

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani* em meio de cultura**

**Pablo Pulz**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola**

**Piracicaba**

**2007**

**Pablo Pulz**  
**Biólogo**

**Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani* em meio de cultura**

**Orientador:**  
**Prof. Dr. NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola**

**Piracicaba**  
**2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Pulz, Pablo

Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani* em meio de cultura / Pablo Pulz. - - Piracicaba, 2007.

68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.  
Bibliografia.

1. Esporulação 2. Fungos fitopatogênicos 3. Pinta-preta 4. Queima (doença de planta)  
5. Temperatura I. Título

CDD 632.4

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

Entrega teus caminhos nas mãos do Senhor,  
confia Nele e Ele tudo fará.

Salmo: 37:5

## **Agradecimentos**

À minha família, por todo apoio que me deram nesse momento da minha vida;

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior, pela orientação, dedicação, paciência e oportunidade;

À Reitora Dra. Miriam M. O. Levada e Pró-reitor Dr. José Antonio Mendes (UNIARARAS), por terem me dispensado todas as vezes que eu precisei;

Ao Prof. Dr. Antonio Simões Pião (UNESP - Rio Claro), por toda a ajuda e disposição;

Ao Prof. PhD. Francisco Benedito Teixeira Pessine (UNICAMP), pela disposição para realizar a determinação espectral das lâmpadas fluorescentes;

Ao Prof. PhD. Ivan Lautenschleguer e ao Prof. Dr. Armindo Antonio Alves (UNIARARAS) por toda conversa e ajuda em todos os momentos;

Aos colegas da UNIARARAS: Cléber, Keller; Raquel, Bibiana, Cristiano e Zani, pelo apoio, amizade e incentivo;

Aos colegas da ESALQ: Cassiara, Hugo, Gleiber, Sylvia, Luana, Nívea, Marizete e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho;

À Sakata Seed Sudamerica LTDA, por ceder os isolados para os experimentos;

À minha namorada Renata, por aceitar a minha ausência em muitos momentos de dedicação a esse trabalho;

Obrigado.

## RESUMO

### **Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *Alternaria solani* em meio de cultura**

*Alternaria dauci* e *A. solani* são duas espécies de fungos fitopatogênicos reconhecidamente difíceis de esporular em meio de cultura. Isto dificulta as inoculações artificiais e, conseqüentemente, prejudica o processo de seleção de genótipos de cenoura e tomate resistentes às doenças causadas por estes fungos. Este trabalho teve o objetivo de verificar a influência de alguns fatores, aplicados na incubação, sobre o crescimento micelial e esporulação das duas espécies fúngicas. Diferentes meios de cultura (BDA, aveia e V8), temperatura (15, 20, 25, 30 e 35 °C), comprimentos de onda da luz usada na incubação (amarela, azul, branca, NUV, verde e vermelha), tipos de estresse aplicado à colônia (raspagem, UV, irradiação de microondas e temperatura de 100 °C) e fotoperíodos (luz / escuro, respectivamente, de 24 h / 0 h, 22 h / 2 h, 17 h / 7 h, 12 h / 12 h, 7 h / 17 h, 2 h / 22 e 0 h / 24 h) foram testados. Após a determinação dos melhores fatores, o método desenvolvido neste trabalho foi comparado ao método tradicionalmente utilizado (BDA, 25 °C, 12 h luz branca / 12 h escuro e raspagem da colônia), utilizando diversos isolados de ambas as espécies. Os resultados indicaram o meio V8-ágar e a temperatura de 25 °C como os mais favoráveis ao crescimento e esporulação. Os diferentes comprimentos de onda utilizados tiveram influência marcante na esporulação, sendo o NUV o mais estimulante. Todos os tipos de estresse aplicados induziram esporulação, porém, a raspagem das colônias proporcionou os melhores resultados. O fotoperíodo 12 h luz NUV / 12 h escuro foi o que mais estimulou a esporulação. Observou-se que, de modo geral, períodos de escuro maiores que os períodos de luz aplicados após o estresse da colônia, favoreceram a esporulação. Dessa forma, o processo desenvolvido neste trabalho consistiu de incubação em meio V8-ágar, temperatura de 25 °C, raspagem da colônia e fotoperíodo de 12 h luz NUV / 12 h escuro. Este procedimento mostrou-se nitidamente superior ao tradicionalmente utilizado para crescimento e esporulação de ambas as espécies.

Palavras chave: *Alternaria*; Produção de inóculo; Meio de cultura; Luz; Temperatura; Estresse

## ABSTRACT

### **Growth and sporulation of *Alternaria dauci* e *Alternaria solani* in culture media**

*Alternaria dauci* and *A. solani* are two phytopathogenic fungus species known for difficult sporulation in culture media. This hampers artificial inoculations and, consequently, affects the selection process of carrot and tomato genotypes resistant to the diseases caused by these fungi. This study had the objective of verifying the influence of some factors applied during incubation on mycelia growth and sporulation of the two fungus species. Different culture media (BDA, oat and V8), temperature (15, 20, 25, 30 and 35 °C), light wavelengths during incubation (yellow, blue, white, NUV, green, and red), stress types applied to the colony (scratching, UV, microwave irradiation, and temperature of 100 °C) and photoperiods (light / dark, respectively, of 24 h / 0 h, 22 h / 2 h, 17 h / 7 h, 12 h / 12 h, 7 h / 17 h, 2 h / 22 h and 0 h / 24 h) were tested. Upon determination of the best factors, the method developed in this study was compared to the traditional procedure (BDA, 25 °C, 12 h white / 12 h dark light and scratching of the colony), with different isolates of both species. Results indicated the V8-agar media and a temperature of 25 °C as most favorable for growth and sporulation. The different wavelengths had a marked influence on sporulation and NUV was the most stimulating. All applied stress types induced sporulation, but best results were obtained with scratching of the colonies. The 12 h light / 12 h dark photoperiod stimulated sporulation most. In general, longer dark than light periods after the stress of the colony favored sporulation. The procedure developed in this study consisted of incubation in V8-agar media, a temperature of 25 °C, scratching of the colony and a 12 h light / 12 h dark photoperiod. This process is clearly superior to the traditional method for growth and sporulation of both species.

**Key Words:** *Alternaria*; Inoculum production; Culture media; Light; Temperature; Stress

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ANEXOS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 Revisão bibliográfica.....	13
2.2 Material e métodos.....	21
2.2.1 Obtenção dos isolados.....	21
2.2.2 Efeito do meio de cultura e da temperatura no crescimento micelial.....	23
2.2.3 Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação.....	24
2.2.4 Efeito de diferentes estresses da colônia na esporulação.....	25
2.2.4.1 Determinação do ponto de inativação micelial por radiação de microondas.....	26
2.2.4.2 Determinação do ponto de inativação micelial por temperatura de 100 °C.....	26
2.2.4.3 Determinação do ponto de inativação micelial por radiação UV.....	27
2.2.5 Efeito do fotoperíodo aplicado após o estresse da colônia na esporulação.....	27
2.2.6 Comparação entre o método tradicional e o desenvolvido neste estudo, para diferentes isolados de <i>Alternaria dauci</i> e <i>A. solani</i> .....	28
2.2.7 Tratamento estatístico.....	29
2.3 Resultados e discussão.....	30
2.3.1 Efeito do meio de cultura e da temperatura no crescimento micelial.....	30
2.3.2 Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação.....	33
2.3.3 Efeito de diferentes estresses da colônia na esporulação.....	39
2.3.4 Efeito do fotoperíodo aplicado após o estresse da colônia na esporulação.....	45
2.3.5 Comparação entre o método tradicional e o desenvolvido neste estudo, para diferentes isolados de <i>Alternaria dauci</i> e <i>A. solani</i> .....	47
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS.....	64



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Efeito da temperatura e meio de cultura no crescimento micelial de *Alternaria dauci* (isolado AD 215).....32
- Figura 2 - Efeito da temperatura e meio de cultura no crescimento micelial de *Alternaria solani* (isolado AS 215).....32
- Figura 3 - Efeito de diferentes espectros de radiação no crescimento micelial de *Alternaria dauci* (isolado AD 215) e *Alternaria solani* (isolado AS 215) cultivadas em meio V8-ágar a 25 °C.....37
- Figura 4 - Efeito de diferentes espectros de radiação na esporulação de *Alternaria dauci* (isolado AD 215) e *Alternaria solani* (isolado AS 215) cultivadas em meio V8-ágar a 25 °C.....38
- Figura 5 - Efeito de diferentes estresses da colônia na esporulação de *Alternaria dauci* (isolado AD 42) e *Alternaria solani* (isolado AS 15) cultivadas em meio V8-ágar, a 25 °C e sob luz NUV.....44
- Figura 6 – Efeito do fotoperíodo na esporulação após estresse da colônia por raspagem do micélio aéreo de *Alternaria dauci* (isolado AD 42) cultivada em meio V8-ágar, a 25 °C e sob luz NUV.....47
- Figura 7 - Efeito da metodologia tradicional frente à desenvolvida, no crescimento micelial de isolados de *Alternaria dauci* e *Alternaria solani* cultivados em meio V8-ágar, a 25 °C e sob luz NUV.....50
- Figura 8 - Efeito da metodologia tradicional frente à desenvolvida, na esporulação após estresse da colônia por raspagem do micélio aéreo de isolados de *Alternaria dauci* e *Alternaria solani* cultivados em meio V8-ágar, a 25 °C e sob luz NUV.....51

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Nomenclatura, hospedeiro de origem e procedência dos isolados utilizados no estudo.....	22
Tabela 2 – Determinação do ponto de inativação micelial dos isolados AD 42 e AS 15 por radiação de microondas (Potência mínima = 97,62 W).....	40
Tabela 3 - Determinação do ponto de inativação micelial dos isolados AD 42 e AS 15 por temperatura de 100 °C.....	40
Tabela 4 - Determinação do ponto de inativação micelial dos isolados AD 42 e AS 15 por radiação UV.....	41

**LISTA DE ANEXOS**

Anexo A – Medidas de iluminância das lâmpadas fluorescentes.....	65
Anexo B – Distribuição espectral da lâmpada fluorescente UV (30 Watts, marca Toshiba, modelo GL 30T8).....	65
Anexo C - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente NUV (20 Watts, marca Ecolume, modelo T8/20W).....	66
Anexo D - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente azul (20 Watts, marca Ecolume, modelo T8/20W).....	66
Anexo E - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente verde (20 Watts, marca Ecolume, modelo T8/20W).....	67
Anexo F - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente amarela (20 Watts, marca Ecolume, modelo T8/20W).....	67
Anexo G - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente vermelha (20 Watts, marca Ecolume, modelo T8/20W).....	68
Anexo H - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente branca (20 Watts, marca GE, modelo Duramax).....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A queima das folhas da cenoura e a pinta-preta das solanáceas (tomate, pimentão e berinjela) são doenças causadas por fungos das espécies *Alternaria dauci* e *A. solani*, respectivamente.

Em cenoura, a queima das folhas por *A. dauci* é a doença mais comum, ocorrendo em todos os países produtores do mundo e provocando os maiores prejuízos à cultura. Nas solanáceas, *A. solani* pode causar severa destruição de área foliar, que provoca redução na produção e queima dos frutos pelo sol.

Essas espécies apresentam grande variabilidade na patogenicidade, crescimento e capacidade de esporulação em cultura pura. Dificuldades de esporulação *in vitro* são típicas, principalmente, em espécies patogênicas com esporos grandes e solitários.

A dificuldade na obtenção de esporos de *A. dauci* e *A. solani* é bastante conhecida, constituindo um entrave para os programas de melhoramento que visam desenvolver cultivares de cenoura e tomate resistentes a esses fungos.

É conhecido, também, que a fase reprodutiva destas espécies requer condições distintas daquelas requeridas para o crescimento micelial. Além disso, a transição para a fase reprodutiva exige severa indução por meio de fatores estressantes da colônia. Mundialmente, o método mais utilizado é o da raspagem da colônia, com subsequente exposição à luz. No entanto, praticamente não existem estudos sobre a influência do meio de cultura, temperatura, comprimento de onda da luz utilizada e fatores estressantes sobre o crescimento micelial e esporulação de *A. dauci* e *A. solani*. Estes estudos poderiam contribuir para facilitar ou aumentar a esporulação destas espécies, tornando mais simples e eficientes os trabalhos de inoculação que visam desenvolver medidas de controle para estas doenças.

Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: (i) identificar o melhor meio de cultura e a melhor temperatura para o crescimento micelial de *A. dauci* e *A. solani*; (ii) identificar o melhor comprimento de onda luminosa para o crescimento micelial e esporulação de *A. dauci* e *A. solani*; (iii) identificar o melhor fator estressante da colônia para a esporulação (iv); identificar o melhor fotoperíodo, aplicado após a indução, para a esporulação de *A. dauci* e *A. solani* e (v) comparar as melhores condições, acima

descritas, com a metodologia convencional, para diversos isolados de *A. dauci* e *A. solani*.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Revisão Bibliográfica

O gênero *Alternaria* foi estabelecido em 1817 por Nees. De acordo com Ellis (1971, 1976), o gênero contém 44 espécies. Porém, um diferente número de espécies tem sido estabelecido por outros taxonomistas, principalmente por combinar várias espécies dentro de uma ou por dividir uma espécie em várias.

Muitas das espécies de *Alternaria* como *A. dauci* (Kühn) Groves e Skolko e *A. solani* (Ellis e Martin) Jones e Grout apresentam distribuição mundial, de acordo com os mapas de distribuição de doenças de plantas (1983, 1986 apud ROTEM, 1998) e, são responsáveis por grandes devastações epidêmicas em várias culturas (ABBAS; EGLEY; PAUL, 1995).

A queima provocada por *A. dauci* em folhas de cenoura é a doença mais comum da cultura, ocasionando grandes prejuízos (LANGENBERG; SUTTON; GILLESPIE, 1977; SOUZA et al., 2001). Epidemias severas podem reduzir a produção de cenoura de 40 a 60% (NETZER; KENNETH, 1969; VINTAL et al., 1999; SOYLU et al., 2005). Os sintomas nas folhas aparecem de 8-10 dias após a infecção, como lesões marrom-esverdeadas e de aspecto encharcado. Com o crescimento das lesões, os tecidos atacados tornam-se marrom-escuros a pretos, podendo ser circundados por halos amarelos. Sob condições favoráveis, as lesões coalescem e, quando cerca de 40% da área foliar foi afetada, a folha amarelece e morre. Com a destruição foliar o arranque das raízes é prejudicado, provocando perdas adicionais nos países onde a colheita é realizada mecanicamente (FANCELLI, 1987; MASSOLA JÚNIOR et al., 2005).

Nas solanáceas, como tomate, pimentão e berinjela, a ocorrência de pinta-preta e queima das folhas pode causar severa destruição de área foliar, provocando redução na produção e queima dos frutos pelo sol. As lesões, mais abundantes nas folhas totalmente desenvolvidas, são necróticas, pardo-escuras, com ou sem zonas concêntricas bem pronunciadas, circulares ou elípticas, com diâmetro de 3 a 20 mm. Se a nervura da folha for destruída pela lesão, a circulação da seiva é interrompida,

provocando o amarelecimento e morte da parte afetada (BLANCARD, 1990; KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Diante do cultivo da cenoura e de algumas solanáceas em larga escala, há a necessidade de desenvolvimento de variedades com resistência às doenças e adaptações às diferentes condições climáticas. Contudo, programas específicos de melhoramento que visam desenvolver cultivares de cenoura e tomate resistentes a estes fungos enfrentam dificuldade na obtenção de esporos de *Alternaria dauci* e *A.solani* em quantidades adequadas para inoculações, visando selecionar genótipos. Estas espécies, além da variabilidade em meio de cultura, também se mostram variáveis na patogenicidade (FANCELLI, 1987, 1991), o que torna necessário o uso de vários isolados nos programas de melhoramento. Dificuldade de esporulação *in vitro* é típica em espécies patogênicas que produzem esporos grandes e solitários (ROTEM, 1998). Para espécies de *Alternaria* que esporulam irregularmente em meio de cultura, a quantidade de esporos pode variar dependendo da espécie, do isolado e das condições nutricionais e ambientais (SIMMONS, 1992).

