

TATIANA TOZZI MARTINS SOUZA RODRIGUES

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE CONÍDIOS INFECTIVOS DE
Alternaria solani

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R696p
2005

Rodrigues, Tatiana Tozzi Martins Souza, 1975-
Produção *in vitro* de conídios infectivos de *Alternaria
solani* / Tatiana Tozzi Martins Souza Rodrigues. –
Viçosa:UFV, 2005.
vi, 33f.: il. ; 29cm.

Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 20-25.

1. Fungos - Reprodução. 2. Fungos - Esporos.
3. Pinta-preta - Epidemiologia. 4. *Lycopersicon
esculentum*. 5. *Solanum tuberosum*. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 632.4

TATIANA TOZZI MARTINS SOUZA RODRIGUES

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE CONÍDIOS INFECTIVOS DE
Alternaria solani

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2005.

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Conselheiro)

Prof. Onkar Dev Dhingra
(Conselheiro)

Prof. Hudson Teixeira

Cleide Maria Ferreira Pinto

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e saúde.

À minha amada família, Paula, Pedro, Maria e Leco, pelo amor incondicional e compreensão. Aos meus pais e irmão pelo amor, constante presença, apoio e carinho, mesmo estando longe.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do mestrado e aos seus professores. Em especial, ao Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti pela orientação e ensinamentos dados durante essa etapa da minha formação.

Ao Prof. Luiz Antonio Maffia pelos conselhos e determinante apoio na redação deste trabalho.

Ao Prof. Onkar Dev Dhingra pelas discussões sempre produtivas e pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho na Clínica de Doença de Plantas da UFV.

Aos Professores Robert W. Barreto, José Rogério de Oliveira, Reginaldo da Silva Romero, Murilo Carvalho e Francisco Xavier Ribeiro, por gentilmente terem permitido usar os equipamentos de seus laboratórios.

Aos funcionários Marcos Rogério, Délio, Cecília, Dora, Brás, Jesus, Camilo e Macabeu, por facilitarem meu trabalho.

Aos funcionários da EMATER-MG das cidades de Bueno Brandão, Ibiá, Carandaí, ao Dr. Hércio Costa (Incaper) e Dr. Ailton Reis (CNPq) pelo envio de material vegetal.

Aos professores do curso de Agronomia da UNIMONTES (Janaúba-MG) pela formação e incentivo para que eu viesse realizar esse mestrado.

Aos colegas de laboratório e de curso pelo convívio e ajuda nas atividades.

BIOGRAFIA

TATIANA TOZZI MARTINS SOUZA RODRIGUES, filha de Edson de Souza Martins e Rosa Maria Tozzi Martins, nasceu em Ribeirão Preto – SP no dia 24 de dezembro de 1975.

Em 1997, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Estadual de Montes Claros, na cidade de Janaúba – MG, onde se graduou em julho de 2002.

Em março de 2003 iniciou o mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG.

CONTEÚDO

Resumo.....	V
Abstract.....	VI
1- Introdução.....	01
2- Material e Métodos.....	04
2.1- <i>Procedimentos gerais.....</i>	04
2.1.1 - <i>Obtenção e armazenamento dos isolados.....</i>	04
2.1.2- <i>Cultivo dos isolados.....</i>	04
2.2 - <i>Esporulação em condições de desidratação.....</i>	05
2.2.1- <i>Taxa de desidratação em função do tempo.....</i>	05
2.3 - <i>Esporulação com ou sem injúria do micélio.....</i>	06
2.4 - <i>Esporulação em diferentes tipos de luz e fotoperíodos.....</i>	06
2.5- <i>Esporulação em diferentes meios de cultura.....</i>	07
2.6 - <i>Esporulação após repicagens periódicas.....</i>	07
2.7 - <i>Validação do protocolo para indução de esporulação de Alternaria solani.....</i>	07
2.8 - <i>Análises estatísticas.....</i>	09
3- Resultados.....	11
3.1 - <i>Esporulação em condições de desidratação.....</i>	11
3.1.1- <i>Taxa de desidratação em função do tempo.....</i>	11
3.2 - <i>Esporulação com ou sem injúria do micélio.....</i>	11
3.3 - <i>Esporulação em diferentes tipos de luz e fotoperíodos.....</i>	12
3.4 - <i>Esporulação em diferentes meios de cultura.....</i>	13
3.5 - <i>Esporulação após repicagens periódicas.....</i>	13
3.6 - <i>Validação do protocolo para indução de esporulação de Alternaria solani.....</i>	13
4. Discussão.....	15
5. Referências bibliográficas.....	20
Tabelas.....	26
Figuras.....	31

RESUMO

RODRIGUES, Tatiana Tozzi Martins Souza, M.S. Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2005. **Produção *in vitro* de conídios infectivos de *Alternaria solani***. Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Conselheiros: Luiz Antonio Maffia e Onkar Dev Dhingra.

Esporulação de *Alternaria solani* é normalmente escassa e facilmente paralisada quando em cultivos *in vitro*. Foi obtido e validado um protocolo para induzir esporulação em *A. solani* baseado em fragmentação e desidratação de micélio. Para tal, quatro isolados oriundos de três municípios foram usados em ensaios de efeito da umidade, injúria do micélio, luz, fotoperíodo e meio de cultura, na esporulação. Maior esporulação ocorreu quando se cresceram culturas de *A. solani* em meio V8 sob agitação e triturou-se o micélio o qual foi vertido em placas com meio BDA (pH=6,5). As placas sem tampa, para permitir a desidratação, foram mantidas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 h de luz negra por 60 horas. O protocolo foi validado com 20 isolados de *A. solani* de diferentes hospedeiros, localidades, idades e modo de armazenamento. Quantificaram-se a esporulação, germinação de conídios e infectividade do inóculo em tomateiro e batateira. Todos os isolados esporularam, e a germinabilidade dos conídios foi superior a 96%. Maiores valores de frequência de infecção ocorreram em folíolos do terço médio de batateira. Para avaliar o efeito das repicagens sucessivas na esporulação, efetuaram-se 24 repicagem periódicas, a cada 7 dias. Em cada repicagem, empregou-se o protocolo para induzir a esporulação e se quantificou a produção de conídios. Pelo menos uma das colônias de cada isolado esporulou até a 10ª repicagem.

ABSTRACT

RODRIGUES, Tatiana Tozzi Martins Souza, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February 2005. ***In vitro* production of infectives conidia of *Alternaria solani***. Adviser: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Committee members: Luiz Antonio Maffia and Onkar Dev Dhingra.

Sporulation of *Alternaria solani* is scarce and commonly reduced when the fungus is cultivated *in vitro*. A procedure to induce sporulation based on mycelial fragmentation and dehydration was developed and validated. Four isolates of *A. solani* were used in experiments to assess the effects of moisture, mycelial wounding, light quality and photoperiod, and culture media on conidia production. Sporulation was higher when the fungus was grown on V8 medium at 25°C in darkness with agitation, followed by mycelium grinding and pouring to Petri dishes containing PDA (pH 6.5). In addition, colonies were incubated at 25 ± 2 °C under near ultraviolet light and 12-hour photoperiod. The procedure was validated with 20 isolates of *A. solani* from different hosts, places, ages, and storage conditions. Conidia production, germination, and infectivity were quantified. All isolates sporulated and minimum conidia germination was 96%. Inoculations with conidia suspension of all isolates resulted in lesions. Infection frequency was highest when leaflets of the middle third of tomato plants were inoculated. The effect of subculturing on *A. solani* sporulation was also assessed. After 24 subcultures, at every 7 days,

1. Introdução

O controle mais eficiente da pinta preta em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e batateira (*Solanum tuberosum* L.) depende de informações relativas aos aspectos básicos da biologia de *Alternaria solani* e da interação patógeno-planta. A geração destas informações, não raro, requer condução de experimentos em condições controladas. No entanto, tais experimentos são dificultados por limitações na obtenção de conídios e pela freqüente perda da capacidade de esporulação do patógeno (Rotem, 1994). Muitos fungos se adaptam ao crescimento saprofítico propiciado pela disponibilidade de nutrientes no meio de cultura e perdem a patogenicidade e, ou, o potencial de esporular (Dhingra & Sinclair, 1995). Sem a produção de esporos, inviabiliza-se a execução de experimentos que requerem inoculação artificial, quantitativa e qualitativa, de *A. solani*.

Em vários trabalhos para obter a esporulação de *A. solani*, empregaram-se diferentes níveis de temperatura, luz de comprimentos de onda distintos, meios de cultura e injúria do micélio (Lukens & Horsfall, 1973; Shahin & Shepard, 1979; Vakalounakis *et al.*, 1983; Ungaro & Azevedo, 1986; Moretto & Barreto, 1995; Dalla Pria *et al.*, 1997; Fourtouni *et al.*, 1998).

