agents pathogènes. In: *Variation et variabilité des agents phytopathogènes*, 26 ème colloque SFP, Avignon, 10-11 mai/1984. Ed. INRA Publ., 1984. p.45-52.
- BONDE, R. Variation of strains of *Alternaria solani* isolated from lesions on potato tubers. *Phytopathology*, Lancaster, 17: 56, 1927 (Resumo).

- BONDE, R. Physiological strains of *Alternaria solani*. *Phytopathology*, Lancaster, 19: 533-48, 1929.
- BONDE, M.R.; PETERSON, G.L.; DOWELER, W.M.; MAY, B. Isozyme analysis to differentiate species of *Peronospora* causing downy mildews of maize. *Phytopathology*, St. Paul, 74: 1278-83, 1984.
- BOSLAND, P. & WILLIAMS, P.H. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility and geographic origin. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 65: 2067-73, 1987.
- BÓVEDA, R.R.V. Morfologia, patogenicidade, esporulação e sensibilidade a fungicidas in vitro de *Alternaria solani* (Ell. e Mart.) Jones e Grout. e *Alternaria alternata* (Fr.) Keiller de Solanáceas. Piracicaba, 1986. 106p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BROCK, R.D. A search for resistance to defoliation by *Alternaria solani* in the genus *Lycopersicon*. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.*, 16(3): 90-4, 1950. Apud *The Review of Applied Mycology*, Oxford, 30: 292, 1951 (Resumo).
- BURDON, J.J. & MARSHALL, D.R. Isozyme variation between species and formal specialis of the genus *Puccinia*. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 59: 2628-34, 1981.
- BUXTON, E.W.; CULBRETH, W.; ESPOSITO, R.G. Serological separation of forms and physiologic races of pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, St. Paul, 51: 575, 1961 (Resumo).

- CAMARGO, L.S. Tomate. In: *As hortaliças e seu cultivo*. 2a. ed., Fundação Cargill, Campinas, 1984. p.338-77.
- CHANG, L.D. SRB, A.M.; STEWARD, F.C. Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora*. *Nature*, London, 193: 756-9, 1962.
- CHARLTON, K.M. The sporulation of *Alternaria solani* in culture. *Transaction of the British Mycological Society*, London, 36(4): 349-355, 1953.
- CLARE, B.G. & ZENTMEYER, G.A. Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phthophthora*. *Phytopathology*, St. Paul, 56: 1334-5, 1966.
- DOROZHKIN, N.A.; REMNEVA, Z.I.; IVANYUK, V.G. Cultural characteristics and aggressivity of isolates of *Macrosporium solani* Ell. & Mart. causal agent of *Macrosporium* disease of tomato. *Biologicheskije Nauki*, 18(7): 100-4, 1975. Apud *Review of Plant Pathology*, Surrey, 55(2): 163, 1976. (Resumo).
- DOROZHKIN, N.A.; REMNEVA, Z.I.; IVANYUK, V.G. Biological features of races of *Macrosporium solani*, the pathogen of macrosporiosis of tomato. *Biologiya*, USSR, 12(1): 58-61, 1977. Apud *Review of Plant Pathology*, Surrey, 57(3): 134, 1978 (Resumo).
- DOUGLAS, D.R. The effect of light and temperature on the sporulation of different isolates of *Alternaria solani*. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 50: 629-34, 1972.
- DOUGLAS, D.R. & PAVEK, J.J. Screening potatoes for field resistance to early blight. *American Potato Journal*, 49: 1-6, 1972.