Em *A. solani*, os processos de formação do conidióforo e dos esporos parecem requerer uma atmosfera com baixo teor de oxigênio, como observado em diferentes espécies de *Alternaria* que esporularam em folhas cobertas pelo sereno, sugerindo um baixo suprimento de oxigênio (LUKENS; HORSFALL, 1973). No processo de esporulação *in vitro*, os açúcares têm atuação variada em diferentes fases. A glicose aumenta a produção de conidióforo, mas inibe a formação de esporos (WAGGONER; HORSFALL, 1969 apud ROTEM, 1998). No entanto, com *A. solani* em batateira, a glicose provocou um aumento da esporulação quando suplementada às folhas durante a formação dos conidióforos, mas inibiu a produção de esporos quando os conidióforos já estavam formados (BASHI; ROTEM, 1975).

Sabe-se, também, que as condições requeridas na fase reprodutiva destas espécies são distintas das requeridas para o crescimento micelial (DAHLBERG; VAN ETTEN, 1982). Além disso, a transição da fase micelial para a reprodutiva necessita de severa indução por fatores estressantes da colônia para que a esporulação ocorra (LEACH, 1967; GOMES-OLIVERIA; MATSUMURA, 2001). Neergaard (1945), descrevendo a esporulação de várias espécies de *Alternaria*, apontou para a diferença

entre isolados com micélio abundante e pobre capacidade de esporulação e isolados com pobre micélio e alta produção de esporos, estabelecendo um antagonismo entre os padrões vegetativos e reprodutivos de crescimento. Essa observação está de acordo com a lei de Klebs (1900, apud ROTEM, 1998), que alega que a esporulação é favorecida pela inanição, a qual, simultaneamente, restringe o crescimento. Relevante à teoria da inanição é o fato de que a iluminação está associada ao acúmulo de substâncias de baixo peso molecular no micélio que inibem a fosforilação da glicose, induzindo a inanição (DAHLBERG; VAN ETTEN, 1982). Cochrane (1958) generalizou a teoria de Klebs e atribuiu a associação entre inanição e esporulação ao efeito do estresse não específico. A teoria de Cochrane foi, mais tarde, suportada por experimentos de Rotem e Bashi (1969) desenvolvidos com *A. solani*, no qual, estresses não específicos induziram a produção de esporos secundários diretamente do esporo mãe, reprimidos por uma germinação irregular. Com isso, atualmente, o método de estresse mais utilizado é o da raspagem do micélio aéreo, com subsequente exposição à luz branca ou ultravioleta próximo (NUV) (RANDS, 1917; LEACH, 1962; STRANDBERG, 1987).

Há um bom número de trabalhos indicando diferentes métodos de esporulação investigados, principalmente, entre as décadas de 50 e 80, como a utilização de luz ultravioleta (UV) (CHARLTON, 1953), luz fluorescente (LUKENS, 1960; DOUGLAS, 1972; STEVENSON; PENNYPACKER, 1988), injúria do micélio (LUDWIG; RICHARDSON; UNWIN, 1962), adição de substâncias ao meio de cultura, como carbonato de cálcio (SHAHIN; SHEPARD, 1979), tiamina, extrato de levedura (RATH; PADHI, 1975), potássio e zinco (RODIGIN, 1980). Apesar de relativamente antigas, muitas dessas referências se tornaram marcos no estudo dessas espécies e tiveram igual contribuição no conhecimento de seu crescimento e esporulação. No entanto, para o sucesso da esporulação, muitos outros fatores devem ser analisados e, praticamente, não há estudos recentes sobre a influência do meio de cultura, temperatura, comprimento de onda da luz utilizada e outros fatores estressantes sobre o crescimento micelial e esporulação de *A. dauci* e *A. solani*.

Diversos meios de cultura que favorecem o crescimento micelial e estimulam a esporulação de espécies de *Alternaria* têm sido relatados na literatura. Entre eles se



destacam os meios de aveia-ágar (LEITE; AMORIM, 2002; TUIE, 1969; QUEIROZ; BATISTA; BROMMNSCHENKEL, 2004) e o de batata-dextrose-ágar (BDA), freqüentemente utilizados para estudos de crescimento e esporulação (ALLEN; BROWN; KOCHMAN, 1983b; ÁVILA et al., 2000; COTTY; MISAGHI, 1985; FOURTOUNI; MANETAS; CHRISTIAS, 1998; HOTCHKISS; BAXTER, 1983; LACY; BRIDGMAN, 1962; SHABANA; ELWAKIL; CHARUDATTAN, 2001; SHAHIN; SHEPARD, 1979; SINGH, U.; SINGH, S., SARMA, 2000; STRANDBERG, 1987; TEIXEIRA et al., 2001). Mas Diener (1952) já alertava para o fato de que alguns fungos, como *Stemphylium solani* Weber, esporulavam fracamente nesse meio, propondo então, um meio preparado com suco industrializado composto por oito vegetais, o suco V8<sup>®</sup> (Campbell Soup Company). Muitos fungos ou alguns isolados que não esporulavam em meio BDA passaram a esporular nesse meio. Miller (1955), com base nos estudos de Diener (1952) propôs uma modificação com acréscimo de 3 gramas de carbonato de cálcio e 15 gramas de ágar em 200 mL de suco V8 para 1000 mL de água destilada e apresentou o meio V8-ágar como proposta geral para estudos com microrganismos, com a finalidade de sustentar o crescimento e esporulação da mais ampla diversidade de fungos e bactérias, tornando-se uma das mais úteis e necessárias ferramentas para estudos desenvolvidos com doenças de plantas (ÁVILA et al., 2000; LEACH, 1967; QUEIROZ; BATISTA; BROMMNSCHENKEL, 2004; SIMMONS, 1992; WALKER, 1982). No entanto, algumas variações nessa formulação já foram realizadas (ARAGAKI, 1962; LEACH, 1962; QUEIROZ; BATISTA; BROMMNSCHENKEL, 2004).

Beecher (1945) cita a utilização de extrato de farelo combinado com suco de tomate verde ou maduro, visando à esporulação de diversos isolados de *A. solani*. Outros autores propõem alternativas para a esporulação de *Alternaria dauci*, *A. solani* e outras espécies de *Alternaria*, como, por exemplo: czapek-ágar (LEACH, 1965, 1967; SINGH, U.; SINGH, S.; SARMA, 2000); czapek-ágar sem adição de carbono ou nitrogênio, albume-água destilada, albume-citrato de sódio (SINGH, U.; SINGH, S.; SARMA, 2000); farelo de milho-ágar, feijão-de-lima-ágar, centeio-ágar, água-ágar (SHAHIN; SHEPARD, 1979); extrato de malte-ágar (SHAHIN; SHEPARD, 1979; LEACH, 1967); suco de tomate industrializado e caseiro, acrescidos de carbonato, batata-dextrose, batata-cenoura-dextrose (ÁVILA et al., 2000); sacarose-carbonato de

cálcio-ágar, suco de cenoura-ágar, vagem-ágar e as mais variadas associações desses meios com diferentes concentrações de açúcares, sais carbonados e extratos de folha e semente de plantas alvo de infecção do patógeno (DOUGLAS, 1972; QUEIROZ; BATISTA; BROMMNSCHENKEL, 2004; SHABANA; ELWAKIL; CHARUDATTAN, 2001; STRANDBERG, 1987).

Em estudos desenvolvidos com outras espécies de *Alternaria*, os meios BDA e V8 são ainda os que apresentam os melhores resultados para crescimento micelial e esporulação. No entanto, estudos com *A. dauci* e *A. solani* são escassos, mas é conhecido que muitas espécies de *Alternaria* esporulam melhor em meio pobre em açúcar, tal como em meio V8-ágar, constituído de 0,3% de açúcar, naturalmente oferecido pelos oito vegetais de sua composição. Em alguns casos, extratos da planta hospedeira podem melhorar a esporulação, como, por exemplo, extrato de sementes de girassol em meio BDA para esporulação de *A. helianthi* (ALLEN; BROWN; KOCHMAN, 1983a). Muitas modificações ou suplementações em meio de cultura podem ocorrer. Contudo, o comportamento de isolados de *A. dauci* e *A. solani in vitro* é muito complexo. Alguns isolados podem manter seu potencial de esporular por anos em meio de cultura, enquanto outros cessam de produzir esporos depois de curto período de tempo, como o comportamento diferenciado de vários isolados de *A. solani* observado por Rotem (1998).

Visando prover adequado suprimento de esporos para inoculações em programas de melhoramento, muitos disparadores da produção em massa de esporos têm sido estudados. Entre eles, a irradiação eletromagnética com luz UV é o principal elemento na maioria dos protocolos de esporulação, com comprimentos de onda UV ou NUV (LEACH, 1960). Conseqüentemente, muitos outros estudos foram iniciados para determinar os efeitos da exposição à irradiação UV (ARAGAKI, 1961; CHARLTON, 1953; DOUGLAS, 1972; FOURTOUNI; MANETAS; CHRISTIAS, 1998; ZIMMER; McKEEN, 1969), NUV (KUMAGAI; YOSHIOKA; ODA, 1976; LUKENS, 1963; TEIXEIRA et al., 2001) e a outros comprimentos de onda (ARAGAKI, 1961; FANCELLI; KIMATI, 1990) na esporulação de espécies de *Alternaria*.

Contudo, o processo de esporulação compreende duas etapas distintas, sendo que a primeira corresponde à formação dos conidióforos, e pode ser estimulada por

irradiação com luz UV ou NUV, mas a injúria do micélio também pode favorecer ou desencadear este processo. Na segunda etapa ocorre a formação dos conídios nas extremidades dos conidióforos, geralmente induzida pela ausência de luz visível (LUKENS; HORSFALL, 1973; ROTEM, 1998).

Outro fator importante para induzir ou aumentar a formação de esporos é a temperatura. O crescimento micelial ocorre entre 5 e 30 °C para a maioria das espécies, porém, para a esporulação, esse limite é muito mais estreito (HAWKER, 1966; TORRES et al., 2003). Abbas, Eggly e Paul (1995), estudando o comportamento de *A. helianthi*, observaram que o crescimento micelial ocorreu entre 18 e 30 °C, mas não abaixo e acima desses valores, estabelecendo os limites para o crescimento. A esporulação também ocorreu entre 18 e 30 °C, porém foi muito mais pronunciada entre 18 e 26 °C. Entre 28 e 30 °C a esporulação foi reduzida drasticamente. Os autores observaram também que os esporos formados a 18 °C eram maiores, mais largos e mais compartimentados.

Aragaki (1961) estudando a interação da temperatura com iluminação na esporulação de *A. tomato* cultivada em meio V8-ágar sob luz fluorescente contínua, submeteu algumas placas a tratamentos de submersão em recipientes com água com temperatura variando de 6 a 27 °C por 22 horas, iluminadas com luz fluorescente 15 watts ao nível da superfície da colônia. Outro grupo de placas foi submerso, também por 22 horas, em água com temperatura de 15 a 31 °C, porém, foi mantido no escuro. Houve profusa esporulação de 6 a 23 °C. Acima de 25 °C não houve formação de esporos. Nas culturas mantidas em escuro, a esporulação foi grande e menos variável, se estendendo de 15 a 30 °C. As culturas iluminadas que não produziram esporos acima de 25 °C, quando transferidas para uma câmara iluminada e com temperatura mantida a 20 °C ou mantidas no escuro com temperaturas entre 26 e 31 °C, esporularam profusamente. Segundo o autor, é provável que a esporulação de muitos fungos seja inibida pela luz em altas temperaturas. A hipótese de que baixas temperaturas são requeridas para a esporulação de muitos fungos é confirmada por outros autores (McCALLAN; CHAN, 1944; NEERGAARD, 1945; LEACH, 1967), mas os estudos de Aragaki (1961) sugerem a substituição de baixas temperaturas por períodos de escuro para *A. solani*, *A. passiflora*, *A. porri* e *A. dianthicola*.

Mas, infelizmente, a maioria dos registros não especifica as técnicas e precauções tomadas para evitar o efeito estufa em placas de petri periodicamente expostas à luz e, com isso, discrepâncias entre citações por diferentes pesquisadores são freqüentemente encontradas. A interação da luz e temperatura na esporulação de fungos é reconhecidamente complexa. Douglas (1972) obteve profusa esporulação com *A. solani* incubada a 20 °C, sob luz branca contínua por 24 horas e também a 25 °C sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Nenhum estresse foi aplicado às colônias, o que diverge de muitos outros relatos.

A interação de microrganismos e outro tipo de radiação, a produzida por aparelhos de microondas domésticos, também vem sendo estudada. Esse tipo de energia eletromagnética, com freqüência na faixa de  $10^3$  a  $10^4$  MHz, causa migração de íons e rotação de dipolos, mas não causa mudanças na estrutura molecular (KINGSTON; JASSIE, 1988). Porém, nos estudos envolvendo microrganismos, o efeito esterilizante dessa radiação é enfatizado. Os tratamentos de solos ou sementes, ainda que escassos, vêm apresentando bons resultados. Gibson, Fox e Deacon (1988) avaliaram o efeito desse tipo de radiação em solos expostos de 20 a 50 segundos a uma freqüência de 2450 MHz, elevando a temperatura do solo até 60 °C e apresentando redução substancial no total da população de bactérias e fungos que, conseqüentemente, promoveu um aumento do número de ectomicorrizas formadas em raízes de *Betula pendula* Roth. nesse solo. A eficiência desse tratamento também foi confirmada por Ferriss (1984), quando populações de *Phytium*, *Fusarium* e todos os nematóides da amostra foram eliminados. Amostras similares de solo também foram tratadas em autoclave ou com fumigação com brometo de metila e observou-se que o tratamento com microondas foi responsável pela menor liberação de nutrientes na solução de solo, resultando em menor recolonização por *Fusarium* ou outros fungos.

A utilização da radiação de microondas para tratamentos de sementes de feijão-branco foi avaliada por Spilde (1987). Sementes expostas a campos elétricos de 2450 MHz apresentaram um aumento significativo da porcentagem de germinação quando os tratamentos expuseram as sementes a tratamentos que se estenderam de 38 a 49 °C. Recentes trabalhos têm sido relatados em outras áreas utilizando a energia de microondas, como Valsechi (2005), que verificou a total eliminação do contaminante de

fermentações alcoólicas *Lactobacillus fermentum* após 9 segundos de irradiação a uma temperatura de 58,3 °C. A desinfecção de próteses odontológicas contaminadas com várias espécies de bactérias também foi estudada por Silva (2005) e por Campanha (2005), obtendo ótimos resultados após 6 minutos de exposição a 650 W de potência.

Ainda que a utilização do aparelho de microondas doméstico venha aumentando, com finalidade esterilizante, conforme mencionado, não há relatos na literatura de sua utilização para fins de esporulação de fungos. Dessa forma, vislumbrou-se também, nesse trabalho, a possibilidade de se utilizar a radiação produzida por aparelhos domésticos de microondas como fator estressante do micélio aéreo, visando à esporulação de *A. dauci* e *A. solani*.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Obtenção dos isolados

Foram utilizados neste estudo seis isolados de *Alternaria dauci* (AD) e sete de *A. solani* (AS), provenientes de diferentes localidades dos estados de São Paulo e Paraná (Tabela 1). Os isolados foram obtidos da coleção do Laboratório de Micologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Piracicaba) e da empresa Sakata Seed Sudamerica LTDA (Bragança Paulista).