Induzir a esporulação, principalmente por luz de diferentes comprimentos de onda, é comumente recomendado. Há relatos de indução por luz negra (“near-ultraviolet- NUV”, $\lambda = 320$ a 400 nm) (Leach, 1962; Leach, 1967; Vakalounakis & Christias, 1981; Vakalounakis *et al.*, 1983; Dalla Pria *et al.*, 1997) e luz fluorescente ($\lambda = 380$ a 775 nm) (Lukens, 1960; Aragaki, 1961; Aragaki, 1964; Douglas & Pavék, 1970; Douglas, 1972; Ungaro & Azevedo, 1986; Bóveda, 1986).

A indução de esporulação de *A. solani* é afetada pela interação de tratamentos com luz e temperatura. Sob escuro contínuo e luz contínua, entre 15 e 23°C, ocorreu esporulação *in vitro*, porém, acima de 23°C, somente as culturas mantidas no escuro esporularam, e a esporulação, próximo a 30°C, foi reduzida (Aragaki, 1961). Em outro relato, a esporulação só ocorreu em

escuro contínuo a 18°C, associado a injúria do micélio (Shahin & Shepard, 1979). Com injúria do micélio, por meio de raspagem das hifas aéreas, ocorreu profusa esporulação em *A. solani* (Moretto & Barreto, 1995). Apesar dos resultados diferirem quanto ao efeito do tipo de luz na esporulação, em geral, *A. solani* forma conidióforos, sob irradiação, e conídios, na ausência de luz (Lukens, 1960; Aragaki, 1964; Waggoner & Horsfall, 1969; Douglas, 1972; Bashi & Rotem 1976; Honda & Nemoto, 1984; Bóveda, 1986).

Quanto ao requerimento nutricional, maior esporulação de *A. solani* normalmente ocorre em meios pobres em açúcar, nos quais a produção de micélio é reduzida (Rotem & Bashi, 1969). A adição de carbonato de cálcio (CaCO₃) ao meio de cultura pode favorecer a esporulação (Shahin & Shepard, 1979), mas não está bem definido se o efeito ocorre pelo aumento de pH ou pelo fornecimento de cálcio. Miller (1955) foi um dos primeiros a relatar o uso de CaCO₃ para induzir esporulação *in vitro* em *A. solani*. O autor adicionou CaCO₃ em meio V8 ágar para aumentar o pH. Desde então, tem-se adicionado o CaCO₃ a diferentes meios para induzir esporulação em espécies de *Alternaria* (Moretto & Barreto, 1995; Queiroz *et al.*, 2004; Ávila *et al.*, 2000; Vieira, 2004).

Extratos ou decoctos de folhas, frutos ou outras partes de planta podem suprir a necessidade nutricional de patógenos para esporular em meios de cultura, além de serem adequados para os procedimentos de repicagens sucessivas de colônias armazenadas (Dhingra & Sinclair, 1995). Em meio de suco de tomate, ocorreu produção de esporos de *Alternaria* sp. semelhante à obtida em meio V8-ágar (Dalla Pria *et al.*, 1997). Com a adição de extrato de folhas de girassol ao meio de batata-dextrose-ágar (BDA), obteve-se esporulação de *A. alternata* superior aos meios BDA isoladamente e V8-ágar (Ungaro & Azevedo, 1986). Em *A. euphorbiicola*, obteve-se produção massal de esporos com meio de caldo de vegetais (CVA) e amido de milho-Maizena[®] (Vieira, 2004).

Em condições controladas, a perda gradual da umidade do meio de cultura pode ser o estímulo que induz a esporulação em *Alternaria* spp, como o observado na produção massal de

conídios de *A. macrospora* (Walker, 1980), *A. cassiae* (Walker, 1982; Ávila *et al.*, 2000) e *A. euphorbiicola* (Vieira, 2004). Com a exposição do micélio à atmosfera ambiente, evitam-se também acúmulo de gás carbônico (CO₂) e déficit de oxigênio (O₂), possíveis de ocorrer em culturas em placas de Petri fechadas. Sabe-se que o aumento na concentração de CO₂ diminui a produção de conidióforos e conídios em *A. solani* (Lukens & Horsfall, 1973).

Em programa de pesquisa relacionado à epidemiologia e manejo da pinta preta do tomateiro e batateira, há demanda constante de conídios. Apesar do volume de publicações sobre esporulação do patógeno, em geral as técnicas recomendadas obtêm resultados divergentes ou inconsistentes. Na maioria dos casos, conduziram-se trabalhos com apenas um isolado e nem sempre se quantificaram a viabilidade e a infectividade dos conídios provenientes de colônias submetidas a estímulos para esporular. Face a esses problemas, neste trabalho quantificaram-se: *i*- os efeitos da desidratação, da injúria do micélio, de diferentes meios de cultura, da luz, do fotoperíodo e de repicagens periódicas na esporulação de *A. solani in vitro*, e *ii*- a viabilidade e infectividade de conídios de *A. solani* submetidos ao tratamento de indução de esporulação.

2. Material e Métodos

2.1. Procedimentos gerais

2.1.1. Obtenção e armazenamento dos isolados

Da coleção de isolados de *A. solani* (Tabela 1), quatro, provenientes de diferentes municípios, foram empregados nos experimentos 2.2 a 2.5, com exceção do 2.2.1. Utilizaram-se dois isolados monospóricos provenientes de tomateiro (AS04/002 e AS04/004) e dois de batateira (AS04/001 e AS04/003).

Os isolados foram obtidos diretamente de lesões, retirando conídios com auxílio de estilete, sob microscópio estereoscópico. Os conídios foram transferidos para meio BDA em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Da região central de cada colônia formada, retirou-se um disco de micélio (5 mm de diâmetro), o qual foi depositado em meio BDA coberto com fragmentos (1 x 1cm) de papel filtro esterilizado em placa de Petri. As placas foram mantidas a 25° C, fotoperíodo de 12 h e, após 10 a 14 dias, os fragmentos colonizados foram retirados, colocados em envelopes esterilizados e armazenados a -80°C.

2.1.2. Cultivo dos isolados

Para os isolados armazenados em papel filtro, dois fragmentos de papel colonizados com o fungo foram transferidos para erlenmeyers de 250 ml contendo 150 ml do meio V8 (200 ml/l de Suco de Vegetais V8®, 800 ml de água destilada), adicionado dos antibióticos sulfato de estreptomicina (50 ppm) e cloranfenicol (75 ppm). Para os isolados provenientes de outra forma de armazenamento, foi necessário, inicialmente, o crescimento da colônia em BDA em placa de Petri. Após 7 dias, transferiu-se 2 discos de micélio (5 mm) para erlenmeyers, como descrito anteriormente. Todas as culturas foram mantidas sob agitação (110 rpm), no escuro, em temperatura ambiente (25 a 27°C). Após 7 dias, o micélio produzido foi triturado por 1 min,

com auxílio do triturador Politron[®], a 4.000 rpm. Este procedimento foi utilizado para produção de micélio para condução de todos os experimentos.

Da suspensão de micélio, alíquotas de 10 ml foram vertidas em placas de Petri contendo 15 ml do meio V8 ágar/CaCO₃ (200 ml/l de Suco de Vegetais V8[®], 800 ml de água destilada, 16 g de ágar, 3 g de CaCO₃), para realização dos experimentos 2.2, 2.2.1 e 2.4.

2.2 - Esporulação em condições de desidratação

Compararam-se três tratamentos: 1-placas de Petri com tampas e vedadas com filme plástico; 2- placas com tampas, sem vedação e 3- placas sem tampas. As culturas foram incubadas sob conjunto de duas lâmpadas de luz negra (General Electric[®] Black Light - 40W) e duas de luz fluorescente (Sylvania[®] luz do dia – 40 W) com fotoperíodo de 12 h a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A distância entre as lâmpadas foi de 5 cm e destas para as placas, 30 cm.

Após 3 dias de incubação, as placas foram inundadas com 10 ml de água destilada esterilizada (ADE) contendo 0,01% de Tween 20. A superfície da colônia foi escovada com pincel, para remover os conídios e obter sua suspensão (Foolad *et al.*, 2000). Para quantificar o número de conídios, colocou-se uma gota de 10 μl em lâmina de microscopia e, sobre a gota, depositou-se uma lamínula e a contagem do número de conídios foi feita com microscópio ótico. O número de conídios/ml de suspensão foi determinado, considerando-se o fator de diluição. Essa forma de quantificação foi empregada em todos os experimentos.

