

MIGUEL ANGEL DITA RODRÍGUEZ

COMPONENTES DA RESISTÊNCIA DE BATATA A
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 “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
Março- 2003

**COMPONENTES DA RESISTÊNCIA DE BATATA A *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 “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 14 de março de 2003.

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Conselheiro)

Prof. Kiyoshi Matsuoka
(Conselheiro)

Prof. Wagner Campos Otoni

Dra. Cleide Maria Ferreira Pinto

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Orientador)

Sempre há uma luz, mas é preciso acreditar que existe, procurá-la e convencê-la de que nos também a merecemos.

*Cada hombre trae en sí el deber de añadir, de domar, de revelar.
Son culpables las vidas empleadas en la repetición cómoda de las verdades descubiertas.*

José Martí

Dedico

Aos meus Pais e Irmãos pelo amor e presença em cada passo decisivo.

A todos os que confiaram em mim e sonharam com esta obra, não é preciso dizer nomes, eles sabem quem são.

Ao pequeno Angel que sempre me cuida e alerta: YONIEL.

AGRADECIMENTOS

Ao povo brasileiro no nome da CAPES por me acolher como um filho e financiar meus estudos por estes longos e proveitosos quatro anos, e ao glorioso povo cubano pela proeza de ter-me conduzido até aqui.

À Universidade Federal de Viçosa, no nome do DFP por ter me dado a oportunidade de realizar um sonho, um dos maiores com certeza.

Ao Instituto de Biotecnologia de las Plantas, especialmente ao Dr. Rafael Gómez Kosky por ter propiciado minha vinda para o Brasil.

Ao Prof. Lidcay Herrera Isla, por ter-me ensinado os primeiros passos na Fitopatologia, ciência à que sem reparos, quero dedicar a minha vida.

Aos Doutores Ailton Reis, Antônio Torres e Vera Hamahiga, pelo fornecimento do material vegetal.

Ao Prof. Sérgio H. Bromonschenkel pelos ensinamentos durante a orientação de esta obra e apoio determinante na redação do documento.

Aos Professores e amigos Kiyoshi Matsuoka, Eduardo S. Mizubuti e Wagner Otoni pelos sábios conselhos e gratificantes discussões científicas.

Ao Prof. Acelino, pela amizade e a forma com que facilitou minha vinda para o Brasil.

Aos estudantes de agronomia Mariana H., Edgar P., André N. e Bruno pelo valioso apoio (sem vocês todo teria sido mais difícil, OBRIGADO).

Aos colegas de Laboratório por compartilhar tudo este tempo, principalmente ao Julio C. Oliveira, pela paciência nos iniciais “Molecular tools”,

ao DLau pela força e proveitosas brigas de idéias, à Miki pela “altives” diária, ao Luis e à Márcia pelo apoio incondicional e disposição determinante. À Claudia Vanetti e Jânia Lília, pela ajuda nos trabalhos de citologia.

Aos colegas com quem morei pela contribuição no crescimento pessoal e por ter ajudado nos momentos de pouco combustível espiritual.

A KIMI, simple y decisivamente por el AMOR.

BIOGRAFIA

MIGUEL ANGEL DITA RODRIGUEZ, filho de Bartolomé Dita Ruiz e Aracelia Rodríguez López, nasceu em 7 de junho de 1969, em Quemado de Güines, Província de Villa Clara, CUBA.

Em Julho 1995, graduou-se em Agronomia, pela Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, CUBA.

Em setembro de 1998, concluiu o curso de Mestrado em Biotecnologia Vegetal, no Instituto de Biotecnologia de las Plantas, da Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, CUBA.

Em Março de 1999, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do Professor Sérgio H. Brommonschenkel.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	2
2.1. Material vegetal	2
2.2. Obtenção dos isolados de <i>A. solani</i> e preparo do inóculo.....	2
2.3. Inoculação	7
2.4. Avaliação dos componentes epidemiológicos da resistência.....	8
2.4.1. Período de incubação (PI).....	8
2.4.2. Número de lesões (NL)	8
2.4.3. Severidade da doença.....	8
2.4.4. Taxa de expansão da lesão (TEL)	9
2.4.5. Número de esporos por área de tecido foliar afetado (NEAA)	9
2.4.6. Período latente (PL)	9
2.5. Estudo do processo de infecção de <i>A. solani</i> em batata.....	10
2.5.1. Inoculação.....	10
2.5.2. Diafanização de tecidos e avaliação dos componentes microscópicos da resistência.....	10