- EDGERTON, C.W. Effect of temperature on *Glomerella*. *Phytopathology*, Lancaster, 5: 247-59, 1915.
- ELLIOTT, J.A. Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *American Journal of Botany*, Lancaster, 4(8): 439-76, 1917.
- ELLIS, J.B. & MARTIN, G.B. *Macrosporium solani* E. and M. *American Naturalist*, Lancaster, 16: 1003, 1882.
- ELLIS, M.B. *Dematiaceous hyphomycetes*. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.
- FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método Castellani para a conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, 33: 9-13, 1967.
- FIGUEIREDO, M.B.; ALBA, A.P.C.; OLIVEIRA, A.R. Sorologia aplicada ao estudo de fungos fitopatógenos. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 3(4): 233-59, 1977.
- GARDNER, R.G. Use of *Lycopersicon hirsutum* PI 126445 in breeding early blight-resistant tomatoes. *HortScience*, St. Joseph, 19: 208, 1988 (Resumo).
- GARDNER, R.G. Greenhouse disease screen facilitates breeding resistance to tomato early blight. *HortScience*, St. Joseph, 25(2): 222-3, 1990.
- GHINI, R. Caracterização morfológica, serológica e patogênica de espécies de *Botrytis* que ocorrem na cultura da cebola (*Allium cepa* L.). Piracicaba, 1984. 53p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- GILL, H.S. & POWELL, D. Polyacrilamide gel (disc) electrophoresis of physiologic races A-1 to A-8 of *Phytophthora fragariae*. *Phytopathology*, St. Paul, 58: 722-3, 1968.
- GILL, H.S. & ZENTMEYER, G.A. Identification of *Phytophthora* species by disc eletrophoresis. *Phytopathology*, St. Paul, 68: 163-7, 1978.
- GRATZ, L.O. Disease and climate as pertaining to the Florida and Maine potato sections. *Phytopathology*, Lancaster, 20: 267-88, 1930.
- GROVES, J.W. & SKOLKO, A.J. Notes on seed-borne fungi II - *Alternaria*. *Can. J. Res. Sect. C*, 22(5): 217-34, 1944. Apud *The Review of Applied Mycology*, Oxford, 26: 405, 1947.
- GUTHRIE, J.W. Early blight of potatoes in southeastern Idaho. *Plant Dis. Repr.*, Washington, 42: 246, 1958.
- HENNING, R.G. & ALEXANDER, L.J. Evidence of existence of physiologic races of *Alternaria solani*. *Plant Dis. Repr.*, Washington, 43(3): 298-308, 1959.
- HOOKE, W.J. Compendium of potato diseases, St. Paul, MN, APS, 1981. 125p.
- HORSFALL, J.G. & HEUBERGER, J.W. Measuring magnitude of a defoliation disease of tomatoes. *Phytopathology*, Lancaster, 32: 226-32, 1942.

- IGARASHI, S. Sensibilidade a fungicidas e caracterização morfológica, patogênica e serológica de *Colletotrichum* spp. do morando (*Fragaria* spp.). Piracicaba, 1984. 57p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- JOHNSON, T. Host specialization as a taxonomic criterion. In: The Fungi an advanced treatise, vol. 3, The fungal population. AINSWORTH, G.C. & SUSSMAN, A.S., eds. New York, Academic Press, 1968. cap. 21, p.543-56.
- JOHNSON, T.W. & HALPIN, J.E. Environmental effects of conidial variation in some Fungi Imperfecti. J. Elisha Mitchell Sci. Soc., 70(2): 314-26, 1954. Apud The Review of Applied Mycology, Oxford, 34: 803, 1955.
- JOLY, P. Le genre *Alternaria*. Recherches physiologiques, biologiques et systématiques. Paris, Paul Lechevalier, 1964. 85p. Apud Review of Plant Pathology, Surrey, 44: 269, 1965.
- JONES, E.D. & DARLING, H.M. Influence of nutrition, potato varieties and isolates of *Alternaria solani* upon disease development. Phytopathology, Lancaster, 43(9): 476-7, 1953 (Resumo).
- JUNQUEIRA, N.T.; ALFENAS, A.C.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIN, L.; GASPAROTTO, L. Variabilidade isoenzimática de isolados de *Microcyclus ulei* com diferentes níveis de virulência. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 12: 208-14, 1987.
- JVO, P.S. & STOTZKY, G. Electrophoretic analysis of isozymes from seeds of *Pinus abces* and *Pseudotsuga*. Can. J. Bot., Ottawa, 51: 2201-5, 1973.

- KIMATI, H. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wills. (sensu Arx, 1957). Piracicaba, 1975. 103p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- KING, S.B. Studies on hyphal morphogenesis, pathogenicity and toxin production of *Alternaria solani*. Diss. Abstr. Ohio, 27(11B): 3744, 1967. Apud The Review of Applied Mycology, London, 47: 239, 1968 (Resumo).
- KLAUS, H. Investigations on *Alternaria solani* Jones & Grout, with special reference to its pathogenicity in potato tubers as dependent upon external factors. Phytopath. Z., Berlin, 13(2): 126-95, 1940. Apud The Review of Applied Mycology, Oxford, 30: 417-8, 1941 (Resumo).
- LEITE, A.F. & OLIVEIRA, A.R. Furagar. Summa Phytopathologica. Piracicaba, 1: 143-6, 1975.
- LOCKE, S.B. A method for measuring resistance to defoliation diseases in tomato and other *Lycopersicon* species. Phytopathology, Lancaster, 38: 937-42, 1948.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., Baltimore, 193: 265-75, 1951.
- LUDWIG, R.A.; RICHARDSON, L.T.; UNWIN, C.H. A method for inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. Canad. Pl. Dis. Serv., 42(3): 149-50, 1962. Apud The Review of Applied Mycology, London, 42: 309, 1963 (Resumo).