2.2.1. Taxa de desidratação em função do tempo

Quantificou-se a taxa desidratação das colônias dos isolados AS04/002 e AS04/004. Em balança analítica, pesou-se cada placa, antes e após receber o meio de cultura e a suspensão de micélio. As placas com o meio e a suspensão de micélio foram mantidas sem tampa, sob luz negra, fotoperíodo de 12h, a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. A cada 12 h, por 84 h, pesou-se cada placa. Utilizaram-se

20 repetições por isolado (uma placa = uma repetição). Plotou-se a massa do meio + suspensão de micélio, em função do tempo, para análise descritiva da dinâmica do processo.

2.3 - Esporulação com ou sem injúria do micélio

Transferiu-se um fragmento de papel filtro colonizado com *A. solani* para placa de Petri contendo o meio V8 ágar/CaCO₃. As culturas foram incubadas sob o mesmo regime de luz e temperatura descritos em 2.2. Decorridos 7 dias, o micélio aéreo das colônias foi retirado com auxílio de uma lâmina de bisturi. Em decorrência da variação de crescimento das colônias, o diâmetro das mesmas foi medido em duas direções, perpendiculares uma à outra, e se calculou a área da colônia por meio da fórmula da área do círculo.

Compararam-se quatro tratamentos: 1- placas com tampas e micélio sem injúria; 2- placas com tampas e micélio com injúria; 3- placas com tampas e micélio sem injúria; e 4- placas com tampas e micélio com injúria. A injúria do micélio foi feita por meio de cortes com bisturi, a cada 0,5cm, em toda a extensão da colônia, nos sentidos longitudinal e transversal. Após a injúria, as culturas retornaram à condição de incubação. Após 3 dias, retiraram-se os conídios das placas e se quantificou a esporulação.

2.4 - Esporulação em diferentes tipos de luz e fotoperíodos

Compararam-se sete tratamentos: 1- luz fluorescente contínua; 2- luz fluorescente e fotoperíodo de 12 h; 3- luz negra / luz fluorescente contínuas; 4- luz negra / luz fluorescente e fotoperíodo de 12 h; 5- luz negra contínua; 6- luz negra e fotoperíodo de 12 h; e 7- escuro contínuo. Em cada tratamento, utilizaram-se seis lâmpadas. Em 1 e 2, utilizaram-se lâmpadas fluorescentes Sylvania® luz do dia 40W; em 5 e 6, lâmpadas Sylvania® luz negra 40W e, em 3 e 4, três lâmpadas de cada tipo, dispostas alternadamente. A distância entre as lâmpadas foi de 5 cm e destas para as placas, 30 cm. Após 60 h de incubação, retiraram-se os conídios de todas as placas e se quantificou a esporulação.

2.5- Esporulação em diferentes meios de cultura

Compararam-se oito meios de cultura (tratamentos): 1- BDA; 2- V8 ágar; 3- caldo de vegetais ágar (CVA) (Pereira *et al.*, 2003); 4- cenoura ágar (CA - 20 g de cenoura, 16 g de ágar, 1 L de água destilada); 5- BDA/CaCO₃ (BDA + 3 g de CaCO₃/l); 6- V8 ágar/CaCO₃; 7- CVA /CaCO₃ (CVA + 3 g de CaCO₃/l); e 8- CA/CaCO₃ (CA + 3 g CaCO₃/l). Ajustou-se o pH dos meios sem e com CaCO₃ para 6,5 e 7,5, respectivamente.

As placas foram mantidas sem tampas, a 25°C $\pm$ 2, sob conjunto de seis lâmpadas de luz negra Sylvania® 40W distantes de 5cm entre si e a 30 cm das placas. Após 60 h de incubação, quantificou-se a esporulação.

2.6- Esporulação após repicagens periódicas

Os quatro isolados descritos em 2.1 mais os isolados AS04/007 e AS04/008 (Tabela 1) foram repicados para BDA em placas de Petri (pH=6,5). Após 7 dias de incubação a 25°C no escuro, do centro da colônia de cada isolado, retiraram-se discos de micélio (5mm), os quais foram repicados para meio BDA (pH=6,5) em três placas (triplicatas) e para meio V8 em três erlenmeyers. As culturas, em placa, foram incubadas como descrito anteriormente, e a cada 7 dias, efetuou-se nova repicagem. As culturas em erlenmeyers foram incubadas durante 7 dias, conforme descrito em 2.1.2. Do micélio contido em cada erlenmeyer, três placas foram preparadas e as colônias induzidas a esporular (placas mantidas sem tampas, a 25 $\pm$ 2°C, sob conjunto de seis lâmpadas de luz negra Sylvania® 40W , meio BDA, pH=6,5). Após 60 h de incubação, quantificou-se a esporulação.

2.7. Validação do protocolo para indução de esporulação de *Alternaria solani*

Para validar o protocolo, avaliaram-se a esporulação, germinação e a infectividade dos conídios de 20 isolados de *A. solani* (Tabela 1) . O experimento foi executado em três etapas, e

se avaliaram sete, oito e cinco isolados na primeira, segunda e terceira etapas, respectivamente. Em todas as três, utilizaram-se os isolados AS04/007 e AS04/008 como comparadores.

Os isolados foram submetidos ao protocolo de indução de esporulação, determinado a partir dos ensaios 2.2 a 2.5. Das cinco placas, por isolado, com culturas esporulantes, três foram selecionadas aleatoriamente para recolhimento da suspensão de conídios. A concentração da suspensão, ajustada para 10^3 conídios/ml, foi utilizada para avaliar a germinação e a infectividade dos conídios. Uma gota de 50 µl da suspensão foi depositada sobre lâmina de microscopia e colocada sobre uma tampa de placa de Petri contida dentro de caixa plástica tipo gerbox (11 x 11 x 3cm). A tampa da placa de Petri foi posicionada com os bordos para baixo, de modo que o fundo servisse como suporte para as lâminas. Cada gerbox recebeu água o suficiente para cobrir o suporte e não atingir a lâmina, garantindo alta umidade para a germinação dos conídios. Os gerboxes foram mantidos em câmara de crescimento a 25°C no escuro. Após 12 h, as lâminas foram levadas ao microscópio, e se avaliou a germinação de pelo menos 100 conídios por lâmina. Considerou-se como germinado o conídio cujo comprimento do tubo germinativo de pelo menos uma célula foi igual ou superior ao seu maior diâmetro. As três suspensões provenientes de cada isolado foram mantidas individualizadas e de cada uma, prepararam-se três lâminas (três repetições).

A infectividade foi quantificada a partir da frequência de infecção dos 20 isolados em plantas de tomateiro “Santa Clara”, ou em folíolos destacados de batateira “Monalisa”, com 50 e 60 dias de idade, respectivamente. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação e mantidas livres de pragas e patógenos. Os isolados foram inoculados no hospedeiro de onde provieram.

As suspensões de onde se retiraram esporos para o teste de germinação foram usadas na inoculação do tomateiro e batateira. A cada suspensão individual calibrada em 10^3 conídios /ml de ADE, correspondeu uma planta inoculada de tomate ou um conjunto de folíolos de batata. Em ambos os hospedeiros, três folíolos por terço da planta (superior, médio e inferior) foram avaliados, sendo cada folíolo considerado como uma repetição. Após a inoculação, as plantas de

tomate foram cobertas com sacos de polietileno e mantidas a 25°C no escuro. Após 24 horas, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação. Os folíolos destacados de batateira, após inoculação, foram mantidos em gerbox, com umidade garantida por um chumaço de algodão umedecido com água destilada. Os gerboxes foram mantidos a 25°C em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 h.

Cada suspensão foi pulverizada na face adaxial do folíolo que continha uma lamínula (1 x 1 cm). Após pulverização, a lamínula foi colocada sobre lâmina contendo uma gota de lactofenol e levada ao microscópio ótico para estimar o número de conídios depositados na superfície. Para o cálculo do número de conídios depositado por folíolo, determinou-se a área de cada folíolo, utilizando medidor de área foliar (Licor[®] Li-3.100). Deste valor, subtraiu-se 1 cm², correspondente à área não tratada, e se estimou o número de conídios depositados por folíolo. A frequência de infecção (%) foi definida pela razão (número de lesões geradas/número de conídios depositados na área determinada) x 100 .

As avaliações do número de lesões/folíolo foram realizadas no terceiro e quarto dias após inoculação e ao quinto dia a área foliar dos folíolos foi determinada.

2.8. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial duplo. As análises de efeitos de tratamento foram realizadas para cada isolado, separadamente. Para comparar a média de um fator dentro de cada nível do outro fator, utilizou-se o procedimento Mixed – opção Slice do programa SAS[®] versão 8.2 (Littell *et al.*, 1996).