2.5.2.1. Número de conídios germinados	11
2.5.2.2. Número de apressórios.....	11
2.5.2.3. Número de penetrações por estômatos	11
2.5.2.4. Número de penetrações ocorrendo de forma direta.....	11
2.5.2.5. Número de sítios de penetração com células exibindo reação de hipersensibilidade (HR)	12
2.5.3. Microscopia eletrônica de varredura	12
2.6. Estudo da expressão diferencial de genes que codificam para proteínas relacionadas à patogênese (PR)	13
2.6.1. Inoculação e coleta das amostras	13
2.6.2. Extração de RNA e análise “Northern Blotting”	13
2.6.2.1. Extração de RNA total	13
2.6.2.2. Análise de “Northern Blotting”	14
2.7. Análise estatística	15
3. RESULTADOS.....	17
3.1. Avaliação de componentes epidemiológicos da resistência.....	17
3.2. Estudo do processo de infecção de <i>Alternaria solani</i> em batata	24
3.2.1. Descrição do processo de infecção de <i>A. solani</i> em batata	24
3.2.2. Avaliação dos componentes microscópicos da resistência.....	28
3.3. Estudo da expressão diferencial de genes que codificam para proteínas relacionadas à patogênese (PR)	32
4. DISCUSSÃO	37
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Período de incubação (horas) de <i>A. solani</i> nos terços inferior, médio e superior de quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta inoculadas com 10^3 conídios.mL ⁻¹ de <i>A. solani</i> . Os valores apresentados correspondem ao número médio de horas após inoculação onde foram observados sintomas em todas as plantas de cada cultivar	18
Tabela 2 - Número de lesões causadas por <i>Alternaria solani</i> nos terços inferior, médio e superior de quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta inoculadas com 10^3 conídios.mL ⁻¹ . Os valores apresentados correspondem à média do número de lesões em três folhas por terço de 15 plantas por cultivar	19
Tabela 3 - Comparação entre as estimativas do parâmetro b1 das equações de regressão lineal utilizadas para calcular a taxa de expansão das lesões (cm ² .dia ⁻¹) em cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta, inoculadas com <i>Alternaria solani</i> (10^3 conídios.mL ⁻¹). Os valores apresentados correspondem à diferença entre o valor b1 de Desirée (“baseline”) e o de cada cultivar comparado	20
Tabela 4 - Quantificação dos componentes microscópicos da resistência no processo de infecção de <i>Alternaria solani</i> em quatro cultivares de batata às 36 horas após a inoculação. Os dados do número de conídios germinados correspondem à média de três repetições em uma área avaliada de 2 cm ² /repetição. Os valores referentes às variáveis apressórios, penetrações diretas e de sítios de penetração com células exibindo HR correspondem a proporções calculadas em relação ao número de conídios germinados	31

Tabela 5 - Quantificação dos componentes microscópicos da resistência de terços de quatro cultivares de batata ao processo de infecção de <i>Alternaria solani</i> , às 36 horas após a inoculação. Os valores do número de conídios germinados correspondem à média dos quatro cultivares. Os valores referentes às variáveis apressórios, penetrações diretas e de sítios de penetração com células exibindo HR correspondem a proporções calculadas em relação ao número de conídios germinados.....	32
Tabela 6 - Número de lesões causadas por <i>Alternaria solani</i> nos terços inferior e superior de dois cultivares de batata Aracy (Resistente) e Bintje (Suscetível) inoculadas com 10^3 conídios.mL ⁻¹ . ^a Valores correspondem à média do número de lesões em três folhas por terço de 5 plantas por cultivar	32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Área lesionada média (cm²) em função do tempo decorrido após a inoculação com *Alternaria solani* (10³ conídios.mL⁻¹) em quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta. **A.** Terço inferior. **B.** Terço médio. **C.** Terço superior 21
- Figura 2 - Área abaixo da curva de progresso da doença, por terço, em quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta inoculadas com 10³ conídios.mL⁻¹ de *Alternaria solani*. Foram realizadas avaliações a cada três dias desde o 5^o até o 20^o dia após a inoculação. Barras com a mesma letra dentro de um mesmo terço não diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 22
- Figura 3 - Folhas de cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta mostrando lesões de causadas por *Alternaria solani* doze dias após a inoculação (10³ conídios.mL⁻¹ em plantas). **A.** Terço superior. **B.** Terço médio. **C.** Terço inferior 23
- Figura 4 - Fotomicrografias de eventos de pré-penetração de *Alternaria solani* em batateira cultivar Bintje. **A.** Conídio (c) mostrando tubos germinativos (tg) longos; 12 horas após a inoculação (h.a.i). **B.** Conídio (c) com tubo germinativo (tg); 24 h.a.i. e papila (p). **C.** Apressórios (a) terminais formados próximos do estômato (e); 24 h.a.i. **D.** Formação de dois apressórios laterais em um mesmo tubo germinativo com um ponto de penetração (pp); 24 h.a.i 25

- Figura 5 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura do processo de infecção de *Alternaria solani* no cultivar Bintje às 24 horas após a inoculação. **A e B** conídio (c) germinando com formação de apressório (a) nas junções das células epidérmicas. **C.** Hifa (h) aderida na superfície foliar sugerindo a presença de matriz extracelular envolvida na aderência ao tecido. **D.** Hifa (h) com formação de apressório (a). As setas indicam pontos com aparente adesão da hifa à superfície foliar 26
- Figura 6 - Fotomicrografias de eventos de pós-penetração de *Alternaria solani* em batateira às 36 horas após a inoculação. **A.** Conídio germinado e penetrando em dois sítios diferentes no cultivar Bintje. Nota-se a necrose do tecido colonizado. **B.** Célula do cultivar Bintje com micélio intracelular (mi) mais grosso que a hifa de penetração. **C.** Apressório (a) e penetração por estômato (e) no cultivar Aracy. Nota-se a célula reagindo com HR. **D.** Célula do cultivar Aracy penetrada diretamente exibindo HR. **E.** Apressório (a) em fase inicial de penetração direta com a célula exibindo HR, cultivar Aracy. **F.** Célula do cultivar Aracy reagindo com granulações citoplasmáticas (gc), evidenciando a ocorrência de HR 27
- Figura 7 - Variação no número de células por área de tecido foliar em diferentes tecidos de batateira cultivar Bintje. **A.** Células epidérmicas de folíolo do terço inferior. **B.** Células do tecido paliçádico de folíolo do terço inferior. **C.** Células epidérmicas de folíolo do terço médio. **D.** Células do tecido paliçádico de folíolo do terço médio. **E.** Células epidérmicas de folíolo do terço superior. **F.** Células do tecido paliçádico de folíolo do terço superior 29
- Figura 8 - Análise eletroforética do RNA total isolado de tecido foliar de dois cultivares de batata, Aracy (resistente) e Bintje (suscetível) coletado em diferentes tempos após a inoculação com *Alternaria solani* (10^3 conídios.mL⁻¹). Em cada canaleta foram carregados 10 ug de RNA total, que foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,2%) contendo 20 mM de ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico (MOPS), 5 mM de acetato de sódio, 1 mM de EDTA, pH 7,0, 100mgL⁻¹ de brometo de etídio e 18 mL/L de formaldeído 37% (12,3 M). A corrida eletroforética foi realizada a 80 V, durante 4 horas 33