Os isolados, preservados em tubos contendo meio batata-dextrose ágar (BDA) e óleo mineral ou em água destilada esterilizada, foram recuperados a partir de repiques em placas de Petri plásticas de 90x15 mm contendo meio BDA e incubados a 25 °C e no escuro, em câmara de germinação tipo BOD para prover o inóculo inicial para os experimentos.

Tabela 1 - Nomenclatura, hospedeiro de origem e procedência dos isolados utilizados no estudo

<b>Isolado</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Procedência</b>
<b>AD 22</b>	Cenoura	Bragança Paulista - SP
<b>AD 24</b>	Cenoura	Mogi das Cruzes - SP
<b>AD 28</b>	Cenoura	Bragança Paulista - SP
<b>AD 33</b>	Cenoura	Mogi das Cruzes - SP
<b>AD 42</b>	Cenoura	Bragança Paulista - SP
<b>AD 215</b>	Cenoura	Londrina - PR
<b>AS 03</b>	Tomate	Londrina - PR
<b>AS 05</b>	Tomate	Londrina - PR
<b>AS 15</b>	Tomate	Bragança Paulista - SP
<b>AS 20</b>	Tomate	Londrina - PR
<b>AS 21</b>	Tomate	Londrina - PR
<b>AS 22</b>	Tomate	Londrina - PR
<b>AS 215</b>	Tomate	Londrina - PR

## 2.2.2 Efeito do meio de cultura e da temperatura no crescimento micelial

A avaliação do crescimento micelial baseou-se na determinação da velocidade de crescimento dos isolados AD 215 e AS 215 durante o período de incubação, em três diferentes meios de cultura e em cinco temperaturas distintas.

Os meios de cultura utilizados foram o meio de Aveia, o BDA e o V8-ágar. O meio de aveia, proposto por Tuite (1969) para o crescimento e esporulação de diversos fungos, foi preparado com 60 gramas de farinha de aveia, 15 gramas de ágar e água destilada q.s.p. 1000 mL. O BDA foi preparado de acordo com Difco Laboratories (1984), usando 39 gramas do meio desidratado acrescidos de água destilada q.s.p. 1000 mL. O V8-ágar, proposto por Miller (1955), foi preparado com 200 mL de suco V8 (Campbell Soup Company), 15 gramas de ágar e 3 gramas de carbonato de cálcio para 1000 mL de água destilada. Cerca de 20 mL de cada meio de cultura foram vertidos em placas de Petri plásticas de 90x15 mm.

Discos de 6 mm de diâmetro, de cada isolado, foram retirados da borda de colônias cultivadas em meio BDA e repicados para o centro de cada placa de Petri, em 5 repetições. Os três meios de cultura citados acima foram utilizados. As placas foram incubadas no escuro, em estufas com temperaturas controladas de 15, 20, 25, 30 e 35 °C ( $\pm 1$  °C). O crescimento micelial foi verificado a cada dois dias, através de medições do diâmetro das colônias, em dois eixos perpendiculares entre si. Os eixos foram pré-estabelecidos na primeira avaliação através de marcação no fundo da placa. As culturas foram observadas durante um período de 10 dias ou até que, em uma das placas, o micélio já tivesse tomado por completo a superfície do meio de cultura. A velocidade do crescimento micelial radial foi expressa em centímetros por dia.

Todos os procedimentos foram realizados para ambos os isolados, AD 215 e AS 215, perfazendo um esquema fatorial 2x3x5 (fungos x meios de cultura x temperaturas). Cinco repetições (placas) foram utilizadas em cada tratamento.



### 2.2.3 Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação

O experimento foi conduzido após a seleção do melhor meio de cultura e temperatura observados para o crescimento dos isolados AD 215 e AS 215. Os mesmos isolados foram repicados para o centro de placas de Petri contendo o meio V8-água e incubados sob diferentes espectros de radiação luminosa, proporcionados por lâmpadas fluorescentes coloridas. As placas permaneceram a 30 cm das lâmpadas, conforme preconizado por Leach (1962).

A distribuição espectral de energia das lâmpadas fluorescentes foi determinada em espectrofluorímetro marca Perkin Elmer, modelo 2555, utilizado no limite de sua sensibilidade (Anexos B, C, D E, F, G e H).

Além da determinação do espectro de cada lâmpada, realizaram-se medidas de iluminância, fluxo luminoso incidente por unidade de área iluminada, para cada fonte de radiação utilizada nos experimentos, com luxímetro marca Instrutherm<sup>®</sup>, modelo LD-204 localizado a 30 centímetros de distância da fonte (Anexo A). Os valores de iluminância são importantes para interpretar os diferentes valores fixados no eixo y (unidade arbitrária) das figuras constantes dos anexos anteriormente citados.

As colônias foram incubadas de 8 a 10 dias, em temperatura 25 °C ( $\pm 1$  °C), e o crescimento micelial foi acompanhado e avaliado conforme descrito no item 2.2.2. O melhor espectro de radiação observado para o crescimento micelial de ambas as espécies foi selecionado. Em seguida, as placas foram divididas em dois grupos. Todas as placas de um dos grupos sofreram raspagem do micélio aéreo (BEECHER, 1945) com lâmina de vidro e 15 mL de água destilada esterilizada. As colônias do outro grupo foram mantidas íntegras. Em seguida, para avaliar o efeito dos espectros de radiação na esporulação, os dois grupos foram submetidos às mesmas condições de radiação empregadas no crescimento micelial, sob fotoperíodo de 12 horas na luz e 12 horas no escuro, respectivamente, por 48 horas. No final desse período os esporos foram coletados em 15 mL de água destilada esterilizada, por raspagem com lâmina de vidro. A determinação de esporos da suspensão foi realizada em câmara de Neubauer. A esporulação foi transformada em número de esporos/cm<sup>2</sup> de colônia.

O experimento foi inteiramente casualizado, com 5 repetições (placas) por tratamento.

#### **2.2.4 Efeito de diferentes estresses da colônia na esporulação**

Após a determinação do melhor meio de cultura, temperatura e espectro de radiação luminosa para crescimento e esporulação, avaliaram-se diferentes fatores estressantes da colônia e seus efeitos na esporulação.

Além da raspagem do micélio aéreo, método tradicionalmente utilizado, testaram-se radiação de microondas, temperatura de 100 °C e radiação UV.

Testes preliminares foram realizados, visando determinar o ponto de inativação do micélio, submetendo-se colônias a cada um desses fatores, por diferentes períodos de tempo, conforme descrito nos itens 2.2.4.1, 2.2.4.2 e 2.2.4.3. Para a aplicação do fator estressante, elegeu-se o período de tempo imediatamente anterior ao ponto de inativação do micélio, admitindo-se que neste ponto o micélio foi bastante estressado.

O meio de cultura, temperatura e espectro de radiação utilizados na incubação foram aqueles dos melhores tratamentos determinados nos experimentos anteriores. Os isolados AD 42 e AS 15 foram incubados nessas condições por 7 dias e então, submetidos ao fator estressante. Em seguida, as colônias foram colocadas em fotoperíodo de 12 horas na luz (com o mesmo espectro de radiação usado na incubação) e 12 horas no escuro, por 48 horas.

A avaliação da esporulação foi realizada de maneira idêntica à descrita no item 2.2.3.

#### **2.2.4.1 Determinação do ponto de inativação micelial por radiação de microondas**

Utilizou-se um forno de microondas doméstico, marca Panasonic, modelo NN-S62B, 110 V, capacidade de 35 L, potência máxima de 1000 W e frequência de 2450 MHz.

Placas com colônias dos isolados AD 42 e AS 15, cultivados por 7 dias em meio V8-ágar, foram colocadas na posição central do forno de microondas e irradiadas com potência mínima (97,62 W), por diferentes períodos de tempo (5, 10, 15, 20, 25 e 30 s). Foram utilizadas 3 placas para cada período de tempo testado. Em seguida, coletaram-se, aleatoriamente, fragmentos do micélio em 10 pontos da superfície da colônia, plaqueando-os em meio BDA contido em placas de Petri. O micélio foi considerado inativo quando nenhum dos fragmentos plaqueados originou colônia.

#### **2.2.4.2 Determinação do ponto de inativação micelial por temperatura de 100 °C**

Utilizou-se uma estufa marca Ação Científica, modelo EL 1.1, potência 465 W e com controle digital de temperatura. Essa estufa foi regulada para 100 °C ( $\pm 2$  °C) para esse teste.

Placas de V8-ágar contendo colônias com 7 dias dos isolados AD 42 e AS 15 foram colocadas na estufa, por períodos de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 20 min. Para cada período de tempo testado foram usadas 3 placas.

A avaliação da inativação do micélio foi realizada da mesma maneira descrita no item anterior.

#### **2.2.4.3 Determinação do ponto de inativação micelial por radiação UV**

Para este teste, utilizou-se lâmpada UV marca Toshiba, modelo GL 30T8, potência 30 W acoplada no interior da câmara de fluxo laminar. A distribuição espectral e iluminância desta lâmpada foram determinadas, conforme anexos A e B.

As placas de V8-ágar contendo colônias com 7 dias dos isolados AD 42 e AS 15 foram dispostas a 30 cm abaixo da lâmpada UV. A radiação foi aplicada por períodos de tempo de 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 min. Utilizaram-se 3 placas para cada período.

A avaliação da inativação foi idêntica à citada anteriormente.

#### **2.2.5 Efeito do fotoperíodo aplicado após o estresse da colônia na esporulação**

Esse experimento foi conduzido após a verificação do melhor fator estressante da colônia e do efeito na esporulação. O meio de cultura, temperatura e espectro de radiação luminosa utilizados no crescimento e esporulação foram aqueles dos melhores tratamentos determinados nos experimentos anteriores.

Discos de 6 mm de diâmetro dos isolados AD 42 e AS 15 foram repicados para placas de Petri e incubados, de 7 a 8 dias, sob luz contínua, de acordo com item 2.2.3. A avaliação do crescimento micelial foi realizada conforme descrito no item 2.2.2.

Com a finalidade de se determinar o melhor fotoperíodo para a esporulação, as placas foram submetidas à raspagem do micélio aéreo, melhor fator estressante verificado no item 2.2.4 e, submetidas a fotoperíodos (luz / escuro, respectivamente) por 24 h / 0 h, 22 h / 2 h, 17 h / 7 h, 12 h / 12 h, 7 h / 17 h, 2 h / 22 h e 0 h / 24 h. A avaliação da esporulação foi realizada conforme item 2.2.3.

O experimento foi inteiramente casualizado, com 5 repetições (placas) por tratamento.

### **2.2.6 Comparação entre o método tradicional e o desenvolvido neste estudo, para diferentes isolados de *Alternaria dauci* e *A. solani***

Após a determinação das melhores condições para o crescimento micelial e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani* em meio de cultura, observados nos experimentos anteriormente realizados, objetivou-se, finalmente, comparar a metodologia tradicional com a desenvolvida nesse estudo, em diversos isolados dos fungos.

O experimento foi conduzido com os isolados AD 22, AD 24, AD 28, AD 33, AD 42, AS 03, AS 05, AS 20, AS 21 e AS 22 (Tabela 1).

Discos de 6 mm de diâmetro foram repicados para o centro de placas de Petri contendo o meio BDA e o meio V8-ágar. No experimento utilizando a metodologia tradicional, placas contendo o meio BDA foram incubadas de 7 a 11 dias, em temperatura de 25 °C ( $\pm 1$  °C), sob luz branca contínua (a mesma utilizada no item 2.2.3). Para o outro experimento, placas contendo o meio V8-ágar foram incubadas durante o mesmo tempo e temperatura, sob luz NUV contínua, de acordo com o item 2.2.3. O crescimento foi avaliado conforme descrito no item 2.2.2. Em seguida, os dois grupos foram submetidos à raspagem do micélio aéreo, metodologia utilizada tradicionalmente e também o melhor tratamento observado nesse estudo para ambas as espécies, conforme verificado no item 2.2.4. A avaliação da esporulação foi realizada conforme item 2.2.3.

O experimento foi inteiramente casualizado, com 5 repetições (placas) por tratamento.

### **2.2.7 Tratamento estatístico**

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. A determinação do erro padrão foi realizada por meio do software “Origin 7.0” (Originlab Corporation, Northampton, EUA)

As comparações entre os tratamentos foram feitas com base nas médias e nas barras estabelecidas pelo erro padrão.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Efeito do meio de cultura e da temperatura no crescimento micelial

O crescimento micelial de *Alternaria dauci* e *A.solani* foi influenciado pelo meio de cultura e pela temperatura. O meio V8-ágar se destacou para ambas as espécies (Figuras 1 e 2). Nesse meio, a temperatura ótima de crescimento para ambas as espécies foi ao redor de 25 °C. Na figura 2, entre 15 e 25 °C, os resultados do meio de aveia foram similares aos do meio V8-ágar, porém, ambos foram superiores quando comparados ao meio BDA.

Queiroz, Batista e Brommschenkel (2004) relataram a utilização do meio de aveia e BDA em estudo com *Alternaria brasiliensis*, mas os resultados obtidos foram inferiores aos observados nos outros meios também avaliados no estudo, preparados com adição de extratos vegetais ou mesmo utilizando suco de tomate com adição de CaCO<sub>3</sub> em diferentes concentrações. O meio BDA, freqüentemente utilizado para estudos de crescimento e esporulação de espécies de *Alternaria* (STRANDBERG, 1987; FANCELLI; KIMATI, 1990; ÁVILA et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2001), com ou sem adição de ágar, não tem se mostrado como a melhor opção para estudos de crescimento quando comparado com meios que contenham extratos e sucos de folhas e de partes vegetais, que normalmente estimulam o crescimento micelial e esporulação de muitos fungos (DHINGRA; SINCLAIR, 1985). As figuras 1 e 2 mostram um crescente aumento da velocidade de crescimento em meio BDA com o aumento da temperatura. No entanto, os resultados são menos marcantes que os obtidos com os outros meios estudados.

A melhor temperatura observada para o crescimento de ambas as espécies, independente do meio de cultura, ainda é a mesma da observada para muitas outras espécies de fungos, ocorrendo em torno de 25 °C (GRIFFIN, 1994; ALLEN; BROWN; KOCHMAN, 1983a). O meio V8-ágar (MILLER, 1955), devido à sua composição, ainda se constitui na melhor opção para estudos de crescimento micelial destas e de outras muitas espécies de *Alternaria* e outros fungos, quando comparada com meios sintéticos, conforme os relatos da literatura (ARAGAKI, 1961; LEACH, 1967; ÁVILA et

al., 2000; QUEIROZ; BATISTA; BROMMNSCHENKEL, 2004; SIMMONS, 1992; WALKER, 1982).



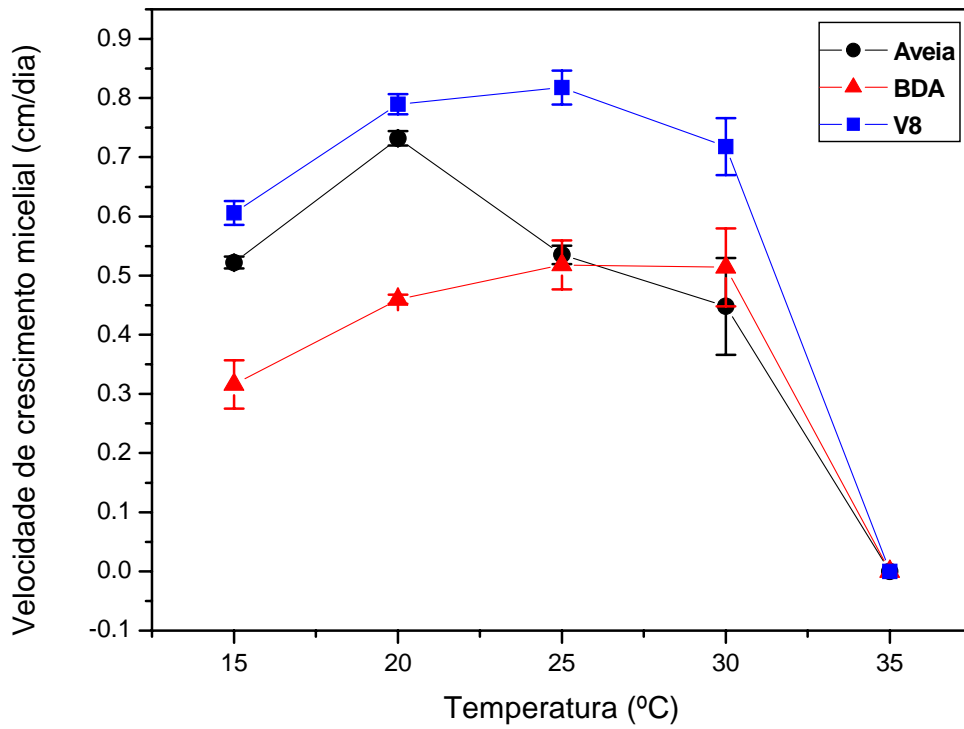


Figura 1 – Efeito da temperatura e meio de cultura no crescimento micelial de *Alternaria dauci* (isolado AD 215). As barras representam o erro padrão.