O número de repetições para os tratamentos nos experimentos 2.2, 2.3, 2.4, e 2.5 foi de 5, 4, 3 e 3, respectivamente. Em 2.2 o número de conídios foi dado em função da área (cm²). Para quantificar a esporulação em 2.7. empregaram-se cinco repetições. Em todos os experimentos, uma placa foi considerada como uma repetição. Para os experimentos conduzidos por duas vezes (2.2, 2.3, 2.4 e 2.5) denominou-se repetição 1 e 2 do experimento. Para tais,

aplicou-se o teste Levene de homogeneidade de variâncias entre as repetições (Kuehl, 1994). Médias de tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. No experimento 2.5, o efeito do pH foi avaliado por contraste de médias. Todas as análises foram realizadas com o programa SAS[®] versão 8.2.

3- Resultados

3.1 - *Esporulação em condições de desidratação*

Como não houve homogeneidade de variâncias, os dados das duas repetições do experimento foram analisados separadamente. Em ambas, nenhum dos isolados esporulou quando as placas foram mantidas fechadas, com ou sem vedação com filme plástico, ocorrendo o crescimento de micélio aéreo nas colônias. Porém, quando as placas foram mantidas abertas todos os isolados esporularam (Tabela 2), houve desidratação do material, sem crescimento de micélio aéreo.

3.1.1. *Taxa de desidratação em função do tempo*

Para os dois isolados estudados, maior desidratação do micélio e do meio de cultura ocorreu nas primeiras 36 h. A partir das 48 h do início do processo, quase nenhuma perda de água foi verificada até o final das 84 h (Figura 1).

3.2 - *Esporulação com ou sem injúria do micélio*

Os dados das duas repetições do experimento foram analisados separadamente, pois as variâncias não foram homogêneas ($P=0,029$). Em ambas as repetições, para todos os isolados, houve interação significativa dos fatores injúria e fechamento de placas ($P<0,01$).

Na primeira repetição, o isolado AS04/003 não esporulou em qualquer dos tratamentos. Para os demais isolados, independente da ocorrência de injúrias no micélio, a esporulação foi maior ($P<0,01$) nas placas mantidas abertas. Essa tendência se repetiu na segunda repetição, inclusive para o isolado AS04/003. Na primeira repetição, em placas abertas, a esporulação do isolado AS04/001 variou entre 900 e 1.300 conídios/cm², do AS04/002 entre 2 e 490 conídios/cm² e do AS04/004 entre 250 e 3.300 conídios/cm². Em placas fechadas, o máximo de esporulação foi para AS04/004, de 3 conídios/cm². Na segunda repetição, em placas abertas, a

esporulação do isolado AS04/001 variou entre 518 e 1430 conídios/cm², do AS04/002 entre 610 e 1.430 conídios/cm², do AS04/003 entre 1 e 6 conídios/cm² e do AS04/004 entre 1.430 e 7.500 conídios/cm². Em placas fechadas, nenhum dos isolados esporulou.

Em geral, o efeito da injúria do micélio na esporulação, em placas com ou sem tampas, não foi significativo em 10 de 14 comparações. Os isolados AS04/001 (repetição 1, placas com tampas) e AS04/002 (repetição 1 e 2, placas sem tampas) esporularam significativamente mais ($P<0,01$) no tratamento sem injúria, enquanto o isolado AS04/004 (repetição 1, placas com tampas) esporulou mais com a realização de injúrias ($P=0,02$).

Após retirada do micélio aéreo das colônias, nas placas com tampas, com ou sem injúria, houve novo crescimento de micélio aéreo, o que não ocorreu em placas abertas.

3.3 - Esporulação em diferentes tipos de luz e fotoperíodos

Os dados das duas repetições do experimento foram analisados em conjunto, pois as variâncias foram homogêneas ($P=0,448$). O efeito do tipo de luz e do fotoperíodo foi significativo para todos os isolados ($P<0,0001$).

Para os quatro isolados, houve maior esporulação ($P<0,001$) no fotoperíodo de 12h, principalmente na exposição à luz fluorescente ou negra. Na combinação fluorescente + negra, maior esporulação do isolado AS04/001 foi com 12h, a esporulação dos isolados AS04/002 e AS04/004 não diferiu nos dois intervalos, enquanto maior esporulação do isolado AS04/003 foi com 24h (Figura 2).

Considerando o fotoperíodo de 12h, maior esporulação dos quatro isolados ($P<0,001$), ocorreu com a exposição à luz negra. Com 24h, não se obteve tendência bem definida de esporulação (Figura 2).

Nenhum dos isolados esporulou sob escuro contínuo, e os valores obtidos não foram submetidos à análise de variância.

3.4 - Esporulação em diferentes meios de cultura

Os dados das duas repetições do experimento foram analisados separadamente, pois não se observou homogeneidade das variâncias ($P < 0,0001$). Em ambas as repetições, houve efeito significativo da interação meio e adição de CaCO_3 - pH para os isolados AS04/001, AS04/002 e AS04/004 ($P = 0,01$). Principalmente sem adição de CaCO_3 - pH 6,5, houve tendência de maior esporulação, de todos os isolados, no meio BDA. No tratamento com adição de CaCO_3 - pH 7,5, a tendência não foi bem definida (Tabelas 3 e 4).

3.5 - Esporulação após repicagens periódicas

Não houve redução da esporulação dos isolados até a sexta repicagem e as colônias de cada isolado permaneceram similares na produção de conídios. Porém, a partir de então, ocorreram diferenças quanto à produção de conídios das colônias dentro de cada isolado (Figura 3). Pelo menos uma das colônias de cada isolado esporulou até a 10ª repicagem. Para os isolados AS04/007 e AS04/008, pelo menos duas das colônias permaneceram esporulando até a 18ª repicagem e apenas uma das colônias do isolado AS04/003 esporulou até a 20ª repicagem.

3.6 - Validação do protocolo para esporulação de *Alternaria solani*

Com base nos resultados obtidos, definiu-se um protocolo para induzir esporulação de *A. solani*: produzir micélio fúngico em meio V8 sob agitação a 110 rpm, no escuro, durante 7 dias, a $25^\circ\text{C} \pm 2$; triturar o micélio e transferir 10ml de suspensão de fragmentos para placas de Petri contendo 15 ml de BDA, pH=6,5; manter as placas abertas sob conjunto de seis lâmpadas de luz negra distantes 5 cm entre si e 30 cm das placas, fotoperíodo de 12h, a $25^\circ\text{C} \pm 2$, durante 60h; acrescentar sulfato de estreptomocina (50ppm) e cloranfenicol (75ppm) aos meios de cultura líquido e sólido, mesmo para triturar o micélio.

Os 20 isolados testados esporularam, em intensidades variáveis, quando submetidos ao protocolo proposto. Para a maioria dos isolados, a germinação dos conídios foi acima de 96%

(Tabela 5). Todos os isolados foram patogênicos em seus hospedeiros, apesar de variarem quanto à frequência de infecção. Maiores valores de frequência de infecção ocorreram com isolados oriundos de batateira. Para a maioria dos isolados, obtiveram-se maiores e menores valores de frequência de infecção quando inoculados nos folíolos dos terços médio e superior das plantas, respectivamente (Tabela 5).

4- Discussão

O protocolo desenvolvido e validado possibilitou a produção de conídios infectivos de isolados de *A. solani* em condições controladas. *In vitro*, comumente se observa profuso crescimento micelial, sem contudo haver formação de conídios. Sabe-se que, em geral, os requerimentos para crescimento vegetativo de um fungo não são os mesmos para produzir estruturas reprodutivas (Dhingra & Sinclair, 1995). Mesmo em processos reprodutivos, como na conidiogênese de *A. solani*, há exigências distintas para a formação de conidióforos e conídios (Rotem, 1994). *In vivo*, conidióforos são formados sob condições de alta umidade, propiciada por chuva, orvalho ou irrigação e presença de luz. A formação de conídios de *A. solani* é favorecida pela alternância de alta e baixa umidade e na ausência de luz (Waggoner & Horsfall, 1969). Simular, *in vitro*, as condições que favorecem a esporulação *in vivo* tem sido fator complicador para muitos trabalhos com *A. solani*, em vista dos fracassos freqüentes nas tentativas de obter conídios.

A aeração do micélio e desidratação da colônia e meio de cultura foram fatores importantes para esporulação, *in vitro*, de *A. solani*. Nas placas mantidas abertas, inicialmente havia alta umidade. Após as primeiras 12h, conidióforos foram formados e cerca de 10% da massa do meio de cultura foi perdida em função da desidratação. Conidióforos, em contato com filme de água, podem reverter em hifas vegetativas e interromper a conidiogênese (Aragaki *et al.*, 1973). Dessa forma, a desidratação do micélio pode ter sido o estímulo inicial para a esporulação. Em *Neurospora crassa*, conhecem-se genes associados à conidiogênese, os quais são expressos quando as condições ambientais favorecem a dessecação da colônia (Changgong *et al.*, 1997). Associado à desidratação, a maior aeração das colônias mantidas em placas sem tampas também pode ter contribuído para estimular a esporulação do patógeno. Com a aeração, há menores acúmulo de gás carbônico e déficit de oxigênio, fatores que propiciam a esporulação de *A. solani* (Lukens & Horsfall, 1973). Para esses autores, o patógeno é mais sensível aos

fatores supramencionados durante o período de reprodução que durante o crescimento vegetativo. No presente trabalho, os tratamentos que não causaram perda abrupta de umidade favoreceram o crescimento micelial, mas não a formação de conídios. Apesar de se saber que umidade, gás carbônico e oxigênio afetam a esporulação de *A. solani*, ainda não se demonstrou como estes fatores interferem na fisiologia do fungo.