- Figura 9 - Expressão de genes homólogos ao da glucanase básica de tabaco (*gluB*) e da quitinase básica de feijão (*chiB*) no terço inferior dos cultivares Aracy (Resistente) e Bintje (Suscetível) inoculadas com 10^3 conídios.mL⁻¹ de *Alternaria solani*. Para cada amostra empregaram-se 10 µg de RNA total. O RNA foi fracionado por eletroforese em gel de agarose, transferido para membrana Hybond-N+ (*Amersham Pharmacia*) e hibridizado durante 24 horas, a 65 °C, com os cDNA dos genes *gluB* e *chiB* marcados com [³²P]. A autoradiografia foi realizada a -80°C durante sete dias utilizando filmes Kodak-BioMax..... 34
- Figura 10 - Expressão de genes análogos ao da glucanase básica do tabaco (*gluB*) e da quitinase básica do feijão (*chiB*) no terço superior dos cultivares Aracy (Resistente) e Bintje (Suscetível) inoculadas com 10^3 conídios.mL⁻¹ de *Alternaria solani*. Para cada amostra empregaram-se 10 µg de RNA total. O RNA foi fracionado por eletroforese em gel de agarose, transferido para membrana Hybond-N+ (*Amersham Pharmacia*) e hibridizado durante 24 horas, a 65 °C, com os cDNA dos genes *gluB* e *chiB* marcados com [³²P]. A autoradiografia foi realizada a -80°C durante sete dias utilizando filmes Kodak-BioMax..... 35

RESUMO

DITA RODRIGUEZ, Miguel Angel, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2003. **Componentes da resistência de batata a *Alternaria solani***. Orientador. Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Kiyoshi Matsuoka.

Visando entender os mecanismos envolvidos na resistência de quatro cultivares de batata à pinta preta, esse trabalho teve por objetivos: 1) quantificar os componentes epidemiológicos da resistência dos cultivares Aracy, Delta, Desirée e Bintje que apresentam diferentes níveis de resistência à pinta preta, e estudar o efeito da idade dos tecidos nesses componentes; 2) realizar a análise histológica do processo infeccioso nesses cultivares, visando identificar possíveis mecanismos estruturais e relacionados com os níveis de resistência dos cultivares, e com a resistência de tecidos jovens; 3) verificar se a expressão diferencial de genes homólogos aos genes que codificam as proteínas PR gluB (glucanase básica de tabaco) e chiB (quitinase básica de feijão) respectivamente, se correlaciona com os níveis de resistência dos cultivares analisadas, e com a maior resistência dos tecidos jovens. Os componentes epidemiológicos da resistência, período de incubação (PI), número de lesões (NL), a severidade, taxa de expansão das lesões (TEL), período latente (PL) e o número de esporos por área foliar afetada (NEAA) foram quantificados nos terços inferior, médio e superior de plantas dos cultivares Aracy (resistente), Delta (resistência intermediária), Desirée

(suscetível) e Bintje (suscetível) inoculadas com *Alternaria solani* numa concentração de 10^3 conídios.mL⁻¹. No cultivar Aracy constatou-se maior PI, redução do NL, da TEL e conseqüentemente da severidade em todos os terços avaliados. Já o menor NL, TEL, e severidade no terço médio explicam a resistência moderada do cultivar Delta. O cultivar Desirée, classificado como suscetível, apresentou, no terço superior, NL e severidade similar ao cultivar Aracy. O PL e o NEAA não foram adequados para a avaliação da resistência em condições de casa de vegetação e, provavelmente, foram influenciados pela falta de molhamento foliar. Todos os componentes foram influenciados pela idade dos tecidos. Maior PI e menores valores de NL, TEL, severidade e AACPD foram observados no terço superior, comprovando a menor suscetibilidade desses tecidos. Foram efetuados estudos histológicos do processo infeccioso de *A. solani* nas diferentes cultivares e terços usando a técnica de diafanização de tecidos. Foi quantificado o número de conídios germinados, número de apressórios, número de penetrações diretas e número de sítios de penetração exibindo células com reação de hipersensibilidade (HR). Não se constatou mecanismos de resistência que pudessem ser associados com os níveis de resistência dos cultivares estudados, nem com a maior resistência dos tecidos jovens. Constatou-se uma relação positiva entre o número de sítios de penetração mostrando HR e a resistência do cultivar Aracy. Houve associação desse componente com a resistência dos tecidos jovens. A expressão de genes homólogos à glucanase básica de tabaco (*gluB*) e à chitinase básica de feijão (*chiB*) como resposta a infecção de *A. solani*, foi analisada nos terços inferior e superior dos cultivares Bintje e Aracy, mediante a técnica de “Northern Blotting”. Um aumento na expressão de transcritos a *gluB* e *chiB* foi constatado no terço inferior do cultivar Aracy, mas não em Bintje. Esse padrão de expressão sugere um possível envolvimento de isoformas destes genes com a resistência de Aracy a *A. solani*. Essa expressão diferenciada, não foi observada em folhas do terço superior desse cultivar sugerindo um padrão de regulação gênica dependente da idade dos tecidos, e o envolvimento de outros mecanismos bioquímicos na resistência dos tecidos jovens.