- LUKENS, R.J. Conidial production from filter paper cultures of *Helminthosporium vagans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 50(11): 867-8, 1960.
- MADHOSINGH, C. A serological comprison of three *Fusarium* species. *Can. J. Bot.*, Ottawa, 12: 1143-6, 1964.
- MAIERO, M., NG, T.J.; BARKSDALE, T.H. Combining ability estimates for early blight resistance in tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, St. Joseph, 114: 118-21, 1989.
- MCCALLAN, S.E.A. & CHAN, S.Y. Inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. *Contr. Boyce Thompson Inst.*, New York, 13(7): 323-35, 1944. Apud *The Review of Applied Mycology*, Oxford, 24: 115, 1945. (Resumo).
- MOORE, W.D. Some factors affecting the infection of tomato seedlings by *Alternaria solani*. *Phytopathology*, Lancaster, 32: 399-403, 1941.
- MOORE, W.D. & THOMAS, H.R. Some cultural practices that influence the development of *Alternaria solani* on tomato seedlings. *Phytopathology*, Lancaster, 33: 1176-84, 1943.
- MORTON, D.J. & DUKES, P.D. Serological differentiation of race 1 from race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Plant Dis. Rep.*, Washington, 50: 444-5, 1966.
- MUKHERJI, S. Studies on changes in the pathogenicity of *A. solani*. *Phytopath. Z.*, Berlin, 41(4): 317-52, 1961. Apud *The Review of Applied Mycology*, London, 41: 247, 1962 (Resumo).

- NASH, A.F. & GARDNER, R.G. Tomato early blight resistance in a breeding line derived from *Lycopersicon hirsutum* PI 126445. *Plant Disease*, St. Paul, 72: 206-9, 1988.
- NEERGAARD, P. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. London, Oxford, University Press, 1945. Apud *The Review of Applied Mycology*, Oxford, 25: 579-83, 1946.
- PITTMAN, H.A. 'Early blight' or 'leaf spot' and the *Macrosporium* 'storage disease' of potatoes. *Journ. Dept. of Agric. Western Australia*, 6(4): 544-52, 1929. Apud *The Review of Applied Mycology*. Grã-Bretanha, 9: 335, 1930 (Resumo).
- POUND, G.S. Effect of air temperature on incidence and development of the early blight disease of tomato. *Phytopathology*, Lancaster, 41: 127-35, 1951.
- PRASAD, B. & DUTT, B.L. Inducing sporulation in *Alternaria solani*. II. Effect of light. *Mycopathologia & Mycologia Applicata*, Den Haag, 54(1): 47-54, 1974. Apud *Review of Plant Pathology*, Surrey, 54(3): 156, 1975 (Resumo).
- RANDS, R.D. The production of spores by *Alternaria solani* in pure culture. *Phytopathology*, Lancaster, 7: 316-7, 1917.
- RATH, G.C. & PADHI, N.N. Factors influencing the photo-induction of sporulation in *Alternaria solani*. *Journal of the Indian Botanical Society*, 52(1/2): 81-8, 1973. Apud *The Review of Plant Pathology*, Surrey, 54(4): 230, 1975 (Resumo).

- REILING, H. A study of the dry spot disease of the potato from the standpoint of selection. *Der Züchter*, 2(11): 317-23, 1930. Apud *Review of Plant Pathology*, Grã-Bretanha, 10: 202-3, 1931 (Resumo).
- REMNEVA, Z.I. & IVANYUK, V.G. Intraspecific heterogeneity of *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of potato. *Mikol. i Fitopatol.*, 2(3): 202-9, 1968. Apud *The Review of Applied Mycology*, London, 47: 640, 1968 (Resumo).
- RICH, A.E. Fungus Diseases. In: *Potato Diseases*. Academic Press, New York, 1983. p.27-91.
- ROBINSON, R.A. Vertical Resistance. *Rev. Pl. Path.*, 50 (5): 233-39, 1971.
- RODIGIN, V.M. Early leaf spot of tomato in the Kharkov region. *Mikologiya i Fitopatologiya*, 13(6): 494-6, 1979. Apud *Review of Plant Pathology*, Surrey, 59: 462, 1980 (Resumo).
- ROSENBAUM, J. Studies with *Macrosporium* from tomatoes. *Phytopathology*, Lancaster, 10: 9-21, 1920.
- ROTEM, J. Thermoxerophytic properties of *Alternaria porri* f.sp. *solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 58: 1284-7, 1968.
- ROTEM, J. & REICHERT, I. Dew - a principal moisture factor enabling early blight epidemics in a semiarid region of Israel. *Plant Dis. Rep.*, Washington, 48(3): 211-215, 1964.