Outras espécies de *Alternaria* têm esporulado satisfatoriamente com o uso da técnica empregada nesse ensaio, em que, inicialmente, ocorre o crescimento do fungo em meio líquido seguido da esporulação em meio sólido (Walker, 1980; Walker, 1982, Ávila *et al.*, 2000; Vieira, 2004). Essa técnica é efetiva para produção massal de inóculo de maneira simples e sem necessidade de ambiente asséptico em todas as etapas do processo (Walker, 1980). Além disso, parece ser promissora para induzir esporulação em *Colletotrichum graminicola*, *C. malvarum*, *Drechslera sorghicola*, *Helminthosporium* spp. e *Curvularia* spp. (Walker, 1980).

A injúria do micélio, por meio da raspagem das hifas aéreas da colônia ou de cortes do meio de cultura onde o fungo se desenvolve, é relatada como técnica para estimular esporulação de *A. solani* (Bonde, 1929; Shahin & Shepard, 1979; Moretto & Barreto, 1995). Porém, no presente trabalho, a injúria realizada por cortes do micélio e meio não foi determinante para estimular a esporulação. Como a retirada do micélio aéreo das colônias por si é uma forma de injúria, provavelmente a injúria subsequente não exerceu efeito adicional na esporulação. Em geral, não houve efeito da injúria em placas mantidas abertas, e os efeitos foram inconsistentes em placas fechadas. Entretanto, recomenda-se a retirada do micélio aéreo, favorecendo a desidratação, que é fator importante para induzir a esporulação de *A. solani*.

A luz é fator crítico para esporulação de *A. solani*, pois o fungo responde a diferentes comprimentos de onda e fotoperíodos (Douglas, 1972; Leach, 1962). Obteve-se maior esporulação quando se alternou luz e escuro. Essa alternância simula condições já descritas como importantes para a formação de conídios: inicialmente, há formação de conidióforos com a irradiação e, posteriormente, há formação de conídios, no período escuro (Lukens, 1960; Leach,

1967; Waggoner & Horsfall, 1969; Douglas, 1972; Walker, 1980; Bóveda, 1986). Tal situação simula também o que ocorre no campo, onde há alternância de períodos de claro e escuro. Alguns isolados não esporularam quando mantidos sob luz contínua. Há relatos do efeito da interação de luz contínua e temperatura na esporulação. Colônias de *A. tomato* esporularam sob luz contínua quando incubadas em temperaturas constante, desde 15 a 23°C (Aragaki, 1961). No presente trabalho, obteve-se menor variação de temperatura nos tratamentos mantidos sob luz contínua, pois as lâmpadas acesas aumentam a temperatura próximo às placas, o que contribui para reduzir variações causadas por mecanismos de acionamento do sistema de iluminação. Conseqüentemente, nos tratamentos em que se alternaram luz e escuro, podem ter havido maiores períodos de alternância de temperatura.

Além do fotoperíodo, a qualidade da luz é também importante na esporulação. Comprimentos de onda próximos a 310nm, emitidos por luz negra, estimulam a esporulação de *A. solani*, e os conidióforos produzidos, não se reverterem para hifas vegetativas quando expostos ao escuro, podendo assim ocorrer a produção dos conídios (Aragaki *et al*, 1973). Especula-se que pigmentos fotoreceptores estejam envolvidos nos processos de indução ou inibição da esporulação por determinados comprimentos de onda (Leach, 1965; Trione & Leach, 1966; Honda & Nemoto, 1984). Porém, para espécies de *Alternaria*, não se tem avançado sobre o assunto. Um composto denominado P310 (“Photoreceptor” 310) foi obtido de colônias esporulantes de *A. chrysanthemi* crescidas sob luz negra, mas não em colônias crescidas no escuro e que não esporularam (Leach, 1965). Postulou-se que tal composto, com pico de absorbância em 310 nm, seja um possível fotoreceptor nessa espécie e em *A. dauci*, onde também foi encontrado (Trione & Leach, 1966). Entretanto, o composto sugerido não teve sua estrutura química identificada, o que impede avaliar sua real função.

As exigências nutricionais para *A. solani* produzir conidióforos e conídios são distintas, bem como dificultam a obtenção de esporos *in vitro*. Este patógeno requer fonte de carbono (açúcares) para produzir conidióforos em quantidade, apesar de inibir a produção de conídios

(Waggoner & Horsfall, 1969). Esse fato pôde ser observado com a adição de sacarose ao meio líquido V8: o fungo cresceu abundantemente, mas produziu apenas conidióforos. O meio com suco V8 suplementado com CaCO_3 foi considerado como adequado à esporulação de *A. solani* (Miller, 1955). Desde então, o CaCO_3 tem sido adicionado a vários meios com essa finalidade, porém, a esporulação do fungo varia com o meio testado. Neste trabalho e no de Vieira (2004), a esporulação foi maior quando o meio CVA foi suplementado com CaCO_3 . Contudo, a esporulação de *A. solani* foi menor em BDA suplementado com CaCO_3 , fato já observado (Moretto & Barreto, 1995). Apesar das evidências de que a adição de CaCO_3 aumenta a esporulação, não se sabe se o efeito é pela variação do pH ou pelo fornecimento de cálcio.

Repicagens periódicas, comumente empregadas para manutenção de isolados de fungos fitopatogênicos, podem afetar a capacidade de esporulação e a patogenicidade, por estimularem o crescimento saprofítico (Dhingra & Sinclair, 1995). Em *A. solani*, as repicagens periódicas em meio de cultura afetam os processos de esporulação (Rotem, 1994). No presente estudo, da forma em que se conduziram as repicagens das colônias de *A. solani*, todos os isolados mantiveram a capacidade de esporular por até dez repicagens. Em outro trabalho, um terço dos isolados não esporularam após duas repicagens e os demais, até cinco (Padhi & Rath, 1973). Para os autores, os isolados que esporularam por mais tempo foram mutantes que surgiram em cultura após o isolamento do fungo.

Produzir inóculo em quantidade e qualidade adequadas é fundamental para conduzir estudos detalhados em qualquer patossistema. Com o protocolo avaliado, obteve-se esporulação de *A. solani* em quantidade e qualidade adequadas, pois os conídios formados germinaram e infectaram folíolos de tomateiro e batateira. Diferenças quanto ao material inoculado, se folíolos destacados ou não, podem ter influenciado na variação dos valores de frequência de infecção para os isolados de batata em relação aos de tomate. Normalmente, os primeiros sintomas de pinta preta aparecem em folíolos mais velhos, já senescentes. Possivelmente, houve alteração da fisiologia dos folíolos quando destacados, o que resultou em maior suscetibilidade e, por

consequente, maior valor de frequência de infecção. Caso plantas estivessem sendo usadas ao invés de folíolos destacados de batateira, os resultados poderiam não ser bem correlacionados. Quantificaram-se componentes epidemiológicos de *A. solani* em folíolos destacados e plantas inteiras de tomate, e não se obteve boa correlação entre os materiais inoculados (Foolad *et al.*, 2000). Por outro lado, *A. solani* possui grande variabilidade patogênica (Rotem, 1994), o que pode ser a maior causa das variações dos valores de frequência de infecção encontrados. Desconsiderando-se essas diferenças, no ensaio de infectividade observaram-se respostas variáveis entre os isolados. Apesar das variações, todos os isolados foram infectivos e o protocolo desenvolvido foi adequado para induzir esporulação, *in vitro*, de *A. solani*. Assegurada a esporulação, ensaios futuros relacionados à biologia, epidemiologia e/ou ao manejo do patógeno, serão mais facilmente executados.

5. Referências bibliográficas

ARAGAKI, M. Radiation and temperature interaction on the sporulation of *Alternaria tomato*. *Phytopathology* 51:803-805. 1961.

ARAGAKI, M. Relation of radiation and temperature to the sporulation of *Alternaria tomato* and other fungi. *Phytopathology* 54:565-569. 1964.

ARAGAKI, M., NISHIMOTO, K. M. & HYLIN, J. W. Vegetative reversion of conidiophores in *Alternaria tomato*. *Mycologia* 65:1205-1210. 1973.