ABSTRACT

DITA RODRIGUEZ, Miguel Angel, D.S., Universidade Federal de Viçosa, march, 2003. **Resistance components of potato to *Alternaria solani***. Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Committee Members: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Kiyoshi Matsuoka.

The resistance components of four potato cultivars to *Alternaria solani* were studied in three different levels: 1) quantification of epidemiological components related to resistance in cultivars Aracy, Delta, Desirée, and Bintje, and the effect of age-related resistance in these components; 2) histological analysis of the infectious process in these cultivars, aiming at identifying possible structural mechanisms related to resistance; 3) differential expression of genes homologous to *gluB* (basic glucanase of tobacco) and *chiB* (basic chitinase of bean) that encode pathogenesis-related proteins (PR) and the correlation between gene expression levels and cultivar/tissue age resistance levels. The epidemiological components related to resistance, incubation period (PI), number of lesions (NL), early blight severity, lesion expansion rate (TEL), latent period (PL), and the number of spores produced by lesion area (NEAA) were quantified in the lower, middle, and upper parts of cultivars Aracy (resistant), Delta (intermediate resistance), Desirée (susceptible), and Bintje (susceptible) inoculated with a suspension of 10^3 conidia of *A. solani*.mL⁻¹. Longer PI, reduced NL, low TEL, and low severity were recorded in Aracy in all parts of the plant. For 'Delta', the reduced NL, low TEL and severity on the middle part of the plant corroborates its intermediate resistance level. Desirée is a susceptible cultivar, but NL and severity on the upper part did not differ from

Aracy. The PL and NEAA were not informative when assessing resistance under greenhouse conditions. Probably, PL and NEAA were influenced by the shortage or lack of leaf wetness. All components were influenced by tissue age. Longer PI and smaller values of NL, TEL, and severity were observed in the upper leaves, indicating higher resistance of these tissues. Histological analyses of the infectious process of *A. solani* in different cultivars were carried out by tissue discoloration. The number of germinated conidia, number of apressoria, number of direct penetrations, and number of penetration sites with cells exhibiting hypersensitive reaction (HR) were quantified. No mechanisms of resistance were associated with cultivar resistance levels or with tissue age. For cultivar Aracy there was a direct relationship between number of penetration sites showing HR and cultivar resistance. The number of sites with HR was also associated with resistance of young tissues. The expression of *gluB* and *chiB* in response to *A. solani* infection was analyzed in the lower and upper parts of 'Bintje' and 'Aracy' plants by Northern blotting analysis. An increase in the level of transcripts related to *gluB* and *chiB* was recorded in the lower part of Aracy, but not in Bintje. Differential expression suggests the involvement of isoforms of these genes in Aracy resistance. Differential expression was not observed in leaves of the upper part of Aracy suggesting an age-dependent gene regulation process and/or the involvement of other biochemical mechanisms associated with young tissue high resistance level.

1. INTRODUÇÃO

A pinta preta, causada pelo fungo *Alternaria solani* Sor., é a principal doença fúngica que afeta a batata (*Solanum tuberosum* L.) em condições tropicais, sendo de particular importância em vários países da Ásia, África e América Latina (HOOKER, 1980; PIÑA, 1980; PELLETIER e FRY, 1989; CHRIST, 1991; SHTIENBERG *et al.*, 1990). A doença pode causar desfolha precoce das plantas, reduzindo o seu ciclo vegetativo. Em condições favoráveis, redução de até 30% da produção tem sido relatada (CHRIST e MACZUGA, 1989; SHTIENBERG *et al.*, 1990).

O controle da doença baseia-se principalmente na aplicação de fungicidas (WEINGARTNERT, 1981; CHRIST, 1989; STEVENSON, 1994). Os custos desta prática podem representar mais de 10% do custo total de produção (REIFSCHNEIDER *et al.*, 1989). Embora o emprego de cultivares resistentes seja uma medida eficiente no controle da pinta preta, os cultivares resistentes disponíveis não possuem boas características comerciais (REIFSCHNEIDER *et al.*, 1985; BOITEUX *et al.*, 1995).

A resistência à pinta preta é do tipo quantitativa o que dificulta a obtenção de variedades comerciais resistentes (FRANK *et al.*, 1979; HERRIOTT *et al.*, 1990; CRIST e HAYNES, 2001). A separação dos genótipos segregantes em classes suscetíveis e resistentes é difícil. A resistência é afetada pela idade dos tecidos, e está associada à duração do ciclo vegetativo. Tecidos mais velhos são mais suscetíveis, sendo as partes jovens mais

resistentes (DOUGLAS e PAVEK, 1972; BROGGIO e RANUCCI, 1992; STEVENSON, 1994; ROTEM, 1994). Após o início da fase de tuberação, a suscetibilidade das plantas aumenta gradualmente (SHTIENBERG *et al.*, 1990). Os cultivares de ciclo longo apresentam elevado crescimento vegetativo, maior resistência, mas baixos níveis de produção, enquanto que cultivares de ciclo curto apresentam menor crescimento vegetativo, elevada produtividade, mas alta suscetibilidade (HARRISON *et al.*, 1965; DOUGLAS e PAVEK, 1972; JOHANSON e THURSTON, 1990; MIHOVILOVICH *et al.*, 1990; BOITEUX *et al.*, 1995).