- SEELIGER, H.P.R. Serology as an aid to taxonomy. In: The fungi, an advanced treatise, 3, The Fungal population. AINSWORTH, G.C. & SUSSMAN, A.S, eds., New York, Academic Press, 1968. cap. 23, p.597-624.
- SHAHIN, E.A. & SHEPARD, J.F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 618-20, 1979.
- SHATOCK, P.M.F. The use of serology in the classification of microorganisms. *Journal General Microbiology*. London, 12: 367-74, 1955.
- SINGH, B.M. Inducing sporulation in different strains of *Alternaria solani*. I. Effect of visible light. *Micopath. Mycol. Appl.*, Den Haag, 31(2): 144-50, 1967. Apud *The Review of Applied Mycology*, London, 46: 464, 1967 (Resumo).
- SMITH, B.J. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from Strawberry. *Plant Disease*, St. Paul, 74: 69-76, 1990.
- STALL, R.E. Cytological, cultural and pathological studies of *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Jones and Grout. in relation to heterocaryotic variation. *Diss. Abstr.*, 17(11): 2398, 1957. Apud *The Review of Applied Mycology*, Oxford, 37: 600, 1958 (Resumo).
- STEVEN, F.L. *Plant Disease Fungi*. The Mac Millan Company, New York, 1925. 469p.

- STEVENSON, R.F. & PENNYPACKER, S.P. Effect of radiation, temperature and moisture on conidial germination of *Alternaria solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 78(7): 926-30, 1988.
- TEMPEL, A. Serological studies on *Fusarium oxysporum* Sheldon emend Snyder et Hansen. *Nature*, London, 28: 1483, 1957.
- TERANISHI, J.; FIGUEIREDO, M.B.; CARDOSO, R.M.G.; NAMEKATA, T. The value of serological techniques for the differentiation between *Verticillium albo-atrum* Reik. & Berth. and *dahliae* Kleb. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 40 (1): 45-51, 1973.
- TESCHNER, G. Studies on *Alternaria solani*, the agent of hard rot of potato and fruit rot of tomato. *Phytopath. Z.*, Berlin, 21(2): 133-62, 1953. Apud *The Review of Applied Mycology*, Oxford, 33: 554-5, 1954 (Resumo).
- THOMAS, H.R. A nonchromogenic sporulating variant of *Alternaria solani*. *Phytopathology*, Lancaster, 33: 729-31, 1943.
- TOKESHI, H. & CARVALHO, P.L.T. Doenças do tomateiro. In: *Manual de Fitopatologia*, Ed. Agronômica Ceres Ltda., São Paulo, 1980. p.511-52.
- TUITE, J. *Plant Pathological Methods Fungi and Bacteria*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1969. 239p.
- VAN DER PLANK, J.E. *Disease resistance in plants*. New York, Academic Press, 1968. 206p.

- VERMA, V. Effect of temperature and hydrogen ion concentration on three pathogenic fungi. *Sydowia*, 23: 164-8, 1970. Apud *Review of Plant Pathology*, London, 50: 389, 1971 (Resumo).
- WAARD, M.A. & A. FUCHS. Resistance to ergosterol - biosynthesis inhibitors. II. Genetic and physiological aspects. In: DECKER, J. & S.G. GEORGOPOULOS (ed.). *Fungicide resistance in crop protection*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, 1982. p.87-100.
- WALKER, J.C. *Patologia Vegetal*. Tradução da 2a. edição americana. Barcelona, Omega, 1965. 818p.
- WELLMAN, F.L. A technique to compare virulence of isolates of *Alternaria solani* on tomato leaflets. *Phytopathology*, Lancaster, 33: 698-706, 1943.
- WHEELER, B.E.J. Fungal parasites of plants. In: AINSWORTH, G.C. & SUSSMAN, A.S., eds. *The Fungi an advanced treatise*. New York, Academic Press, Vol. III, p.179-210, 1968.
- WILTSHIRE, S.P. The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, London, 18: 135-60, 1933.
- YOUNG, P.A. Facultative parasitism and host ranges of fungi. *American Journal of Botany*, Lancaster, 13(8): 502-20, 1926.