ÁVILA, Z. R., MELLO, S. C. M. , RIBEIRO, Z. M. A. & FONTES, E. M. G. Produção de inóculo de *Alternaria cassiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35:533-541. 2000.

BASHI, E. & ROTEM, J. Induction of sporulation of *Alternaria porri* f.sp. *solani* *in vivo*. *Physiological Plant Pathology* 8:83-90. 1976.

BONDE, R. Physiological strains of *Alternaria solani*. *Phytopathology* 19:533-548. 1929.

BÓVEDA, R. R.V. Morfologia, patogenicidade, esporulação e sensibilidade a fungicidas “in vitro” de *Alternaria solani* (Ellis & Martin) Jones & Grout e *Alternaria alternata* (Fr) Keissler de solanáceas. Tese de mestrado. Departamento de Fitopatologia. Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiróz. 1986.

CHANGGONG, L., MATTHEW S. S. & SCHMIDHAUSER, T. J. Developmental and photoregulation of three *Neurospora crassa* carotenogenic genes during conidiation induced by desiccation. *Fungal Genetics and Biology* 21:101-108. 1997.

DALLA PRIA, M., BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaeoisariopsis griseola* e *Alternaria* sp. *Summa Phytopathologica* 23:181-183. 1997.

DHINGRA, O. D. & SINCLAIR, J. B. *Basic Plant Pathology Methods*. 2nd ed. Boca Raton. Florida. CRC Press. 1995.

DOUGLAS, D. R. & PAVEK, J. J. An efficient method of inducing sporulation of *Alternaria solani*. *Phytopathology* 60:239. 1970.

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

FOOLAD, M. R., NTAHIMPERA, N., CHRIST, B. J. & LIN, G. Y. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. *Plant Disease* 84: 967-972. 2000.

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* 76:2093-2099. 1998.

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

KUEHL, R. O. Statistical principles of research design and analysis. Belmont. Duxbury Press. 1994.

LEACH, C. M. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. Canadian Journal of Botany 40:151-161. 1962.

LEACH, C. M. Ultraviolet absorbing substances associated with light induced sporulation in fungi. Canadian Journal of Botany 43:185-200. 1965.

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 45:1999-2015. 1967.

LITTELL, R. C. , MILLIKEN, G. A. , STROUP. , W. W. & WOLFINGER, R. D. SAS System for mixed models. Cary. SAS Institute. 1996.

LUKENS, R. J. Conidial production from filter paper culture of *Helminthosporium vagans* and *Alternaria solani*. Phytopathology 50:867-868. 1960.

LUKENS, R. J. & HORSFALL, J. G. Processes of sporulation in *Alternaria solani* and their response to metabolic inhibitors. Phytopathology 63:176-182. 1973.

MILLER, P. M. V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology* 45:461-462. 1955.

MORETTO, K. C. K. & BARRETO, M. Efeito de alguns meios de cultura no crescimento e na esporulação de *Alternaria solani* e de alguns fatores na frequência de infecção em tomateiro. *Summa Phytopathologica* 21:188-191. 1995.

PADHI, N. N. & RATH, G. C. Sporulation of *Alternaria solani* in pure culture. *Indian Phytopathology* 26:495-501. 1973.

PEREIRA, J. M., BARRETO, R. W., ELLISON, C. A. & MAFFIA, L. A. *Corynespora cassiicola* f.sp. *lantanae*: a potencial biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control* 26:21-31. 2003.

QUEIROZ, F. M., BATISTA, U. G & BROMMNSCHENKEL, S. H. Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de *Alternaria brasiliensis*. *Fitopatologia Brasileira* 29:541-543. 2004.

ROTEM, J. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. St. Paul. APS Press. 1994.

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* 53:433-439. 1969.

SHAHIN, E. A. & SHEPARD, J. F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. *Phytopathology* 69:618-620. 1979.

TRIONE, E. J & LEACH, C. M. Sporogenic substance isolated from fungi. *Nature* 212:163-164. 1966.

UNGARO, M. R. G. & AZEVEDO, J. L. Crescimento e esporulação de *Alternaria alternata* em diferentes condições de cultivo. *Fitopatologia Brasileira* 11:75-82. 1986.

VAKALOUNAKIS, D. J. & CHISTIAS, C. Sporulation in *Alternaria cichorii* is controlled by a blue and near ultraviolet reversible photoreaction. *Canadian Journal of Botany* 59:626-628. 1981.

VAKALOUNAKIS, D. J., CHRISTIAS, C. & MALATHRAKIS, N. E. Interaction of light quality and temperature on the vegetative reversion of conidiophores in *Alternaria cichorii*. *Canadian Journal of Botany* 61:626-630. 1983.

VIEIRA, B. S. *Alternaria euphorbiicola* como microherbicida para o leiteiro (*Euphorbia heterophylla*): produção massal e integração com herbicidas químicos. Tese de mestrado. Departamento de Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa. 2004.

WAGGONER, P. E. & HORSFALL, J. G. EPIDEM. A simulator of plant disease written for a computer. *Bulletin of the Connecticut Agricultural Experiment Station*, New Haven. 1969.

WALKER, H. L. Production of spore for fields studies. U.S. Department of Agriculture. Science and Education Administration Advanced in Agricultural Tecnology. 1980.

WALKER, H. L. Seedling blight of sicklepod caused by *Alternaria cassiae*. Plant Disease 66:426-428. 1982.

Tabela 1. Hospedeiro, procedência, forma e idade de armazenamento de isolados de *Alternaria solani*

Isolado	Hospedeiro	Origem	Armazenamento ^a	Data da coleta
AS04/001	batata	Carandaí/MG	PF (-80°C)	Junho 2004
AS04/002	tomate	Carandaí/MG	PF (-80°C)	Junho 2004
AS04/003	batata	Domingos Martins/ES	PF (-80°C)	Junho 2004
AS04/004	tomate	Viçosa/MG	PF (-80°C)	Junho 2004
AS04/005	batata	Bueno Brandão/MG	PF (-80°C)	Maio 2004
AS04/006	batata	Ibiá/MG	PF (-80°C)	Julho 2004
AS04/007	tomate	Venda Nova do Imigrante/ES	PF (-80°C)	Junho 2004
AS04/008	tomate	Planaltina/GO	PF (-80°C)	Junho 2004
ASA09	batata	Ponta Grossa/PR	ADE	Abril 2000
ASA10	tomate	Ponta Grossa/PR	ADE	Abril 2000
ASA12	tomate	Viçosa/MG	ADE	Julho 2000
ASA16	tomate	Coimbra/MG	ADE	Maio 2000
ASA43	tomate	Itaperuna/RJ	ADE	Junho 2000
ASA45	tomate	Tocantins/MG	ADE	Julho 2000
ASA46	tomate	Tocantins/MG	ADE	Julho 2000
ASA53	tomate	Cajuri/MG	ADE	Agosto 2000
ASA54	tomate	Marília/SP	ADE	Agosto 2000
UFV 22-FF	tomate	Viçosa/MG	BDA	Agosto 2000
Isolado	tomate	Coimbra/MG	BDA	Junho 2004
CE 20	tomate	Não identificada	SG	nd ^b 1999

^a PF, ADE, BDA, SG = papel filtro, água destilada esterilizada, meio batata-dextrose-ágar e sílica gel, respectivamente.

^b nd = mês não determinado.

Tabela 2. Esporulação de isolados de *Alternaria solani* em meio V8 ágar/ CaCO₃ em placas mantidas sem tampa.

Isolado	Repetição 1	Repetição 2
AS04/001	3,72 ^a (0,74) ^b	2,79 (0,74)
AS04/002	11,46 (3,81)	4,16 (0,69)
AS04/003	6,17 (1,61)	5,99 (2,70)
AS04/004	5,49 (0,68)	4,07 (0,54)

^a Conídios x 10⁵/ml, média de cinco valores.

^b Erro padrão da média (x10⁵).

Tabela 3. Esporulação de quatro isolados de *Alternaria solani* em diferentes meios de cultura, em que se adicionou CaCO₃ (pH=7,5) ou não (pH=6,5), em duas repetições do experimento (R1 e R2).