O entendimento dos mecanismos citológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos na resistência da batata a *A. solani* poderia auxiliar e acelerar o desenvolvimento de cultivares resistentes. Por exemplo, por meio do cruzamento de cultivares que apresentem diferentes mecanismos de resistência pode ser possível selecionar genótipos mais resistentes que os cultivares originais. Também seria possível, por meios de técnicas de engenharia genética e transformação de plantas, alterar o nível de expressão de genes em cultivares comerciais suscetíveis objetivando um maior nível de resistência à pinta preta.

O estudo dos componentes epidemiológicos da resistência, além de permitir a separação dos genótipos em classes quanto à resistência, pode fornecer evidências sobre os possíveis mecanismos envolvidos na resistência (PARLEVLIT, 1979). Os componentes epidemiológicos duração do período de incubação, taxa de expansão da lesão, produção de esporos por área de tecido foliar afetada, severidade e a receptividade dos tecidos à infecção da resistência têm sido avaliados em diferentes cultivares de batata (REIFSCHNEIDER *et al.*, 1985; PELLETIER e FRY, 1989; CHRIST, 1991; PELLETIER e FRY 1990; BRUNE *et al.*, 1994). De maneira geral os cultivares resistentes há um atraso no período de incubação, menor número de lesões e redução da taxa de colonização dos tecidos. Assim, foi constatado que no cultivar Rosa o período de incubação da pinta preta era maior do que nos cultivares Norchip e Kennebec (PELLETIER e FRY, 1989), e que a resistência do cultivar Aracy se caracterizava pela redução da taxa de progresso da doença (BOITEUX e REIFSCHNEIDER, 1993). Todavia, estudos utilizando os componentes epidemiológicos da resistência para efetuar inferências e estudar

sobre possíveis mecanismos envolvidos na resistência de batata à pinta preta não foram constatados.

A histopatologia da interação planta-patógeno é um recurso que permite identificar os eventos que ocorrem durante a patogênese, fornecendo informações úteis para o esclarecimento dos mecanismos de resistência do hospedeiro (MATSUOKA, 1988; LONGO *et al.*, 1994; ARAÚJO, 2000; GREEN e BAILEY, 2000; XI *et al.*, 2000; SILLERO e RUBIALES, 2002). A maioria dos trabalhos envolvendo espécies de *Alternaria* e seus hospedeiros, restringe-se à descrição do processo de infecção em hospedeiros suscetíveis, sendo escassos estudos de comparações entre hospedeiros resistentes e suscetíveis. Já foram estudados os eventos de germinação de conídios, a formação de apressórios, as formas de penetração, a ocorrência de matriz extracelular e os aspectos relacionados à colonização (ALLEN *et al.*, 1983a; Van DYKE e TRIGIANO, 1987; AVELING *et al.*, 1994; ROTEM, 1994; McROBERTS e LENNARD, 1996). A baixa formação de apressórios foi relatada como um fator associado à resistência de tomateiro a *A. solani* (ARAÚJO, 2000). A morte de células no sítio de penetração (reação de hipersensibilidade, HR) parece estar envolvida na resistência de plantas não-hospedeiras a esse patógeno (ARAÚJO, 2000) e de *Nicotiana bonariensis* a *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (BRANDWAGT *et al.*, 2001). Todavia, estudos histológicos comparando genótipos suscetíveis e resistentes, e tecidos de idades diferentes não têm sido efetuados na interação batata-*A. solani*.

A produção de compostos fenólicos, a destoxificação de toxinas, a produção de fitoalexinas, a ocorrência de reação de hipersensibilidade e o acúmulo de proteínas relacionadas com a patogênese (proteínas PR, “pathogenesis-related proteins”) são os principais mecanismos de resistência que atuam após a penetração de patógenos fúngicos (DANGL *et al.*, 1996; MULTANI *et al.*, 1998; HAMMERSSCHMIDT, 1999; Van LOON e Van STRIEN, 1999). As proteínas PR foram descritas pela primeira vez como uma resposta de defesa em plantas de tabaco mostrando reação de hipersensibilidade ao vírus do mosaico do tabaco (GIANINAZZI *et al.*, 1970; Van LOON e Van KAMMEN, 1970). Há diversos relatos do aumento dos níveis de expressão dessas proteínas como respostas à infecção causada por vírus (GIANINAZZI *et al.*, 1970; MCKENZIE *et al.*, 2002), bactérias (PALVA, *et al.*, 1993; ESNAULT *et*

al., 1993; DOW *et al.*, 2000), fungos (CARUSO *et al.*, 1999; LAWRENCE *et al.*, 2000; HOEGEN *et al.*, 2002), nematóides (RAHIMI *et al.*, 1996, 1998) e insetos (KRISHNAVENI *et al.*, 1999; MCKENZIE *et al.*, 2002; MAYER *et al.*, 2002). Fatores abióticos como ferimentos e o tratamento das plantas com elicitores químicos também aumentam os níveis de expressão de proteínas PR (SCHLAGNHAUFER *et al.*, 1997; COQUOZ *et al.*, 1995; SPLETZER e ENYEDI, 1999; ZHAO e CHYE, 1999; HENSEL *et al.*, 1999; ZIADI *et al.*, 2001).