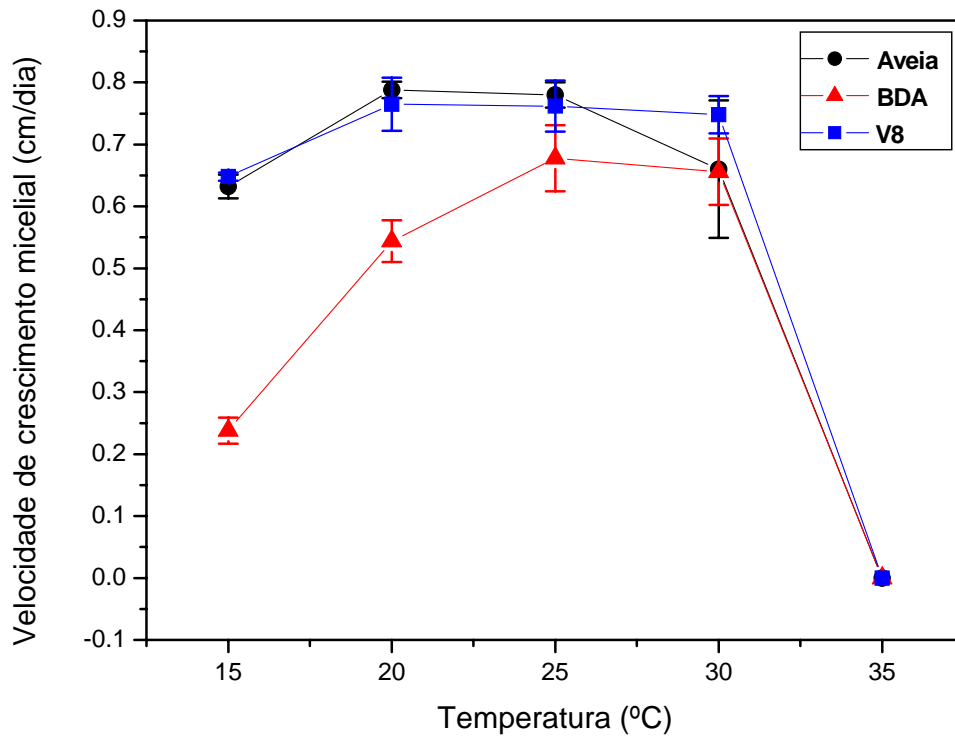


Figura 2 – Efeito da temperatura e meio de cultura no crescimento micelial de *Alternaria solani* (isolado AS 215). As barras representam o erro padrão.

### 2.3.2 Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação

As duas espécies estudadas apresentaram comportamentos diferenciados em relação aos diferentes espectros de radiação testados (Figuras 3 e 4). *Alternaria solani* foi menos influenciada, apresentando apenas um ligeiro pico na velocidade de crescimento na região do azul. *Alternaria dauci* sofreu influência mais marcante, crescendo melhor nas regiões NUV e branca, mostrando nítido efeito negativo da luz verde.

Comprimentos de onda maiores, acima de 600 nm, parecem ser mais efetivos na estimulação do crescimento micelial de *A. dauci*, conforme Strandberg (1987), que utilizou luz branca incandescente em estudo de crescimento e esporulação de *A. dauci*. O crescimento de *A. radicina*, investigado por Teixeira et al. (2001), também apresentou melhor crescimento em luz NUV, quando comparado com luz branca, apesar de não diferirem estatisticamente. No entanto, poucos são os estudos que relatam o real intervalo espectral das luzes utilizadas. Conforme anexos C e H, as luzes NUV e branca apresentaram comprimentos de onda adicionais, como o pico 682 nm observado na lâmpada NUV e o intervalo de 314-439 nm na lâmpada branca. De acordo com os resultados do presente trabalho, tanto a luz NUV quanto a branca podem ser aplicados em estudos de crescimento micelial de *A. dauci*, já que não diferiram entre si.

Para *A. solani*, os resultados mostraram que houve marcante aumento no crescimento entre 450-510 nm (azul). Os demais comprimentos de onda utilizados não apresentaram efeito marcante no crescimento (Figura 3). A estimulação do crescimento de *A. solani* no intervalo da luz azul (450-510 nm) foi inesperada, pois esse intervalo é altamente inibidor da esporulação dessa espécie (HONDA; NEMOTO, 1984; LUKENS, 1965). Contudo, não há relatos na literatura da influência da luz azul no crescimento micelial de espécies de *Alternaria*. Portanto, os resultados desse trabalho preconizam a utilização da luz azul em estudos de avaliação de crescimento micelial ou produção de biomassa de *A. solani*.

Os dados das figuras 1 e 2 mostram que o melhor crescimento de ambas as espécies no escuro, obtido com o meio V8-ágar entre 20 e 30 °C, não foi muito discrepante dos melhores resultados observados nas figuras 3 e 4. Houve um

decréscimo do crescimento em alguns pontos, como no intervalo de 450 a 600 nm, mas não houve grande estimulação do crescimento pela irradiação, exceção feita ao intervalo 450-510 nm para *A. solani*.

Se os diferentes espectros de radiação, de forma geral, não apresentaram grandes efeitos no crescimento, principalmente para *A. solani*, o mesmo não ocorreu com a esporulação das duas espécies. A esporulação foi marcadamente afetada pelos diferentes comprimentos de onda (Figura 4). Os resultados mostraram grande esporulação de *A. solani* no intervalo de 310-440 nm e de 620-670 nm e intensa inibição no intervalo 450-510 nm (luz azul).

Espécies como *A. dauci* e *A. solani* que produzem esporos grandes e solitários necessitam de fortes fontes indutoras para que a esporulação ocorra (ROTEM, 1998) e, a raspagem do micélio (RANDS, 1917), que induziu a colônia à inanição, se mostrou adequada e necessária para a iniciação do processo de formação dos conidióforos, que ocorre na presença de radiação luminosa. As placas que não tiveram o micélio aéreo removido não apresentaram esporulação.

Entre todos os disparadores de produção em massa de esporos, a radiação é, sem dúvida, o mais marcante. Muitos protocolos desenvolvidos para estimular a esporulação de *A. dauci* e *A. solani in vitro* empregam luz branca ou NUV para formação do conidióforo, com subseqüente exposição ao escuro para formação dos esporos.

Apesar de a produção de esporos ter sido menor sob luz branca, quando comparada à NUV, estes dois espectros não diferiram entre si. A determinação espectral da luz NUV (Anexo C) e branca (Anexo H) mostrou que ambas apresentaram picos de comprimentos de onda entre 310 e 440 nm, preconizado por Leach (1967) como o melhor intervalo espectral para indução da esporulação dessas espécies, conforme comprovado por este estudo. Por isso, a utilização de luz branca em estudos de esporulação dessas espécies ainda parece ser uma boa opção.

Teixeira et al. (2001), estudando a influência da luz branca e NUV no crescimento e esporulação de *Alternaria radicina*, não observaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, dentre os dois parâmetros estudados.

Segundo Rotem (1998), na verdade não há um consenso sobre o efeito da luz na formação dos conidióforos, mas é certo que irradiações de culturas fúngicas induzem a formação de novos ácidos nucléicos ou substâncias esporogênicas (TURIAN, 1974).

Colônias de *A. chrysanthemi* (LEACH, 1965) e *A. dauci* (TRIONE; LEACH, 1969) submetidas à luz NUV e UV, respectivamente, produzem uma substância identificada como P310, aparentemente associada à fotoesporogênese. Essa substância tem absorção máxima em 310 nm, comprimento de onda mais efetivo para a esporulação. É sintetizada quando colônias esporulantes são submetidas a esse comprimento de radiação. Reluta-se em admitir que essa substância seja um fotorreceptor porque em *Ascochita pisi* ela continua a ser sintetizada no escuro após ter recebido um estímulo inicial com radiação NUV. Especula-se que possa ocorrer em uma forma reduzida quimicamente e inativa biologicamente em colônias não irradiadas ou ativas biologicamente quando fotooxidada. A ação de substâncias como a P310 nunca foi negada, mas não existem pesquisas recentes sobre o assunto.

Honda e Nemoto (1984) avaliaram o efeito da radiação monocromática de 232-722 nm para se descobrir um espectro de fotoinibição da esporulação. O intervalo correspondente à luz azul foi identificado como altamente inibidor da esporulação em *A. solani*. Os resultados apresentados na figura 4 para o intervalo de 450-510 nm indicam que a fotoinibição da formação conidial é uma resposta biológica à luz azul. Conidióforos nos quais a conidiação foi induzida pela irradiação NUV podem reverter ao estado vegetativo após o término da conidiação se houver nova exposição à luz azul. Mas se após a inibição houver uma nova exposição à irradiação NUV em um tempo suficiente, a esporogênese pode ser reiniciada. A resposta conidial é determinada pela qualidade e quantidade de luz administrada por último (KUMAGAI; ODA, 1969; KUMAGAI, 1982; VAKALOUNAKIS; CHRISTIAS, 1981).

A fase terminal do ciclo de esporulação, onde são formados os conídios, pode acontecer sob baixas temperaturas (NEERGAARD, 1945; LEACH, 1967), mas Aragaki (1961) sugere a substituição de baixas temperaturas por períodos de escuro para *A. solani*, *A. passiflora*, *A. porri* e *A. dianthicola*. Aparentemente, uma substância essencial para a formação conidial é formada em conidióforos submetidos ao escuro. A luz inibe a formação de conídios pela decomposição dessa substância. Com exposições

contínuas à luz, o material é destruído conforme é produzido. Por isso, períodos de escuro intercalados com “flashes” de luz podem diminuir a esporulação exponencialmente (LUKENS, 1963).

O espectro de ação da luz azul é similar ao espectro de absorção da riboflavina-5-fosfato-mononucleotídeo (FMN), sugerida como um fotorreceptor no sistema. A FMN é responsável por anular o efeito inibidor da luz azul na esporulação. Isso sugere que a flavina atua em dois caminhos: (i) como um receptor através do qual a luz inibe a esporulação e (ii) como requerimento para a formação conidial. Adição de FMN ao meio de cultura proporcionou ótima esporulação de *A. solani* mesmo após 12 horas de escuro ter havido uma curta exposição à luz azul. Os dados de Lukens (1963) mostraram que quanto maior fosse a concentração de FMN maior seria o efeito inibidor e, conseqüentemente, maior seria a produção de esporos. A produção de esporos envolve um sistema terminal ferro-flavina com fosforilação oxidativa na transformação do ADP para ATP (LUKENS; HORSFALL, 1973).

Kumagai, Yoshioka e Oda (1976) propuseram a existência de dois pigmentos, o  $P_{NUV}$  (fotorreceptor para a luz NUV) e o  $P_B$  (fotorreceptor para a luz azul). Ambos estariam envolvidos no processo de fotorreação reversível da luz azul e NUV. Essa parece ser a hipótese mais clara para explicar a alta influência da luz NUV na indução da esporulação. Sob luz NUV e na presença do fotorreceptor  $P_{NUV}$ , uma substância desconhecida, pré-existente no micélio, seria reduzida e se tornaria ativa fisiologicamente para induzir a formação de conidióforos. A radiação azul, ao contrário, provocaria fotooxidação dessa substância e inverteria a indução da conidiação. Não há relatos na literatura de que outros comprimentos de onda também sejam capazes de realizar essa fotorreversão conidial. A luz azul ainda é considerada altamente inibidora da esporulação, justificando a menor esporulação observada na figura 4.

A baixa esporulação observada para os intervalos 450-510 nm, 480-590 nm, 570-630 nm e 610-670 nm também estão de acordo com os resultados obtidos por Honda e Nemoto (1984).

A esporulação do isolado de *A. dauci* utilizado neste ensaio foi drasticamente reduzida. Houve, apenas, mínima produção de esporos sob luz NUV, o que confirma o efeito desse comprimento de onda (Figura 4). Muitos autores citam a grande

variabilidade de isolados dessas espécies em meio de cultura, no que concerne à esporulação. Alguns isolados podem se manter esporulantes por anos em meio de cultura mesmo após muitos repiques. Outros podem perder a capacidade de esporulação após curto período em cultura ou única passagem por um meio de cultura (ROTEM, 1998; ZIMMER; McKEEN, 1969). A reduzida esporulação de *A. dauci* pode ser devido às características intrínsecas do fungo.

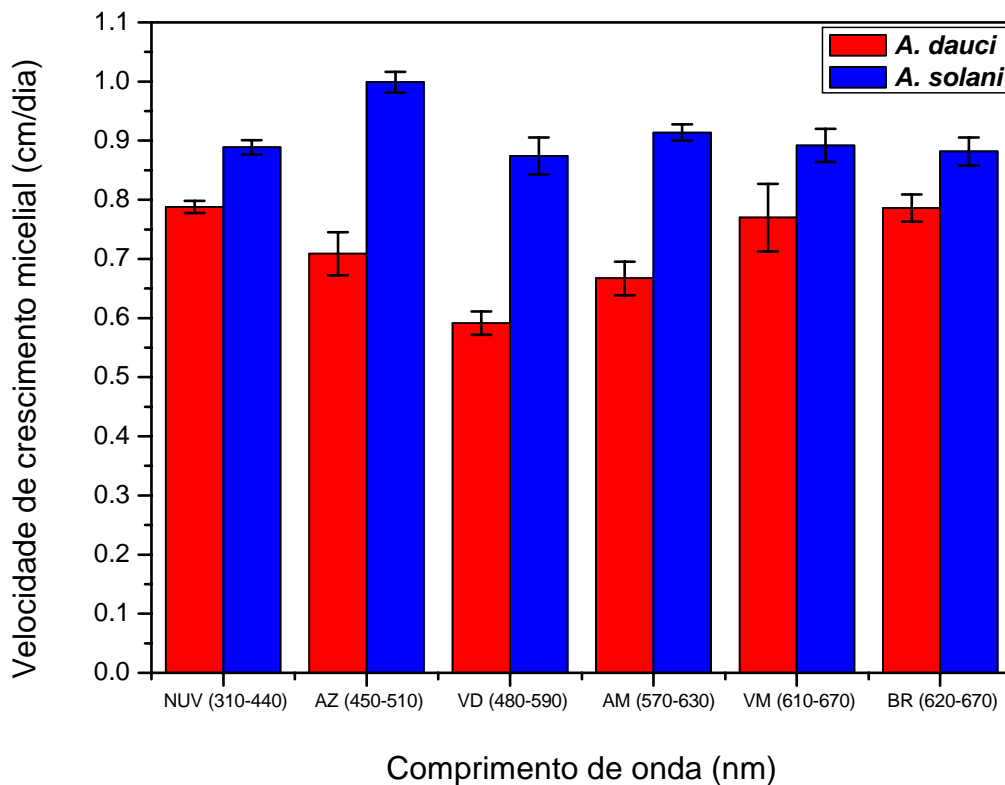


Figura 3 – Efeito de diferentes espectros de radiação no crescimento micelial de *Alternaria dauci* (isolado AD 215) e *Alternaria solani* (isolado AS 215) cultivadas em meio V8-água a 25 °C. As barras representam o erro padrão.