		Meio de Cultura							
	CaCO ₃ /pH	BDA		V8		CVA		CA	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
AS04/001	- ^{*4} /6,5	5,04 ^{*3} A* a	5,10 A a**	4,49 A ab	4,87 A b	4,43 A b	4,64 A c	4,35 A b	4,63 A c
	+/7,5	4,42 B a	4,71 B a	4,68 A a	4,70 A a	3,96 A b	4,76 A a	4,32 A ab	4,49 A b
AS04/002	-/6,5	4,98 A a	5,10 A a	4,73 A ab	4,89 A a	4,24 A b	4,98 A a	4,27 A b	4,80 A a
	+/7,5	4,26 B ab	4,68 B b	4,15 B b	4,82 A ab	4,70 A a	5,10 A a	3,96 A b	4,42 B b
AS04/003	-/6,5	4,57 A a	4,48 A ab	2,85 A b	4,73 A a	2,77 A b	4,58 A a	2,99 A b	4,05 A b
	+/7,5	4,31 B a	3,98 B b	2,87 A b	4,32 A ab	2,36 A b	4,60 A a	3,11 A b	3,44 B c
AS04/004	-/6,5	5,24 A a	5,13 A a	4,48 A b	4,58 A b	4,49 A b	3,94 A c	4,77 A b	4,30 A b
	+/7,5	3,92 B b	4,40 B a	4,62 A a	4,30 A b	4,91 A a	4,04 A b	3,77 B b	3,96 B b

* Para um mesmo isolado, meio de cultura e repetição do experimento, médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem entre si (teste de F, $\alpha=0,05$).

** Para um mesmo isolado, nível de pH e repetição do experimento, médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si (teste de F, $\alpha=0,05$).

^{*3} esporulação=log10(número de conídios+1). Médias de três valores.

^{*4} = - sem CaCO₃; + com CaCO₃.

Tabela 4. Valores de F e, entre parênteses, nível de significância, para diferenças entre médias de esporulação de quatro isolados de *Alternaria solani* cultivados em quatro meios de cultura com adição de CaCO₃ (pH=7,5) ou não (pH= 6,5), em duas repetições do experimento (1 e 2)

Isolado	Repetição	Meio de Cultura				
		BDA	V8 ágar	CVA	CA	Todos
AS04/001	1	12,58*	1,16	7,11	0,01	6,91
		(0,0027)	(0,2982)	(0,0169)	(0,9059)	(0,0182)
	2	53,60	11,10	4,84	7,86	31,68
		(<0,0001)	(0,0042)	(0,0429)	(0,0127)	(<0,0001)
AS04/002	1	26,28	16,63	10,64	4,95	16,72
		(<0,0001)	(0,0009)	(0,0049)	(0,0409)	(0,0009)
	2	17,21	0,38	1,12	14,47	12,85
		(0,0009)	(0,5443)	(0,3070)	(0,0017)	(0,0027)
AS04/003	1	0,67	0,00	1,60	0,12	0,71
		(0,4246)	(0,9628)	(0,2244)	(0,7297)	(0,4122)
	2	13,28	8,97	0,03	19,32	29,49
		(0,0022)	(0,0086)	(0,8637)	(0,0005)	(<0,0001)
AS04/004	1	65,54	0,73	6,77	37,58	29,00
		(<0,0001)	(0,4064)	(0,0192)	(<0,0001)	(<0,0001)
	2	67,43	10,13	1,38	14,77	49,43
		(<0,0001)	(0,0058)	(0,2570)	(0,0014)	(<0,0001)

*As médias para o teste foram obtidas de três valores.

Tabela 5. Esporulação, germinação de conídios e frequência de infecção (número de lesões/número de conídios depositados no folíolo) x 100, de 20 isolados de *Alternaria solani*.

Isolado	Esporulação ^a	Germinação ^b	Frequência de infecção ^c		
			Terço superior	Terço médio	Terço inferior
AS04/001	8,8 (3,4) ^d	97 (0,67) ^e	0,30 (0,18) ^e	13,12 (2,30)	9,26 (3,45)
AS04/002	10,5 (9,1)	98 (0,33)	0,35 (0,11)	1,06 (0,42)	0,17 (0,06)
AS04/003	3,1 (1,6)	96 (0,88)	0,10 (0,05)	3,19 (0,47)	6,40 (2,64)
AS04/004	10,4 (5,3)	98 (0,00)	0,11 (0,07)	0,19 (0,08)	0,07 (0,04)
AS04/005	21,0 (12,0)	99 (0,58)	2,21 (0,54)	2,47 (0,57)	2,27 (0,38)
AS04/006	6,3 (1,7)	86 (2,33)	4,30 (1,24)	7,84 (3,35)	5,77 (2,32)
AS04/007	20,2 (13,5)	99 (0,33)	0,04 (0,02)	0,23 (0,06)	0,13 (0,04)
AS04/008	53,6 (3,0)	96 (0,58)	5,52 (2,33)	2,84 (0,69)	1,75 (0,42)
ASA09	5,34 (3,4)	99 (0,67)	10,08 (5,54)	2,01 (0,36)	2,92 (0,70)
ASA10	2,1 (1,5)	97 (1,20)	0,13 (0,08)	0,42 (0,20)	0,05 (0,02)
ASA46	13,9 (5,5)	99 (0,33)	1,35 (0,22)	2,72 (0,54)	1,23 (0,42)
ASA53	10,2 (3,9)	90 (0,58)	0,04 (0,02)	0,00 (0,00)	0,03 (0,01)
ASA54	13,48 (10,0)	96 (1,20)	0,16 (0,06)	0,48 (0,25)	0,56 (0,16)
ASA12	2,3 (0,6)	96 (0,00)	0,18 (0,03)	0,29 (0,12)	0,25 (0,15)
ASA16	6,6 (2,3)	99 (0,00)	0,18 (0,05)	0,10 (0,07)	0,12 (0,08)
ASA43	10,84 (4,9)	99 (0,33)	0,05 (0,02)	0,04 (0,01)	0,12 (0,08)
ASA45	6,44 (1,9)	98 (0,58)	0,55 (0,27)	0,55 (0,15)	0,14 (0,05)
CE 20	8,26 (4,8)	92 (0,33)	0,26 (0,11)	0,10 (0,04)	0,07 (0,02)
UFV 22FF	12,48 (14,2)	98 (0,58)	0,02 (0,01)	0,05 (0,02)	0,03 (0,01)
COIMBRA	31,58 (12,1)	98 (0,33)	0,05 (0,03)	0,28 (0,08)	0,16 (0,11)
Controle- 1					
AS04/007	11,04 (3,4)	98 (0,33)	0,03 (0,02)	0,09 (0,02)	0,07 (0,01)
Controle- 1					
AS04/008	6,84 (1,5)	98 (0,88)	3,54 (0,79)	3,18 (0,63)	1,44 (0,32)
Controle- 2					
AS04/007	9,94 (3,4)	98 (0,33)	0,02 (0,01)	0,07 (0,01)	0,07 (0,03)
Controle- 2					
AS04/008	7,44 (1,9)	98 (0,33)	0,07 (0,02)	0,29 (0,06)	0,20 (0,06)

^a Média de cinco valores (conídios x 10⁴ /ml ADE).

^b Média de três valores (%).

^c Média de nove valores, representando três repetições/terço de planta, total de três plantas (%).

^d Valores entre parênteses representam o erro padrão da média (x 10³).

^e Valores entre parênteses representam o erro padrão da média.

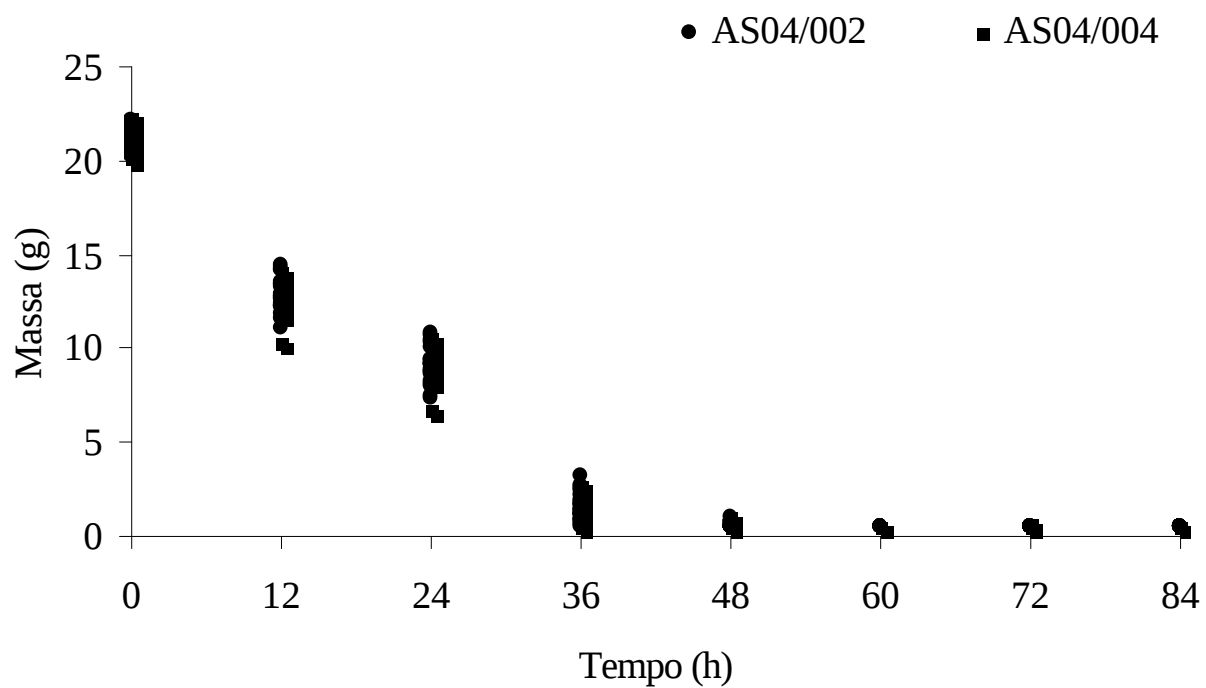


Figura 1 – Massa (micélio + meio de cultura) dos isolados AS04/002 e AS04/004 de *Alternaria solani* quando permaneceram sob desidratação, em placas de Petri sem tampas, por 84 h.