As atividades de β -1,3-glucanase e de quitinase de algumas das proteínas PR e o fato de quitina e glucanos serem os principais componentes da parede celular de fungos, incluindo *A. solani* (BARTNICKI-GARCIA, 1964; WESSELS e SIETSMA, 1981), sugerem um papel direto dessas proteínas na resistência de plantas a fungos fitopatogênicos (LEGRAND *et al.*, 1987; KAUFFMANN *et al.*, 1987; LAWRENCE *et al.*, 1996). Essa atividade antifúngica das proteínas PR foi inicialmente comprovada pela ação *in vitro* de uma quitinase de feijão contra *Trichoderma viride* (SCHULUMBAUM *et al.*, 1986). Posteriormente, foi constatado o mesmo efeito contra fungos fitopatogênicos, bem como a ação antifúngica sinérgica de glucanases e quitinases (MAUCH *et al.*, 1988; SELA-BUURLAGE *et al.*, 1993; NIDERMAN *et al.*, 1995; JONGEDIJK *et al.*, 1995; LAWRENCE *et al.*, 1996; Van PELT-HEERSCHAP e SMIT-BAKKER, 1999). Estudos de análise de expressão gênica demonstraram também maior acúmulo e velocidade de indução dos genes que codificam proteínas PR em genótipos resistentes do que nos susceptíveis, após a inoculação de patógenos (LAWRENCE *et al.*, 1996; ANGUELOVA *et al.*, 1999; LAWRENCE *et al.*, 2000; VLEESHOUWERS *et al.*, 2000a). A expressão constitutiva dessas proteínas em plantas transgênicas leva a um aumento do nível de resistência a seus respectivos patógenos caracterizada por um menor número de lesões e redução da taxa de progresso da doença (BROGLIE *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 1994; ZHU *et al.* 1994; JONGEDIJK *et al.*, 1995; DATTA *et al.* 1999; GAO *et al.*, 2000; ROHINI e RAO, 2001; KISHIMOTO *et al.*, 2002).

Existem evidências de que proteínas PR também possam estar envolvidas com a resistência de plantas a *A. solani*, embora não existam estudos da expressão dessas proteínas em cultivares de batata com diferentes níveis de resistência e/ou em tecidos com diferentes idades fisiológicas. A ação antifúngica *in vitro* de glucanases e quitinases contra esse patógeno já foi

demonstrada (MAUCH *et al.*, 1988; LAWRENCE *et al.*, 1996) e estudos de expressão gênica no patossistema *A. solani* – tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) revelaram que o acúmulo dessas proteínas é maior em genótipos resistentes (LAWRENCE *et al.*, 1996, 2000). Além disso, em plantas de batata expressando o gene *ThEn42* de *Trichoderma harzianum* que codifica para uma quitinase (*chi42*), o número de lesões foi significativamente menor do que nas não transformadas (LORITO *et al.*, 1998).

Com base no exposto, este trabalho teve por objetivos: 1) quantificar os componentes epidemiológicos da resistência de quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta e estudar o efeito da idade fisiológica dos tecidos nesses componentes; 2) realizar a análise histológica do processo infeccioso nesses cultivares visando identificar possíveis mecanismos estruturais relacionados com os níveis de resistência desses cultivares e com a resistência de tecidos jovens; 3) verificar se a expressão diferencial de genes homólogos aos genes que codificam as proteínas PR gluB (glucanase básica de tabaco) e *chiB* (quitinase básica de feijão) se correlacionam com os níveis de resistência dos cultivares analisados, e com a maior resistência dos tecidos jovens.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram selecionados quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta. Como padrão resistente foi utilizado o cultivar Aracy. De resistência intermediária, o cultivar Delta, e como suscetíveis os cultivares Desirée e Bintje (REIFSCHNEIDER *et al.*, 1985), provenientes do Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (EMBRAPA, CNPH, Brasília, DF.). Tubérculos de aproximadamente 50 g foram plantados em vasos de plástico com capacidade de 8 L que foram mantidos em casa de vegetação por todo o ciclo da cultura. Como substrato, foi utilizado solo misturado com areia e esterco de curral, na proporção de 3:1:1, previamente esterilizado com brometo de metila.

2.2. Obtenção dos isolados de *A. solani* e preparo do inóculo

Foram efetuados isolamentos de *A. solani* a partir de plantas de batata com sintomas típicos da doença. Conídios presentes nos tecidos lesionados foram transferidos com ajuda de uma agulha entomológica e microscópio estereoscópico para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo ágar-água (1% p/v). O isolamento monospórico foi efetuado transferindo-se apenas um

conídio germinado em ágar-água para placa de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) suplementado com 50 mg.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina. As colônias que desenvolveram foram transferidas para tubos de ensaio com BDA e mantidas a 25°C, no escuro. Os isolados foram mantidos por repicagens mensais.

Para verificar a agressividade dos isolados obtidos, foram inoculadas plantas do cultivar Bintje, na fase de floração, com suspensão de 10³ conídios.mL⁻¹. A inoculação foi efetuada com auxílio de atomizador manual De Vilbiss. Avaliou-se a severidade da doença aos 10 dias após a inoculação com o uso da escala proposta por REIFSCHNEIDER *et al.* (1984) e selecionou-se o isolado ASA02 por ter causado maiores valores de severidade da doença. Este isolado foi utilizado em todos os ensaios posteriormente realizados. Para a obtenção do inóculo foi utilizado o método de esporulação desenvolvido por LUDWIG *et al.* (1962), com as modificações relatadas por NUNES (1983).

2.3. Inoculação

Foram utilizadas vinte plantas de cada cultivar, as quais foram previamente divididas por terços (inferior (base da planta), médio e superior (parte apical) e inoculadas entre 45-50 dias após o plantio (início da floração). Um grupo de quinze plantas foi inoculado pulverizando-se uma suspensão 10³ conídios.mL⁻¹ na face adaxial dos folíolos, com a ajuda de um atomizador manual de De Vilbiss. As outras cinco plantas foram inoculadas com a deposição de uma gota de 10 µL de uma suspensão de 10³ conídios.mL⁻¹ na face adaxial dos folíolos, sendo que foram inoculados 30 folíolos por terço por planta. Para facilitar a aderência da gota no ponto de inoculação, a suspensão conidial foi suplementada com gelatina (SigmaG-8150, Sigma Chemical Co. St Louis, USA) a 1 % (p/v) (MOURICHON *et al.*, 1987).