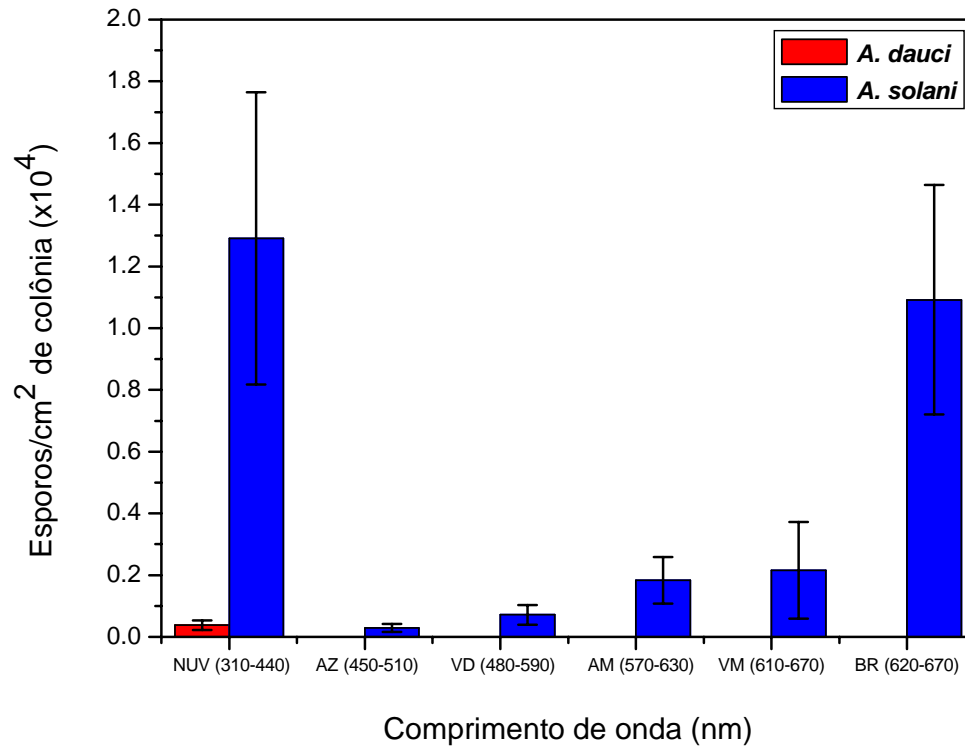


Figura 4 – Efeito de diferentes espectros de radiação na esporulação de *Alternaria dauci* (isolado AD 215) e *Alternaria solani* (isolado AS 215) cultivadas em meio V8-água a 25 °C. As barras representam o erro padrão.

### 2.3.3 Efeito de diferentes estresses da colônia na esporulação

Após a realização do experimento anterior, observou-se que o isolado AD 215 perdeu definitivamente a capacidade de esporular em meio de cultura. Após essa constatação, optou-se pela troca dos dois isolados anteriormente utilizados nos itens 2.3.1 e 2.3.2, substituindo-os pelos isolados AD 42 e AS 15.

Os resultados da determinação do ponto de inativação do micélio em função dos fatores estressantes aplicados nos isolados AD 42 e AS 15 estão exibidos nas tabelas 2, 3 e 4. De acordo com a tabela 2, os dois isolados responderam da mesma maneira à radiação de microondas em potência mínima (97,62 W). O tempo de 30 s foi o ponto onde não mais se observou crescimento micelial em nenhuma das repetições realizadas. Com isso, elegeu-se o ponto imediatamente anterior testado, 25 s, como o tempo máximo de estresse aplicado à colônia nesse tratamento.

Os resultados da aplicação de temperatura a 100 °C, como fator estressante, diferiram para as duas espécies (Tabela 3). Os pontos eleitos para o máximo estresse a ser aplicado em colônias de *A. dauci* e *A. solani* foram 5 e 4 min, respectivamente. Essa diferença entre os isolados pode ser devido às colorações características das colônias em meio de cultura, sendo as colônias de *A. dauci*, de coloração clara e as de *A. solani*, de coloração escura. Em *A. solani*, a produção de melanina (ENGLISH; GERHARDT, 1946; BELL; WHEELER, 1986), característica de algumas espécies de *Alternaria*, torna o micélio mais escurecido. A melanina também se difundiu para o meio de cultura, escurecendo-o abundantemente. Como as culturas de *A. solani* são mais escuras e estas absorvem calor mais rápido que as culturas claras, esse fator pode ter sido decisivo para a determinação do ponto de inativação micelial.

Os resultados da radiação UV na inativação micelial (Tabela 4) mostraram o mesmo comportamento de *A. dauci* e *A. solani* diante desse estresse. Macromoléculas biológicas essenciais são alvos de radiação UV, que é fortemente absorvida pelas células e ocasiona uma variedade de fotoprodutos incompatíveis com a função celular (CALDWELL et al., 1998). Acima de 20 min os danos provocados às células e os novos metabólitos acumulados impediram o desenvolvimento micelial. Com isso, elegeu-se



esse tempo para o estresse máximo das culturas de *A. dauci* e *A. solani* para os experimentos seguintes de esporulação.

Tabela 2 – Determinação do ponto de inativação micelial dos isolados AD 42 e AS 15 por radiação de microondas (Potência mínima = 97,62 W)

<b>Tempo (s)</b>	<b><i>Alternaria dauci</i></b>	<b><i>Alternaria solani</i></b>
<b>5</b>	+	+
<b>10</b>	+	+
<b>15</b>	+	+
<b>20</b>	+	+
<b>25</b>	+	+
<b>30</b>	-	-

+ Micélio ativo

- Micélio inativo

Tabela 3 - Determinação do ponto de inativação micelial dos isolados AD 42 e AS 15 por temperatura de 100 °C

<b>Tempo (min)</b>	<b><i>Alternaria dauci</i></b>	<b><i>Alternaria solani</i></b>
<b>1</b>	+	+
<b>2</b>	+	+
<b>3</b>	+	+
<b>4</b>	+	+
<b>5</b>	+	-
<b>10</b>	-	-
<b>15</b>	-	-
<b>20</b>	-	-

+ Micélio ativo

- Micélio inativo

Tabela 4 - Determinação do ponto de inativação micelial dos isolados AD 42 e AS 15 por radiação UV

Tempo (min)	<i>Alternaria dauci</i>	<i>Alternaria solani</i>
2	+	+
5	+	+
10	+	+
15	+	+
20	+	+
30	-	-
40	-	-
50	-	-
60	-	-

+ Micélio ativo

- Micélio inativo

Os resultados da figura 5 exibem a esporulação dos isolados AD 42 e AS 15 após indução da esporulação da colônia por radiação de microondas, temperatura de 100 °C e radiação UV, nos tempos anteriormente eleitos e expostos nas tabelas 2, 3 e 4, além do processo de raspagem do micélio aéreo.

*Alternaria dauci* (isolado AD 42) sofreu influência mais marcante da raspagem do micélio aéreo, a qual proporcionou a maior esporulação. O tratamento com luz UV também teve grande influência na esporulação desta espécie, mas não diferiu do tratamento com microondas. O tratamento com temperatura a 100 °C foi o fator estressante que apresentou a menor influência na esporulação do isolado AD 42.

*Alternaria solani* (isolado AS 15) apresentou comportamento diferenciado de *A. dauci*. A raspagem do micélio aéreo também foi o tratamento que teve maior influência na esporulação, diferindo dos demais tratamentos. No entanto, o tratamento com microondas e com temperatura a 100 °C também mostrou ter certa influência na esporogênese de *Alternaria solani*. Contudo, a utilização de luz UV como fator

estressante para indução da esporulação no isolado AS 15 teve uma influência negativa, não levando à produção de esporos.

A raspagem do micélio aéreo predominou sobre os outros tipos de estresses aplicados, promovendo maior esporulação nos dois isolados. O crescimento micelial abundante restringe ou inibe a esporulação (Klebs, 1900, apud ROTEM, 1998). Por esse motivo, a remoção do micélio aéreo é sugerida nesse estudo como o fator estressante de maior influência na esporulação das duas espécies.

A literatura sobre *Alternaria* relata diferentes estresses aplicados *in vitro* à colônia, com a intenção de induzir a esporulação. A exploração do conhecimento que se obteve nos estudos de esporulação *in vivo* com *Alternaria* foi adaptada para condições laboratoriais, fazendo com que novas metodologias pudessem ser desenvolvidas para induzir ou aumentar a produção de esporos em várias espécies de *Alternaria*, especialmente as que requerem indução externa para que a esporulação ocorra. Esses métodos são preconizados por muitos autores, e envolvem a manipulação da iluminação (SHABANA; ELWAKIL; CHARUDATTAN, 2001; LEACH, 1962; FOURTOUNI; MANETAS; CHRISTIAS, 1998), nutrição (BASHI; ROTEM, 1975; COHEN; ROTEM, 1970), estresse hídrico (ROTEM; COHEN; BASHI, 1978), temperatura (HUMPHERSON-JONES; PHELPS, 1989; ZIMMER; McKEEN, 1969) e umidade (STRANDBERG, 1977; WAGGONER; HORSFALL, 1969 apud ROTEM, 1998).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem a possibilidade de utilização de fatores estressantes menos comuns na esporulação de alternárias, como radiação de microondas, luz UV e alta temperatura. Em estudos posteriores, esses fatores poderiam ser aliados à raspagem do micélio aéreo, para talvez produzir uma esporulação mais profusa.

A complexidade e interdependência dos processos metabólicos podem fazer com que os resultados desse tipo de estudo sejam diferentes, dependendo da espécie de trabalho. A ausência de esporulação em *A. solani* após aplicação de radiação UV (Figura 5) ilustra essa situação.

A luz UV, quando não provoca a morte celular ou mudanças genéticas permanentes, pode promover mudanças metabólicas como alteração na atividade enzimática, permeabilidade da membrana, transporte de íons ou no metabolismo do

fosfato (POMPER; ATWOOD, 1955; POMPER, 1965). Há uma relação muito tênue entre os efeitos da luz UV na esporulação e o efeito danoso desse tipo de radiação em ácidos nucleicos, ainda o principal alvo dos efeitos metabólicos. A resistência de espécies de *Alternaria* à luz UV, principalmente *A. solani*, é citada por vários autores (ROTEM; WOODING; AYLOR, 1985; SUSSMAN, 1968). Além disso, o máximo efeito é exercido por comprimentos de onda ao redor de 260 nm, região do UV-C, de acordo com o Manual Philips de Iluminação (1981), muito próximo ao comprimento da luz ultravioleta utilizado nesse estudo (Anexo B). Esse tipo de radiação pode ter afetado uma série de processos bioquímicos que podem ter sido inativados temporária ou permanentemente que, apesar de não terem influenciado o crescimento micelial, como observado na determinação do ponto de inativação micelial (Tabela 4), teve grande influência na esporogênese.

O tratamento com microondas tem relação direta com a temperatura, pois a agitação das moléculas de água do meio e das células aumenta muito a temperatura da colônia em curto período de tempo. Cochrane (1958) assumiu que a reprodução é iniciada por fatores que paralisam repentinamente o crescimento do micélio previamente estabelecido, sem envenenar o metabolismo. Apesar do fator temperatura, o curto tempo de inativação obtido pode ter relação com outros fatores inerentes à colônia, como ter alterado alguma ligação entre moléculas presentes nas hifas ou mesmo a estrutura molecular de alguma substância importante para o processo de esporogênese.

Watson (1990) relata que fungos com crescimento ativo são mais sensíveis do que aqueles em fase estacionária ou estágio de esporo. Além disso, exposição a condição estressante não muito ofensiva pode aumentar a resistência do fungo a condições ainda mais estressantes. Essa adaptação é devido à formação de grupos específicos de proteínas "heat-shock" (HSP) que respondem a pequenas elevações de temperatura ou mesmo a diferentes estresses, como introdução de etanol, metais pesados, antibióticos e antimetabólitos ao meio de cultura. Contudo, um modelo funcional para explicar a sua participação na tolerância a muitos estresses não foi desenvolvido (GRIFFIN, 1994).

Os resultados desse estudo propõem que o curto período de exposição observado para os isolados foi suficiente para provocar morte de apenas parte das células do micélio e causar estresse em outras.

No entanto, não houve grande estímulo desse fator na esporulação de ambas as espécies. A temperatura de trabalho pode não ter afetado a viabilidade do micélio, mas segundo Lehninger (2000), algumas enzimas essenciais podem ser desnaturadas em altas temperaturas ou ter sua conformação alterada e, *in vitro*, podem não retomar sua atividade metabólica normal. Isso pode ter afetado drasticamente a esporulação.

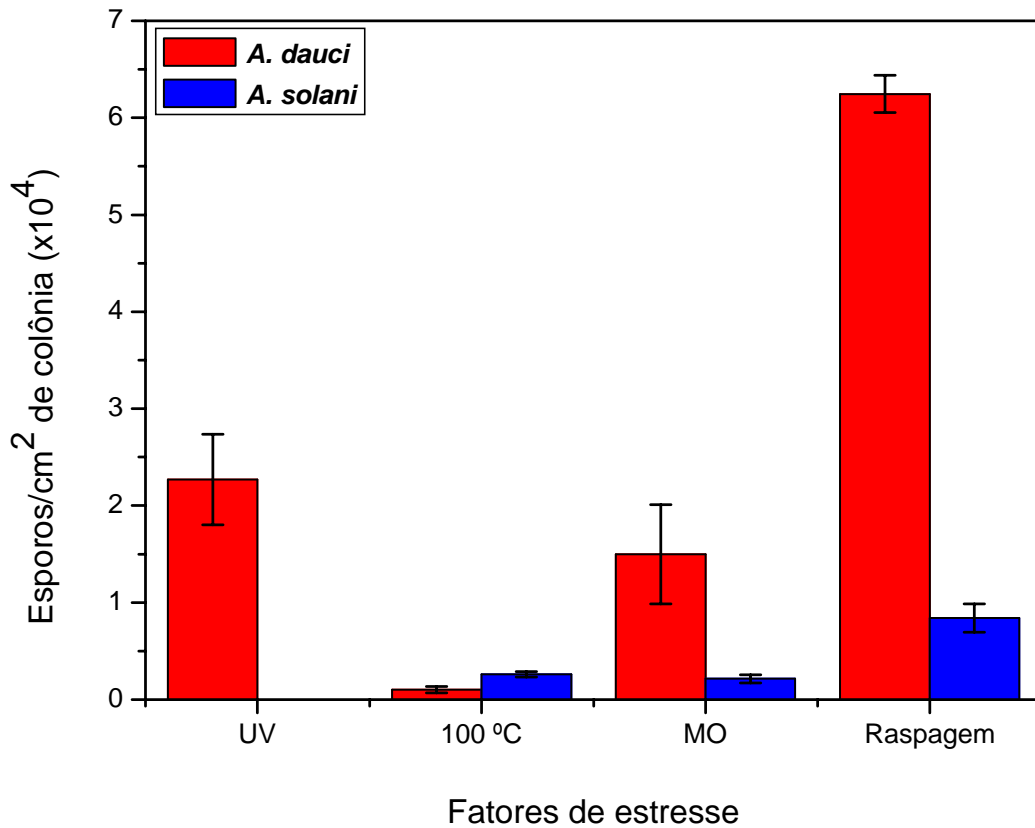


Figura 5 - Efeito de diferentes estresses da colônia na esporulação de *Alternaria dauci* (isolado AD 42) e *Alternaria solani* (isolado AS 15) cultivadas em meio V8-ágar, a 25 °C e sob luz NUV. As barras representam o erro padrão.