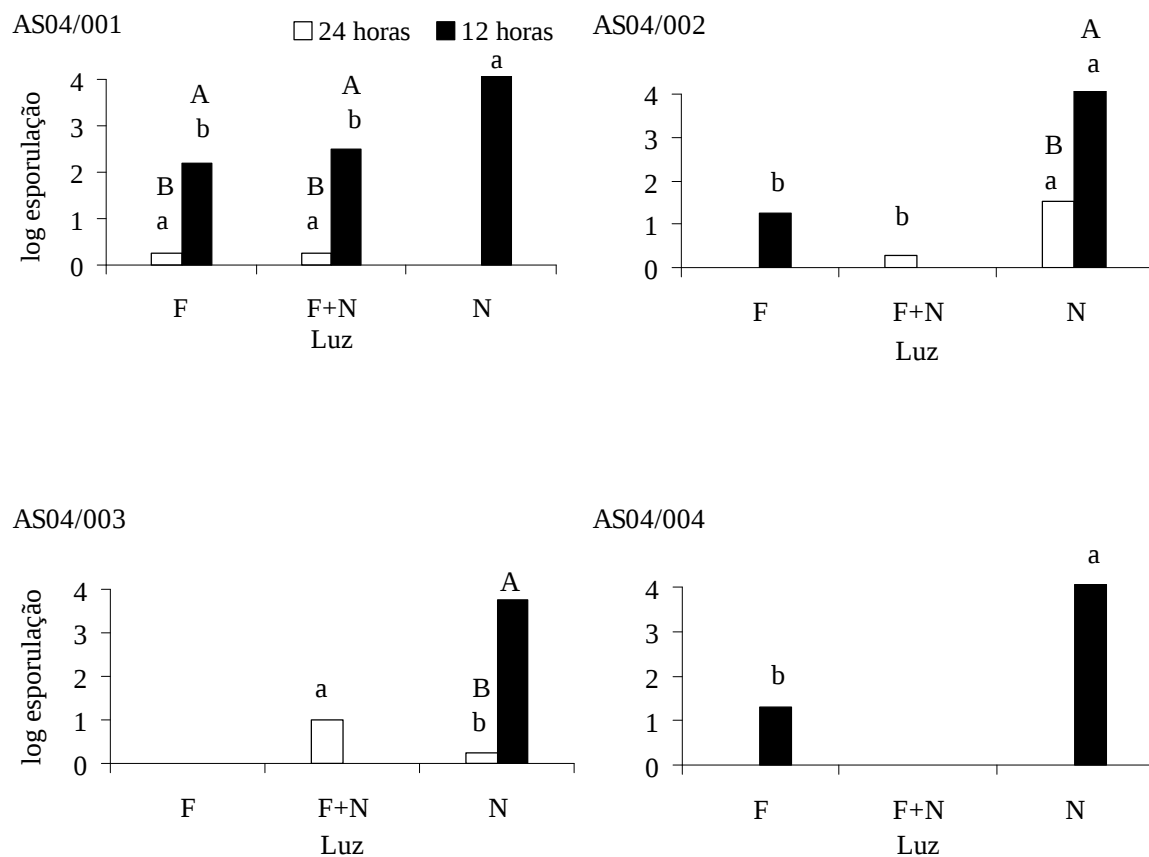


Figura 2 – Logarítmo do número de conídios de *Alternaria solani* sob luz fluorescente (F), luz fluorescente e negra (F+N) ou luz negra (N) e fotoperíodo de 12 ou 24h. Barras seguidas por letras maiúsculas iguais para um mesmo tipo de luz representam médias que não diferem entre si (teste de F, $\alpha = 0,05$). Barras seguidas por letras minúsculas iguais para um mesmo fotoperíodo representam médias que não diferem entre si (teste de F, $\alpha = 0,05$).

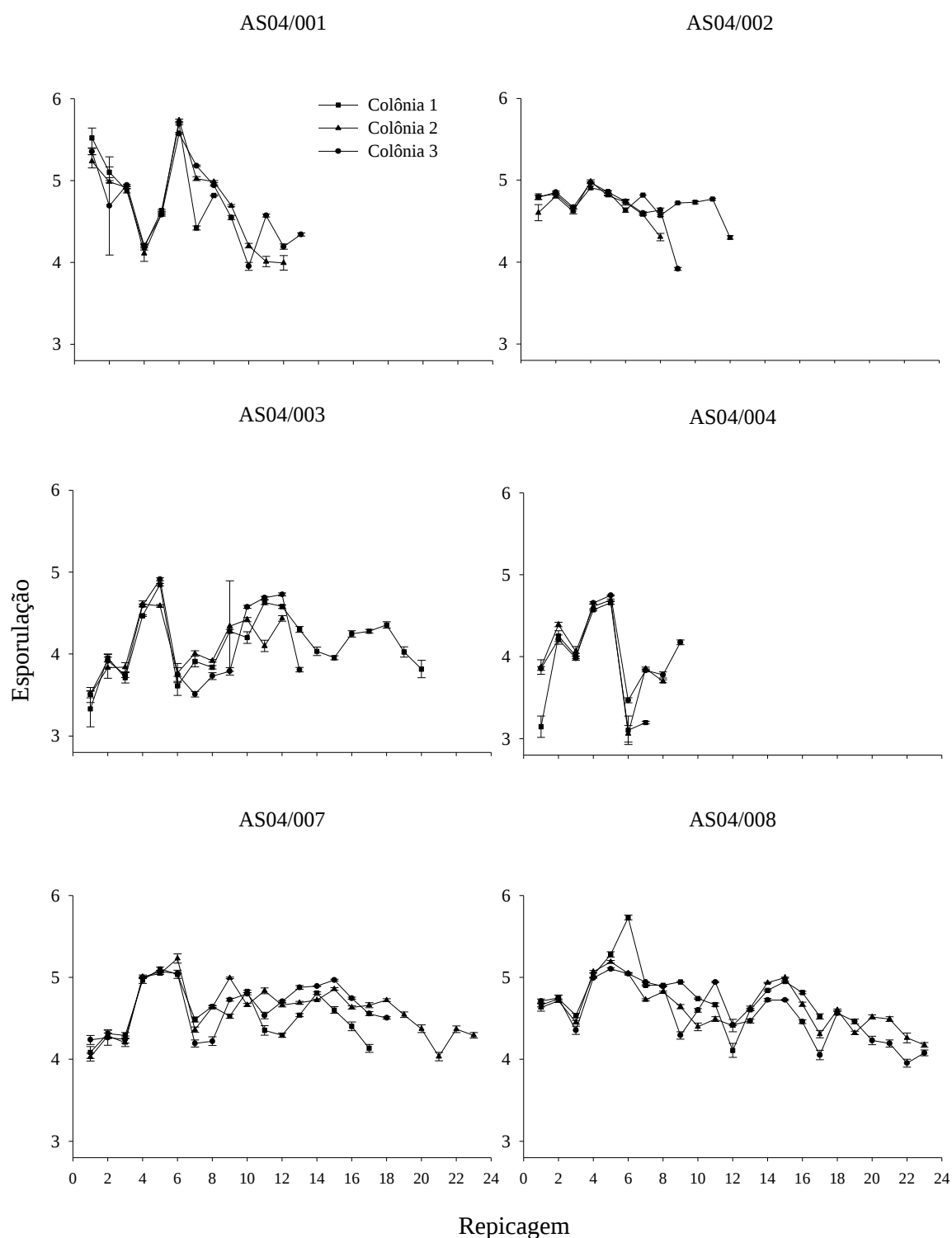


Figura 3 – Esporulação [log (número de conídios/ml)] de seis isolados de *Alternaria solani* em 24 repicagens periódicas. Colônias 1, 2 e 3 são triplicatas avaliadas em cada repicagem. Barras representam o desvio padrão da média.