As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de nevoeiro, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro por 24 horas. A seguir, foram transferidas e mantidas em casa de vegetação.

Os experimentos foram repetidos três vezes.

2.4. Avaliação dos componentes epidemiológicos da resistência

As avaliações dos componentes da resistência foram feitas separadamente nos terços inferior, médio e superior das plantas inoculadas. No grupo de 15 plantas descrito em 2.3., foram avaliados os seguintes componentes:

2.4.1. Período de incubação (PI)

Foi considerado como o tempo transcorrido entre o momento da inoculação e o aparecimento de sintomas em 100 % das plantas. As avaliações foram efetuadas a cada 12 horas iniciando às 12 horas após a inoculação, e foi considerado como planta com sintoma, aquela que apresentou pelo menos uma lesão de pinta preta. Cada planta constituiu uma repetição.

2.4.2. Número de lesões (NL)

Foi avaliado o número de lesões aos 3, 4, 5, 6 e 7 dias após a inoculação. Foram selecionadas, aleatoriamente, três folhas em cada terço das plantas de cada cultivar. Cada folha em cada terço foi considerada como uma repetição.

2.4.3. Severidade da doença

Foi avaliada pela quantidade da área foliar lesionada a cada três dias, iniciando-se ao quinto dia após inoculação e estendendo-se até o 20º dia. Utilizou-se a escala diagramática para a avaliação da resistência à pinta preta em batata proposta por REIFSCHNEIDER *et al.*, (1984). Foram avaliadas três folhas por terço e cada folha em cada terço foi considerada como uma repetição. Com os valores de severidade estimou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (SHANER e FINNEY, 1977).

No segundo grupo de cinco plantas descrito em 2.3., foram avaliados os seguintes componentes da resistência:

2.4.4. Taxa de expansão da lesão (TEL)

Avaliou-se, diariamente, o diâmetro das lesões em três folíolos por terço. Pelo fato de as lesões variarem a sua forma no transcurso das avaliações, foram feitas as medições sempre na mesma direção longitudinal (comprimento) e transversal (largura) do folíolo. As áreas das lesões foram estimadas usando-se a fórmula da área da elipse ($A = a/2 \cdot b/2 \cdot \pi$, onde a = comprimento, b = largura e $\pi = 3,14$).

2.4.5. Número de esporos por área de tecido foliar afetado (NEAA)

Dez e quinze dias após a inoculação coletaram-se, aleatoriamente, três lesões por terço de cada planta, as quais foram fotografadas com câmera digital (Nikon Coolpix 800). A seguir, quantificou-se o número de esporos de cada lesão empregando-se a metodologia descrita por PELLETIER e FRY (1990). A área das lesões foi estimada usando-se o programa ImageTool (UTHSCSA, University of Texas Health Science Center, San Antonio). Cada lesão avaliada foi considerada como uma repetição.

2.4.6. Período latente (PL)

Considerou-se como o tempo transcorrido (dias) desde a inoculação até que o 100% das lesões estivessem esporuladas. Este componente foi avaliado diariamente a partir do terceiro dia após a inoculação, utilizando-se a metodologia descrita por NUNES (1983). Avaliaram-se três folíolos por terço e considerou-se que o PL tinha sido completado quando em dois dos folíolos por terço observava-se esporulação do patógeno. Cada folíolo, avaliado somente uma vez no tempo, foi considerado como uma repetição.

2.5. Estudo do processo de infecção de *A. solani* em batata

Uma vez caracterizados os componentes epidemiológicos da resistência nos cultivares Aracy, Bintje, Delta e Desirée, efetuou-se um estudo histológico com o objetivo de verificar os possíveis mecanismos de resistência associados ao processo de infecção do patógeno, sua possível relação com os componentes epidemiológicos da resistência e com a idade dos tecidos. Os experimentos foram repetidos duas vezes na mesma época.

2.5.1. Inoculação

Em uma área de aproximadamente 4,0 cm² previamente delimitada na superfície adaxial dos folíolos, depositou-se uma gota de 10 µL de uma suspensão de 10⁴ conídios.mL⁻¹ suplementada com gelatina 1 % (p/v) como descrito em 2.3. A delimitação objetivou facilitar a posterior detecção de eventos citológicos do processo de infecção. As plantas inoculadas foram transferidas para câmara de nevoeiro por 24 horas e, após esse tempo, foram transferidas para casa de vegetação onde permaneceram até o final do experimento. Foram utilizadas dez plantas de cada cultivar, cinco foram inoculadas, e cinco utilizadas como controle.

2.5.2. Diafanização de tecidos e avaliação dos componentes microscópicos da resistência

Foram coletadas amostras de tecido foliar às 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i.). Aleatoriamente, de cada planta, foram coletados três folíolos previamente inoculados por terço. Fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² (1,0 cm x 0,5 cm) foram cortados na área previamente marcada nos folíolos e diafanizados em cloral hidratado (500 g/200 mL de água), utilizando a metodologia descrita por LONGO *et al.*, (1994). As amostras foram preparadas para observação dispondo-se quatro segmentos (aproximadamente 2 cm²) de tecido diafanizado por lâmina contendo lactofenol e azul de tripano (0,05% p/v). Avaliaram-se três lâminas

por tratamento e cada lâmina foi considerada como uma repetição. Foram realizadas observações dos eventos que ocorreram durante o processo de infecção e quantificados os seguintes componentes:

2.5.2.1. Número de conídios germinados

Considerou-se como conídio germinado aquele conídio que apresentava tubo germinativo (independentemente do comprimento) associado às suas células.