#### 2.3.4 Efeito do fotoperíodo aplicado após o estresse da colônia na esporulação

Os resultados da esporulação de *Alternaria dauci* (isolado AD 42) estão expostos na figura 6. Apesar dos diferentes fotoperíodos terem influenciado de maneira diferenciada a esporulação de *A. dauci*, não foi observada produção de esporos em nenhum dos tratamentos aplicados à *A. solani*. Esse isolado provavelmente perdeu a capacidade de esporular, assim como aconteceu com *A. dauci* (isolado AD 215) em experimento anterior, conforme se verifica na figura 4, item 2.3.2. A perda da capacidade esporulante de isolados de *Alternaria dauci* e *A. solani* após curto período em cultura ou única passagem por um meio de cultura (ROTEM, 1998; ZIMMER; McKEEN, 1969) se constitui num dos maiores entraves para os estudos de esporulação, pois quando isso acontece e a capacidade de esporular não é retomada, os isolados do estudo devem ser trocados. Os resultados da figura 5, citados no experimento anterior, mostram uma esporulação mais reduzida de *A. solani* em relação à de *A. dauci*, indicando que o isolado já vinha apresentando problemas referentes à capacidade de esporular.

O fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro foi o que mais influenciou no processo de esporulação de *Alternaria dauci*. Quando houve diminuição das horas de luz para 7 h e 2 h, também houve uma expressiva esporulação, mas esses dois tratamentos não diferiram entre si. O tratamento com 22 h luz / 2 h escuro foi o que teve menor influência na esporulação. As placas que foram submetidas apenas a 24 h de luz ou 24 h de escuro não esporularam.

O processo de formação dos conidióforos e dos conídios pode ser analisado independentemente. Em espécies de *Alternaria* que produzem esporos grandes e solitários e requerem indução externa para que a esporulação ocorra, como em *A. dauci* e *A. solani*, os conidióforos são formados sob luz (fase indutiva) e os conídios no escuro (fase terminal).

Ainda há muita discrepância acerca da esporulação dessas espécies, mas este estudo evidenciou o papel do fotoperíodo na esporulação. Não há, contudo, períodos de luz e escuro adequados preconizados na literatura. O que se observa (LUKENS, 1960; LEACH, 1962; ZIMMER; McKEEN, 1969; DOUGLAS, 1972; FANCELLI; KIMATI, 1990;

TEIXEIRA et al., 2001) é que cada estudo avalia uma condição diferente e estabelece, para o isolado de trabalho, a condição mais efetiva para a esporulação. Mas, conforme observado nos resultados da figura 6, é nítido o efeito negativo de muitas horas de luz em detrimento das horas de escuro no processo de esporulação. Nos tratamentos de 17 h e 22 h de luz, verificou-se diminuição progressiva da produção de esporos. Conforme os resultados observados, este estudo preconiza a utilização do fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro para estudos de esporulação de espécies de *Alternaria* que requerem esse tipo de indução.

Em estudos de Lukens e Horsfall (1969), culturas que foram mantidas no escuro começaram a esporular após terem sido expostas a luz por pouco tempo. No entanto, a produção de esporos só ocorreu após 3 horas de incubação no escuro e continuaram a produzir esporos por um período de até 16 horas. Um período de escuro mais prolongado é mais importante no processo de esporulação que um longo período de luz.

Os resultados obtidos nesse estudo são sustentados pelos estudos de Lukens e Horsfall (1969) que sugerem que a colônia precisa de um período muito pequeno de luz para induzir a formação dos conidióforos em micélios estressados. Após iniciada a produção de conidióforos, estes parecem ser capazes de terminar seu desenvolvimento no escuro e logo após começar a se diferenciar e produzir esporos. Isso pode ser claramente observado quando se compara a produção de esporos no tratamento com 12 h luz / 12 h escuro com o tratamento de 2 h luz / 22 h escuro. Contudo, Rotem (1998) sustenta que conidióforos também podem ser produzidos no escuro, mas tornam-se mais típicos e pigmentados quando expostos à luz. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo não corroboram essa hipótese. Na verdade, não há um consenso sobre o efeito da luz na formação dos conidióforos. Mas a importância do período de escuro para a conclusão do processo de esporulação tem sido extensamente descrita na literatura.

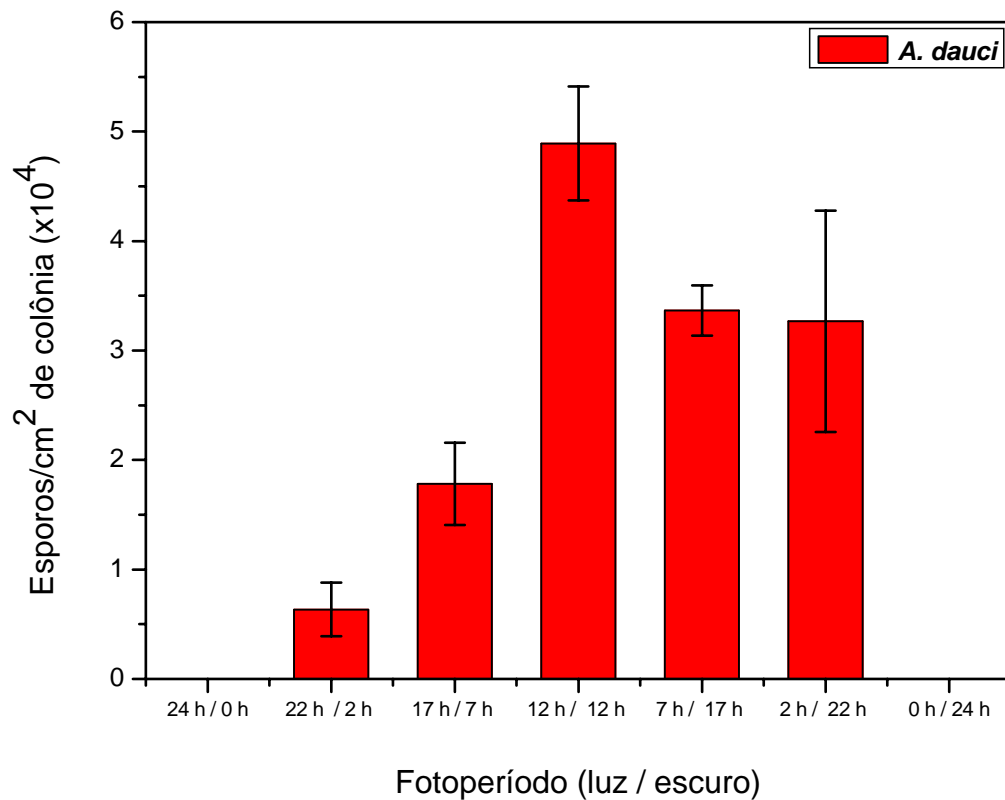


Figura 6 – Efeito do fotoperíodo na esporulação após estresse da colônia por raspagem do micélio aéreo de *Alternaria dauci* (isolado AD 42) cultivada em meio V8-ágar, a 25 °C e sob luz NUV. As barras representam o erro padrão.

### 2.3.5 Comparação entre o método tradicional e o desenvolvido neste estudo, para diferentes isolados de *Alternaria dauci* e *A. solani*

Em função dos resultados anteriores, elegeram-se, como melhores condições para crescimento micelial e esporulação de *A. dauci* e *A. solani*, o meio V8-ágar, incubação em temperatura de 25 °C, radiação NUV e estresse da colônia por raspagem de micélio aéreo. Este procedimento foi comparado com o tradicional, no qual as



colônias foram incubadas em meio BDA, temperatura de 25 °C, radiação emitida por luz branca e passaram por raspagem do micélio aéreo.

O comportamento dos diferentes isolados de *Alternaria dauci* e *A. solani* em relação ao crescimento e esporulação foi altamente diferenciado para os dois procedimentos avaliados (Figuras 7 e 8).

O crescimento micelial dos isolados de *A. dauci*, de maneira geral, apresentou velocidade mais acelerada que os isolados de *A. solani*. Na maioria dos isolados, a metodologia desenvolvida apresentou um efeito mais marcante que a tradicional.

A metodologia desenvolvida neste trabalho apresentou excelentes resultados também no que se refere à esporulação de ambas as espécies. Para os isolados que apresentaram esporulação pelo método tradicional, o novo método proporcionou incrementos bastante significativos. Além disso, induziu a esporulação de isolados que não esporularam ou apresentaram precária esporulação pelo método tradicional (Figura 8). Contudo, a resposta de esporulação foi muito variável, em função do isolado considerado, demonstrando a grande variabilidade para este fator nas espécies estudadas. A esporulação dos isolados de *A. dauci*, em especial, foi altamente inibida pelo procedimento tradicional. Houve, entretanto, alguns isolados que não esporularam em nenhum dos procedimentos.

A grande variação da velocidade de crescimento e esporulação dos isolados entre os procedimentos ilustra o comportamento diferenciado e problemático observado em estudos desenvolvidos com essas espécies de *Alternaria* em meio de cultura.

De acordo com os dados desse estudo, não foi possível estabelecer uma relação direta entre vigor micelial e quantidade de esporos produzidos. Em alguns isolados, como no AS 03, a alta taxa de crescimento observada na metodologia desenvolvida não proporcionou grande esporulação quanto comparada com os outros isolados. No entanto, o isolado AD 42 apresentou uma alta taxa de crescimento micelial e também uma profusa esporulação. Essas observações são contrárias às determinadas pela Lei de Klebs, o qual alega que a inanição induz a esporulação. Como todas as colônias foram raspadas e submetidas à mesma condição de luz, era esperado que a esporulação do isolado AD 42 fosse menos expressiva.

A partir dos resultados obtidos nesse experimento, fica nítido que o conjunto de condições empregadas para a esporulação neste trabalho foi mais eficaz que a metodologia tradicional, para a grande maioria dos isolados estudados. A utilização da luz NUV como fator altamente indutor da esporulação, conforme preconizada por (LEACH, 1960), foi corroborada com esses experimentos.

Os resultados observados nesse experimento validam os dados anteriormente obtidos (Figuras 1 e 2) e comprovam a eficiência do meio V8-ágar e da luz NUV para estudos de crescimento e esporulação *in vitro* com essas espécies de *Alternaria*. No entanto, o efeito mais importante observado decorre da interação meio e luz, pois, conforme figura 4, luz branca e NUV não diferiram na indução da esporulação quando as culturas cresceram em meio V8-ágar. A utilização do meio BDA e luz branca, ainda citada por muitos autores por proporcionarem as melhores condições para o crescimento e esporulação de várias espécies de *Alternaria*, deveria ser revista, pois, para essas espécies, verificou-se que a potencialização do método empregado no crescimento e esporulação decorreu da interação do tipo de meio e luz empregados na incubação.

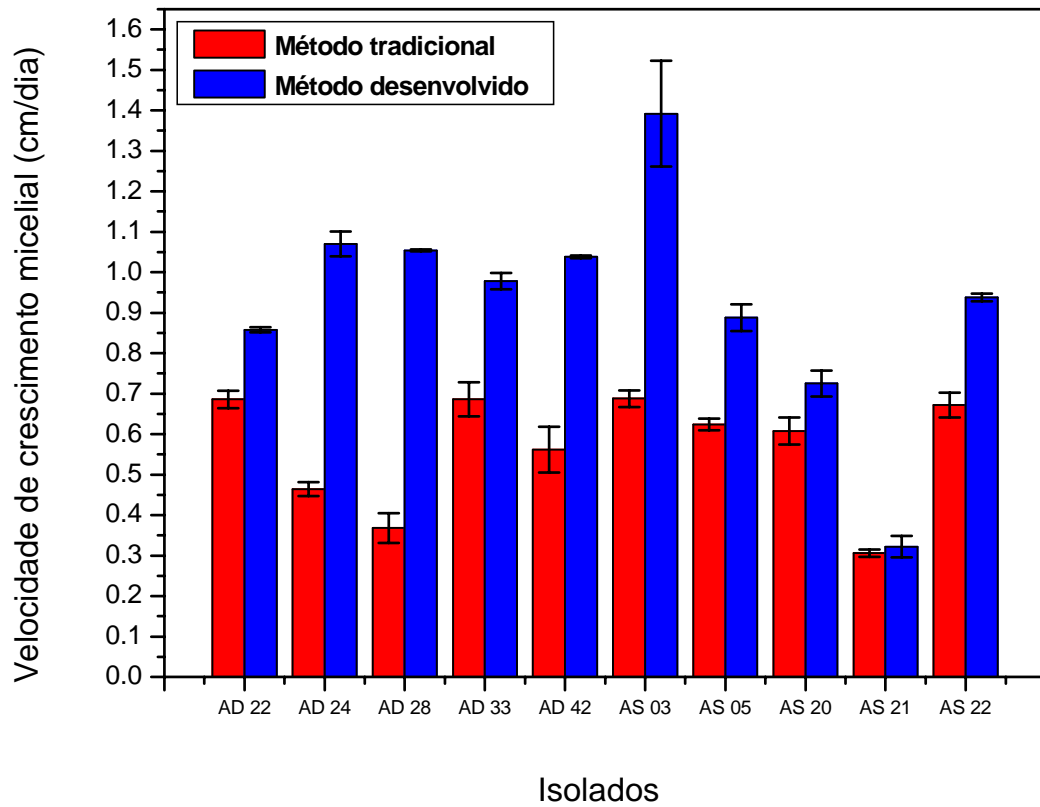


Figura 7 – Efeito da metodologia tradicional frente à desenvolvida, no crescimento micelial de isolados de *Alternaria dauci* e *Alternaria solani* cultivados em meio V8-ágar, a 25 °C e sob luz NUV. As barras representam o erro padrão.

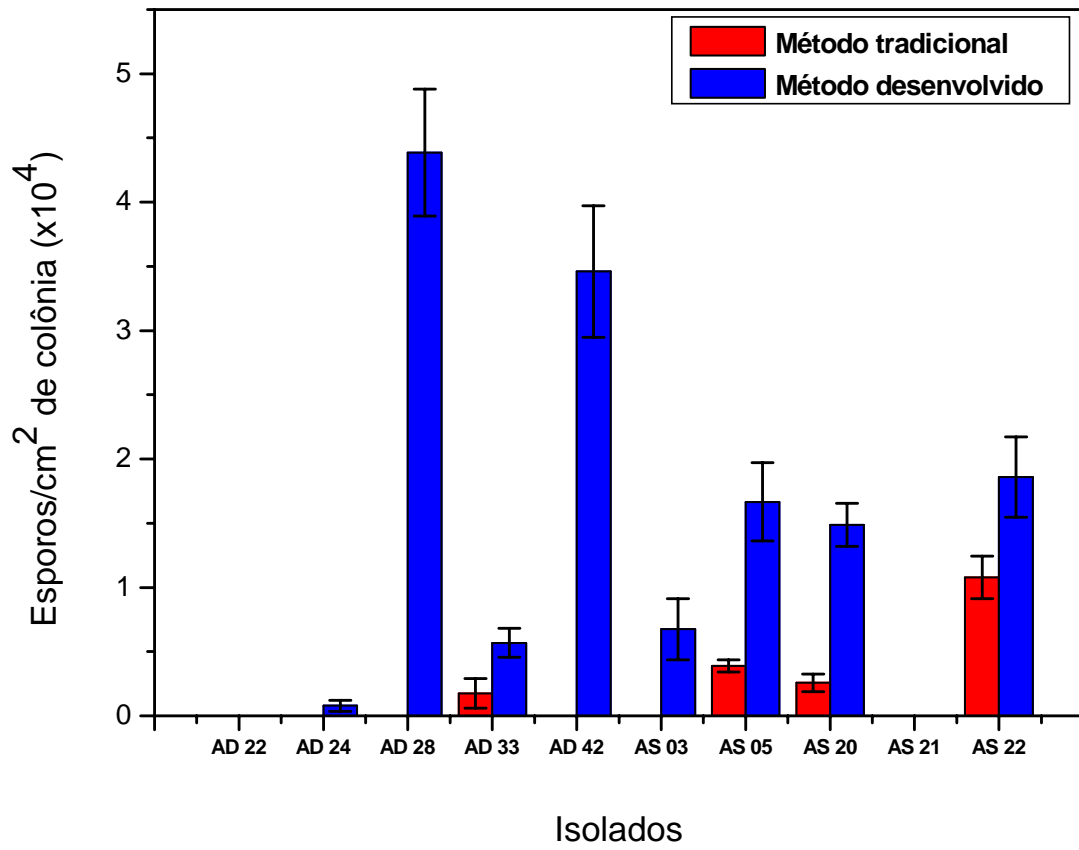


Figura 8 – Efeito da metodologia tradicional frente à desenvolvida, na esporulação após estresse da colônia por raspagem do micélio aéreo de isolados de *Alternaria dauci* e *Alternaria solani* cultivados em meio V8-ágar, a 25 °C e sob luz NUV. As barras representam o erro padrão.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isolados de *A. dauci* e *A. solani* apresentaram crescimento micelial mais acelerado em torno de 25 °C e em meio V8-ágar.

O comprimento de onda da luz utilizada na incubação não apresentou efeitos muito pronunciados no crescimento micelial. Para *A. solani* houve pequeno estímulo do crescimento proporcionado pela luz azul, enquanto que *A. dauci* sofreu pequeno efeito negativo da luz verde. Em contrapartida, a esporulação foi extremamente influenciada pela luz, destacando-se o efeito estimulante das luzes NUV e branca e o efeito negativo da luz azul.

A remoção do micélio aéreo dos isolados foi essencial para que houvesse grande produção de esporos, mas outros fatores estressantes e indutores da esporulação, como exposição das colônias à radiações UV e de microondas, também apresentaram resultados consideráveis.

A subsequente exposição das colônias estressadas a intervalos de luz seguidos de escuro foi necessária para que os conídios se desenvolvessem. Períodos de escuro iguais ou mais longos que os períodos de luz proporcionaram maior produção de conídios.

Os isolados de *A. dauci* e *A. solani* utilizados apresentaram comportamentos bastante diferenciados entre si no que se refere ao crescimento e, principalmente, esporulação em meio de cultura. A perda da capacidade de esporular de alguns isolados e a não esporulação de outros exemplificou o comportamento peculiar e problemático dessas espécies de *Alternaria*. Entretanto, o conjunto de procedimentos visando à esporulação, desenvolvido neste trabalho, que consistiu em utilização de meio V8-ágar, temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 12 h luz NUV / 12 h de escuro e raspagem do micélio aéreo, sempre proporcionou resultados superiores ao método tradicional, que utilizava meio BDA e luz branca. Este método, inclusive, induziu esporulação em alguns isolados que não esporularam pelo método tradicional.

Dessa forma, sugere-se que o procedimento para esporulação desenvolvido neste estudo seja utilizado em trabalhos que requerem grandes quantidades de

esporos, como, por exemplo, as inoculações artificiais para seleção de genótipos resistentes.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, H. K.; EGLEY, G. H.; PAUL, R. N. Effect of conidia production temperature on germination and infectivity of *Alternaria helianthi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 6, p. 677-690, 1995.

ALLEN, S. J.; BROWN, J. F.; KOCHMAN, J. K. Effects of temperature, dew period and light on the growth and development of *Alternaria helianthi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 6, p. 893-896, 1983a.

\_\_\_\_\_. Production of inoculum and field assessment of *Alternaria helianthi* on sunflower. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 6, p. 665-668, 1983b.

ARAGAKI, M. Quality of radiation inhibitory to sporulation of *Alternaria tomato*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 52, p. 1227, 1962.

\_\_\_\_\_. Radiation and temperature interaction on the sporulation of *Alternaria tomato*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 51, p. 803-805. 1961.

ÁVILA, Z. R. de; MELLO, S. C. M. de; RIBEIRO, Z. M. de A; FONTES, E. M. G. Produção de inóculo de *Alternaria cassiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 533-541, mar. 2000.

BASHI, E.; ROTEM, J. Host and biotic factors affecting sporulation of *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* on tomatoes and of *Alternaria porri* f. sp. *solani* on potatoes. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 3, p. 27-28, 1975.

BEECHER, F. S. Light and composition of media as factors inducing sporulation in strains of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 35, p. 483. 1945. Abstract.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 411-451, 1986.

BLANCARD, D. **Enfermedades del tomate**: observar, identificar, luchar. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 212 p.

CALDWELL, M. M.; BJÖRN, L. O.; BORNMAN, J. F.; FLINT, S. D.; KULANDAIVELU, G.; TERAMURA, A. H.; TEVINI, M. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 46, p. 40-52, 1998.

CAMPANHA, N. H. **Efeito da irradiação com microondas sobre células de *Candida albicans***. 2005. 159 p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

CHARLTON, K. M. The sporulation of *Alternaria solani* in culture. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 36, p. 349-335, 1953.

COCHRANE, V. W. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley e Sons, 1958. 524 p.

COHEN, Y.; ROTEM, J. The relationship of sporulation to photosynthesis in some obligatory and facultative parasites. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, p. 1600-1604. 1970.

COTTY, P. J.; MISAGHI, I. J. Effect of light on the behavior of *Alternaria tagetica* *in vitro* and *in vivo*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, p. 366-370, 1985.

DAHLBERG, K. R.; VAN ETTEN, J. L. Physiology and biochemistry of fungal sporulation. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 20, p. 281-301. 1982.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. 2nd ed. Boca Ratom: Lewis Publishers, 1985. 442p.

DIENER, U. L. A method for inducing abundant sporulation of *Stemphylium solani* in pure culture. **Phytopathology**, St. Paul, v. 42, p. 7. 1952. Abstract.

DIFCO LABORATORIES. **Difco manual**: dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10th ed. Michigan, 1984. 1202 p.

DOUGLAS, D. R. The effect of light and temperature on the sporulation of different isolates of *Alternaria solani*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, p. 629-634, 1972.



ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 607 p.

ELLIS, M. B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507 p.

ENGLISH, H.; GERHARDT, F. The effect of ultraviolet on the viability of fungus spores and on the development of decay in sweet cherries. **Phytopathology**, St. Paul, v. 36, p. 100-111, 1946.

FANCELLI, M. I. **Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *A. solani* f. sp. *lycopersici* N. F.** 1991. 80 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

\_\_\_\_\_. **Ocorrência de adaptabilidade de linhagens de *Alternaria dauci* (Kühn) Groves e Skolko resistentes ao fungicida iprodione.** 1987. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

FANCELLI, M. I.; KIMATI, H. Influência de meios de cultura e de luz fluorescente na esporulação de *Alternaria dauci*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 16, p. 248-252, dez. 1990.

FERRISS, R. S. Effects of microwave oven treatment on microorganisms in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 1, p. 121-126. 1984.

FOURTOUNI, A.; MANETAS, Y.; CHRISTIAS, C. Effects of UV-B radiation on growth, pigmentation and spore production in the phytopathogenic fungus *Alternaria solani*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n.12, p. 2093-2099, 1998.

GIBSON, F.; FOX, F. M.; DEACON, J. W. Effects of microwave treatment of soil on growth of birch (*Betula pendula*) seedlings and infection of them by ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Lancaster, v. 108, p. 189-204, 1988.

GOMES-OLIVEIRA, I.; MATSUMURA, A. T. S. Técnica de obtenção de filtrados de cultura de *Alternaria solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 102, mar. 2001.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. 2. ed. New York: Willey-Liss, 1994. 456 p.

HAWKER, L. E. Environmental influences on reproduction. In: AINSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A. S. (Ed.). **The fungi**. New York: Academic Press, 1966. V. 2. p. 435-469.

HONDA, Y.; NEMOTO, M. An action spectrum for photoinhibition of conidium formation in the fungus *Alternaria solani*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, p. 2865-2871, 1984.

HOTCHKISS, E. S.; BAXTER, L. W. Jr. Pathogenicity of *Alternaria tagetica* on tagetes. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, p. 1288-1290, 1983.

HUMPHERSON-JONES, F. M.; PHELPS, K. Climatic factors influencing spore production in *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 114, p. 449-458, 1989.

KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. Monitoring and predicting parameters in microwave dissolution. In: JASSIE, L. B.; KINGSTON, H. M. (Ed). **Introduction to microwave sample preparation: theory and practice**. Washington: ACS, 1988. p. 93-154.

KUMAGAI, T. Blue and near-ultraviolet reversible photoreaction in the induction of fungal conidiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 35, p. 123-125, 1982.

KUMAGAI, T.; ODA, Y. Blue and near ultraviolet reversible photoreaction in conidial development of the fungus *Alternaria tomato*. **Development, Growth e Differentiation**, Oxford, v. 11, p. 130-142, 1969.

KUMAGAI, T.; YOSHIOKA, N.; ODA, Y. Further studies on the blue and near ultraviolet reversible photoreception with an intracellular particulate fraction of the fungus, *Alternaria tomato*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, Amsterdam, v. 421, p. 133-140, Jan. 1976.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. V. 2, cap. 67, p. 607-626.

LACY, M. L.; BRIDGMAN, G. H. Potato-dextrose agar prepared from dehydrated mashed potatoes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 52, p. 173, 1962.

LANGENBERG, W. J.; SUTTON, J. C.; GILLESPIE, T. J. Relation of weather variables and periodicities of airborne spores of *Alternaria dauci*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 879-883, 1977.

LEACH, C. M. Interaction of near-ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Stemphylium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 45, p. 1999-2016, 1967.

\_\_\_\_\_. Phytopathogenic and saprophytic fungi associated with forage legume seed. **Pant Disease Reporter**, Beltsville, v. 44, n. 5, p. 364-369, 1960.

\_\_\_\_\_. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 43, n. 2, p. 185-200, Feb. 1965.

\_\_\_\_\_. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 40, p. 151-161, 1962.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 840 p.

LEITE, R. M. V. B. C.; AMORIM, L. Influência da temperatura e do molhamento foliar no monociclo da mancha de *Alternaria* em girassol. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 193-200, abr. 2002.

LUDWIG, R. A.; RICHARDSON, L. A.; UNWIN, O. H. A method for inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. **Canadian Plant Disease Survey**, Saskatoon, v. 42, p. 149-150, 1962.

LUKENS, R. J. Conidial production from filter paper cultures of *Helminthosporium vagans* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**, St. Paul v. 50, p. 867-868. 1960.

\_\_\_\_\_. Photo-inhibition of sporulation in the *Alternaria solani*. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 50, p. 720-724. 1963.

\_\_\_\_\_. Reversal by red light of blue light inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 55, p. 1032, 1965.

LUKENS, R. J.; HORSFALL, J. G. Processes of sporulation in *Alternaria solani* and their response to metabolic inhibitors. **Phytopathology**, St. Paul, v. 63, p. 176-182, 1973.

\_\_\_\_\_. Spores initiation in *Alternaria solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, p. 1039, 1969. Abstract.

MANUAL Philips de iluminação. Eindhoven, 1981. 319 p.

MASSOLA JÚNIOR, N. M.; MARTINS, M. C.; GIÓRIA, R.; JESUS JÚNIOR, W. C. Doenças da cenoura. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. V. 2, cap. 25, p. 223-225.

McCALLAN, S. E.; CHAN, S. Y. Inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. **Contributions from the Boyce Thompson Institute for Plant Research**, Yonkers, v. 13, p. 323-335, 1944.

MILLER, P. M. V-8 juice agar as a general-purpose media for fungi and bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 45, p. 461-462, 1955.

NEERGAARD, P. **Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium***. London: Oxford University Press, 1945. 560 p.

NETZER, D.; KENNETH, R. G. Persistence and transmission of *Alternaria dauci* (Kühn) Groves e Skolko in the semi-arid conditions of Israel. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 63, p. 289-294. 1969.

POMPER, S. Effects of radiation. In: AINSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A. S. (Ed.). **The fungi**. New York: Academic Press, 1965. V. 1, p. 575-597.

POMPER, S.; ATWOOD, K. C. Radiation studies on fungi. In: HOLLAENDER, A. (Ed.). **Radiation biology**. New York: McGraw-Hill, 1955. V. 11, p. 431-453.

QUEIROZ, F. M.; BATISTA, U. G.; BROMMNSCHENKEL, S. H. Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de *Alternaria brasiliensis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 541-543, Oct. 2004.

RANDS, R. D. The production of spores by *Alternaria solani* in pure culture. **Phytopathology**, St. Paul, v. 7, p. 316-317, 1917.

RATH, G. C.; PADHI, N. N. Factors influencing the photo-induction of sporulation in *Alternaria solani*. **Review of Plant Pathology**, Surrey, v. 54, p. 230, 1975. Abstract.

RODIGIN, V. M. Early leaf spot of tomato in the Kharlov region. **Review of Plant Pathology**, Surrey, v. 59, p. 462, 1980. Abstract.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria***: biology, epidemiology and pathogenicity. 2nd ed. St. Paul: APS Press, 1998. 326 p.

ROTEM, J.; BASHI, E. Induction of sporulation of *Alternaria porri* f. sp. *solani* by inhibition of its vegetative development. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 53, p. 433-439, 1969.

ROTEM, J.; COHEN, Y.; BASHI, E.; Host and environmental influences on sporulation *in vivo*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 16, p. 83-101, 1978.

ROTEM, J.; WOODING, B.; AYLOR, D. E. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, p. 510-514, 1985.

SHABANA, Y. M.; ELWAKIL, M. A.; CHARUDATTAN, R. Effect of nutrition and physical factors on micelial growth and production of pigments and nonchromatic UV-absorbing compounds of *Alternaria eichhorniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 21-27, 2001.

SHAHIN, E. A.; SHEPARD, J. F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, p. 618-620, 1979.

SILVA, M. M. **Efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de próteses totais**. 2005. 140 p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2005.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* taxonomy: currents status, viewpoint, challenge. In: Chelkowski, J. e Visconti, A. C. J. (Ed.). **Alternaria: biology, plant diseases e metabolites**. Amsterdam Elsevier, p. 1-35, 1992.

SING, U. P.; SINGH, S. K.; SARMA, B. K. Time-dependent sporulation, conidial size and germ tube formation in *Alternaria tenuissima* (Kunze ex Pers.) Wiltshire on different media. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 413-416, 2000.

SOUZA, R. T.; FORCELINI, C. A.; REIS, E. M.; CALVETE, E. O. Frequência de *Alternaria dauci* e *Cercospora carotae* como agentes da queima das folhas da cenoura em passo fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 614-618, 2001.

SOYLU, S.; KURT, S.; SOYLU, E. M.; TOK, F. M. First report of *Alternaria* leaf blight caused by *Alternaria dauci* on carrot in Turkey. **New Disease Reports**, Cambridge, v. 10, p. 51, jan. 2005.

SPILEDE, L. A. Navy bean seed vigor and field performance in relation to microwave radiation. **Agronomy Journal**, Madison, v. 79, p. 827-830. 1987.

STEVENSON, R. E.; PENNYPACKER, S. P. Effect of radiation, temperature and moisture on conidial germination of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, p. 926-930, 1988.

STRANDBERG, J. O. Spore production and dispersal of *Alternaria dauci*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 1262-1266, 1977.

\_\_\_\_\_. Isolation, storage and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, p. 1008-1012, 1987.

SUSSMAN, A. S. Longevity and survivability of fungi. In: AINSWORTH, C. C.; SUSSMAN, A. S. (Ed.). **The fungi: an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1968. V. 3, p. 447-486.

TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L. G.; ARIAS, S. M. S.; MACHADO, J. C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1314-1320, 2001.

TORRES, M. R.; RAMOS, A. J.; SOLER, J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, p.185-193, Mar. 2003.

TRIONE, E. J.; LEACH, C. M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, p. 1077-1083, 1969.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239 p.

TURIAN, G. Sporogenesis in fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 129-137, 1974.

VAKALOUNAKIS, D. J.; CHRISTIAS, C. Sporulation in *Alternaria cichorii* is controlled by a blue and near-ultraviolet reversible photoreaction. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, p. 626-628, 1981.

VALSECHI, O. A. **Efeito da radiação de microondas sobre *Lactobacillus fermentum* linhagens: CCT4143; CCT4145; CCT4146 e FT038B**. 2005. 101 p. Doutorado (Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. 2005.

VINTAL, H., BEN-NOON, E.; SHLEVIN, E.; YERMIYAHU, U.; SHTIENBERG, P.; DINOOR, A. Influence of rate of soil fertilization on alternaria leaf blight (*Alternaria dauci*) in carrot. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 27, n. 3, p. 01-08. 1999.

WALKER, H. L. Seedling blight of sicklepod caused by *Alternaria cassiae*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 66, n. 5, p. 426-428, 1982.

WATSON, K. Microbial stress proteins. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 31, p. 183-223, 1990.

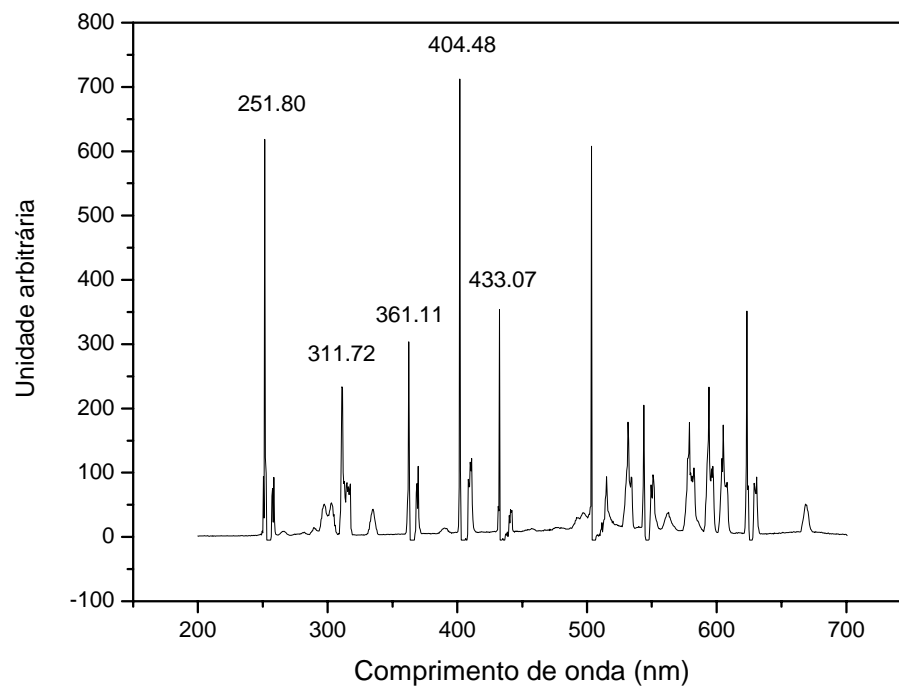
ZIMMER, R. C.; McKEEN, W. E. Interaction of light and temperature on sporulation of the carrot foliage pathogen *Alternaria dauci*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, p. 743-749, 1969.



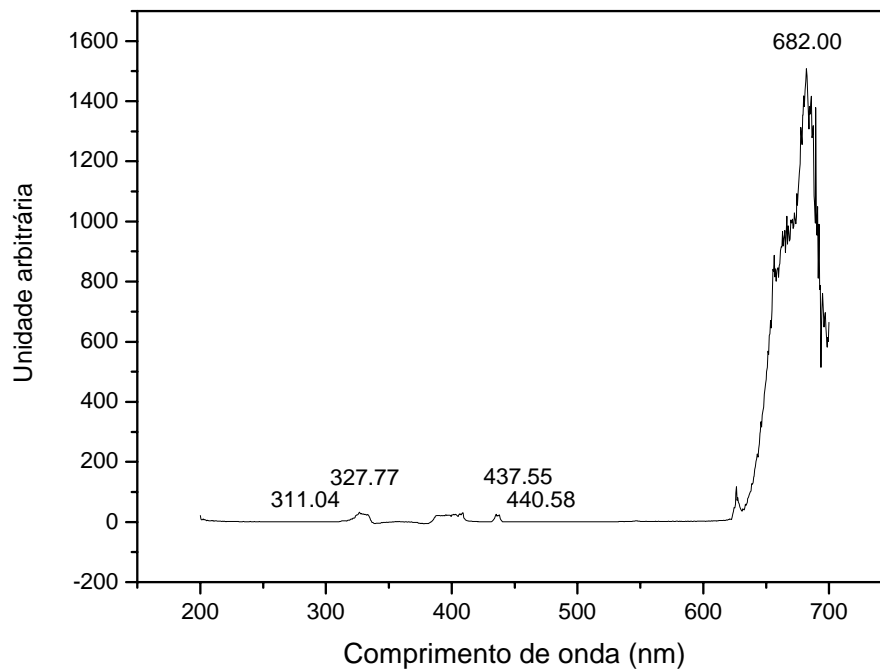
**ANEXOS**

Lâmpada	Iluminância (lux)
UV	237
NUV	25
Azul	352
Verde	725
Amarela	1430
Vermelha	140
Branca	2250

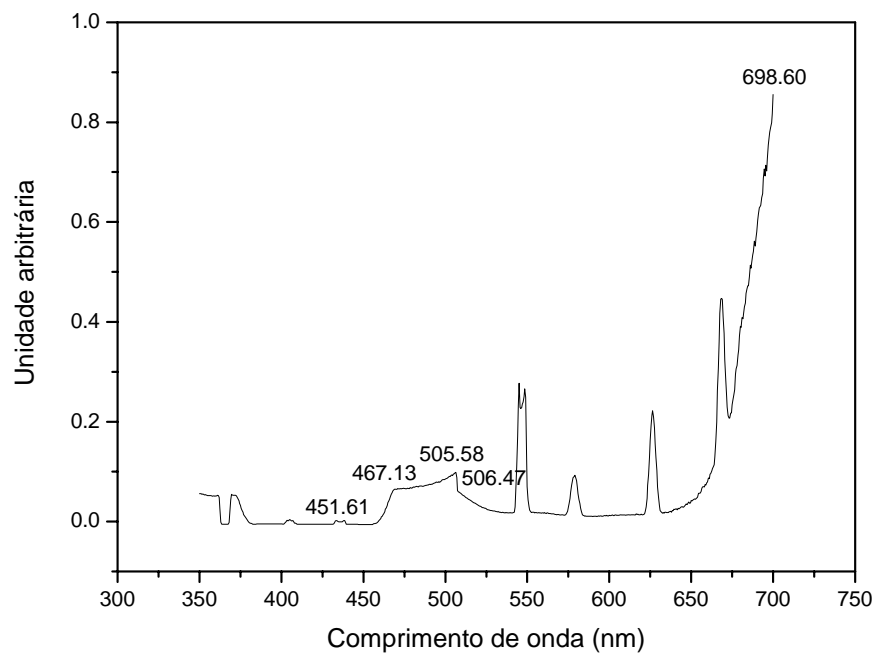
ANEXO A - Medidas de iluminância das lâmpadas fluorescentes



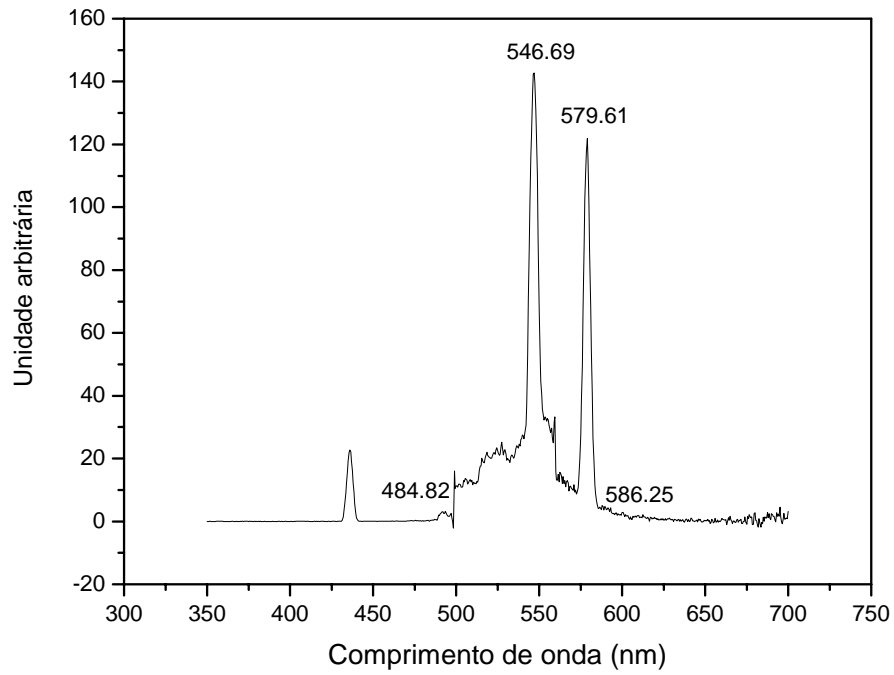
ANEXO B - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente UV (30 Watts, marca Toshiba, modelo GL 30T8).



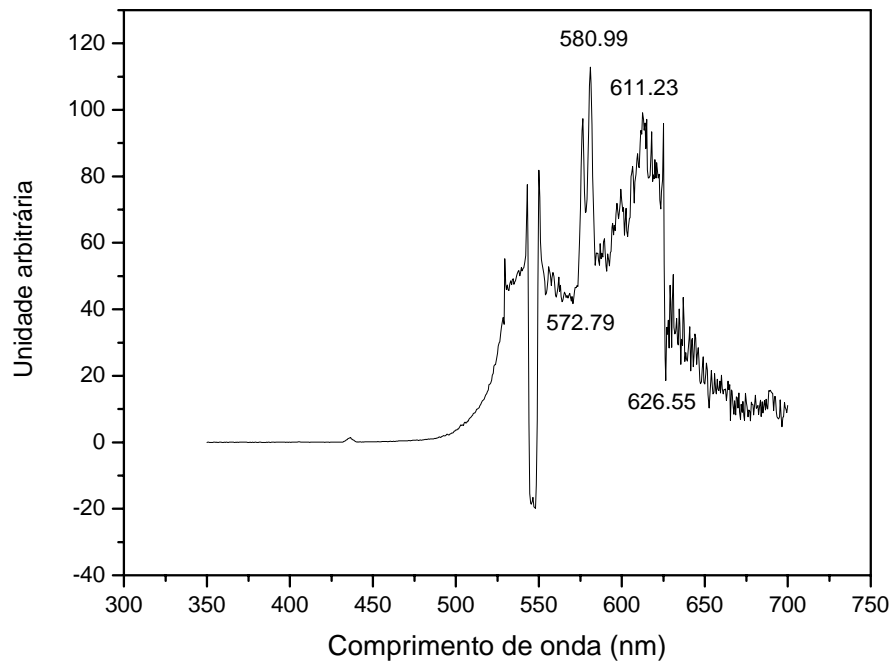
ANEXO C - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente NUV (20 Watts, marca Ecolume, modelo T8/20W).



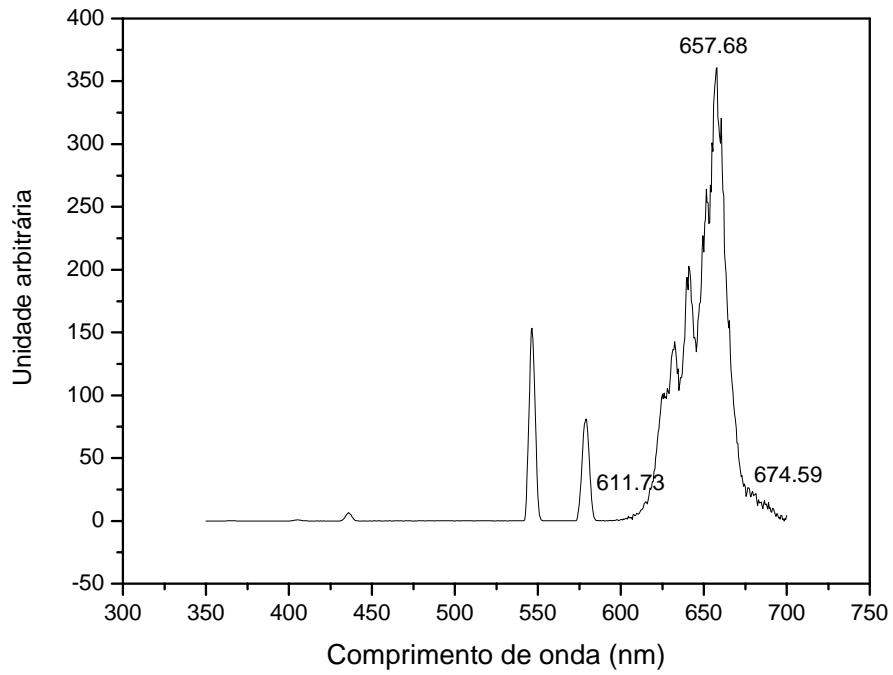
ANEXO D - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente azul (20 Watts, marca Ecolume, modelo T8/20W).



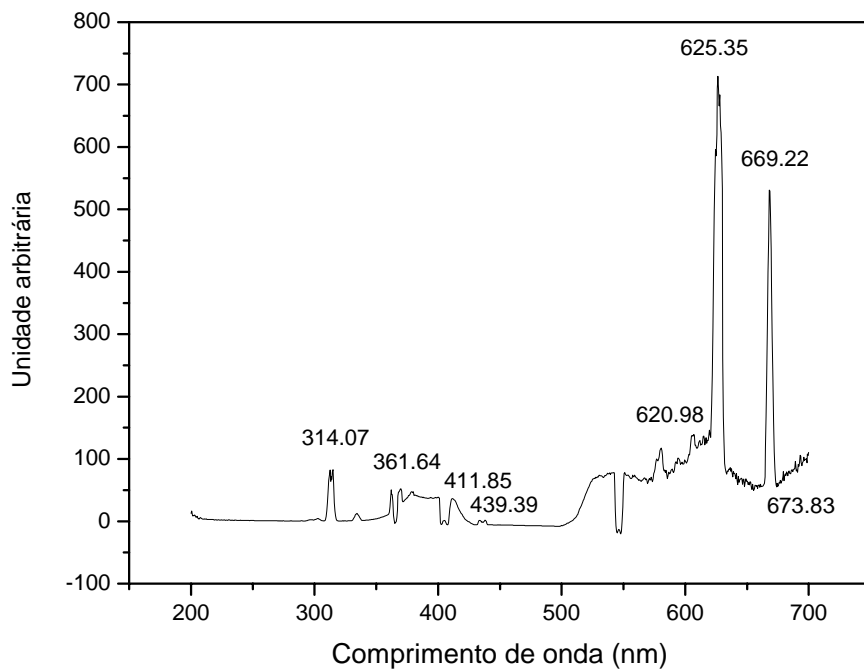
ANEXO E - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente verde (20 Watts, marca Ecolume, modelo T8/20W).



ANEXO F - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente amarela (20 Watts, marca Ecolume, modelo T8/20W).



ANEXO G - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente vermelha (20 Watts, marca Ecolume, modelo T8/20W).



ANEXO H - Distribuição espectral da lâmpada fluorescente branca (20 Watts, marca GE, modelo Duramax).