2.5.2.2. Número de apressórios

Considerou-se como apressório as estruturas globosas com diâmetro maior ao da hifa de origem (EMMETT e PARBERY, 1975). Para a sua quantificação, não foi feita distinção entre apressórios laterais e terminais.

2.5.2.3. Número de penetrações por estômatos

Considerou-se como penetração por estômatos a penetração de tubos germinativos ocorrendo estritamente através do ostíolo dos estômatos ou nas células guardas.

2.5.2.4. Número de penetrações ocorrendo de forma direta

Foi considerada como penetração direta aquela onde a penetração do patógeno ocorreu diretamente nas células epidérmicas tanto na superfície (periclinal) quanto entre as junções das células (anticlinal).

2.5.2.5. Número de sítios de penetração com células exibindo reação de hipersensibilidade (HR)

Definiram-se como células com HR, as células que apresentavam espessamento de parede, citoplasma condensado com abundante granulação no seu interior, restringindo o patógeno no ponto de penetração.

O número de apressórios, de penetrações pelos estômatos, de penetrações diretas e de sítios de penetração com células exibindo HR foram analisados mediante o cálculo das proporções com relação ao número de conídios germinados.

Os eventos, quando necessário, foram fotografados utilizando microscopia de contraste com interferência diferencial (Nomarski).

2.5.3. Microscopia eletrônica de varredura

As observações ao microscópio de varredura foram realizadas em folíolos do cultivar Bintje coletados 24 horas após a inoculação. A inoculação foi realizada por atomização como descrito em 2.3., e a concentração do inóculo foi de 10^5 conídios.mL⁻¹. As áreas delimitadas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 4 x 4 mm. A seguir, realizou-se a pré-fixação dos fragmentos em glutaraldeído (3 %, tamponado com cacodilato de sódio pH 7, 0,05 M) durante duas horas à temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo, os fragmentos foram lavados seis vezes em cacodilato de sódio. Cada lavagem teve a duração de 10 minutos. Posteriormente, realizou-se a fixação dos fragmentos em tetróxido de ósmio (OsO₄ 1 %) durante 4 horas, a 4°C. Os fragmentos já fixados foram lavados seis vezes (uma lavagem a cada dez minutos) com tampão cacodilato de sódio e desidratados em série alcoólica (30, 50, 70, 80, 95 e 100 %). Após a desidratação, os fragmentos foram submetidos à secagem ao ponto crítico, usando-se o aparelho “Critical Point Dryer” (Balzers, modelo CPD020). Os fragmentos foram montados sobre suporte de metal e, em seguida, foram cobertos com ouro por meio de pulverização catódica, no “Sputter Coater” acoplado a uma “Freezing Drying Unit” (Balzers, FDU010). O material foi examinado ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo JSM-T2000) operando a 10Kv.

2.6. Estudo da expressão diferencial de genes que codificam para proteínas relacionadas à patogênese (PR)

Foi utilizado o cultivar Aracy como padrão resistente e 'Bintje' como suscetível. O preparo do material vegetal seguiu o mesmo critério descrito no item 2.1., sendo que as plantas foram somente avaliadas e amostradas nos terços inferior e superior.

2.6.1. Inoculação e coleta das amostras

A inoculação foi realizada por pulverização conforme metodologia descrita no item 2.3. Foram utilizadas vinte e cinco plantas por cultivar. Quinze plantas foram inoculadas com o patógeno e dez foram pulverizadas com água destilada estéril para servirem como controle. Em dez das quinze plantas inoculadas com o patógeno e nas inoculadas com água foram realizadas amostragens às 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i.). De cada planta foram coletadas, aleatoriamente, sub-amostras de três folíolos por terço para formar uma amostra por tratamento. As amostras coletadas foram armazenadas imediatamente em nitrogênio líquido. O grupo restante de cinco plantas inoculadas foi utilizado como controle da inoculação, sendo que aos cinco dias após a inoculação foi avaliado o número de lesões/planta.

2.6.2. Extração de RNA e análise “Northern Blotting”

2.6.2.1. Extração de RNA total

A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por LONGEMANN *et al.* (1987). As amostras coletadas foram maceradas com o auxílio de pistilo e cadinho, juntamente com a adição de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. O material vegetal (aproximadamente 500 µL) foi transferido para um tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL e mantido até a evaporação do nitrogênio líquido, mas sem permitir o descongelamento. A seguir, foram adicionados 500 µL de tampão guanidina (Hidrocloreto de Guanidina

8 M, Ácido 4- morfolino-etano-sulfônico (MES) 20 mM, EDTA 20 mM, Mercaptoetanol 50 mM) no tubo *Eppendorf* contendo o material vegetal, que foi agitado vigorosamente com o auxílio de um vortex. Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, a 4°C, durante 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro *miracloth* (*Calbiochem*) e transferido para novo tubo onde se adicionou igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1 v/v). A solução foi homogeneizada e centrifugada (10.000 rpm a 4°C) durante 45 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo sendo acrescida de 0,7 volumes de etanol absoluto e 0,2 volumes de ácido acético 1 M. As amostras foram homogeneizadas e armazenadas a -20°C durante 12 horas. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação (10000 rpm a 4°C) durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo o RNA total foi lavado duas vezes com acetato de sódio esterilizado (3 M, pH 5,2), uma vez com etanol 70%, e secado à temperatura ambiente. O RNA foi dissolvido em 50 µL de água estéril tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1 %.

Todas as vidrarias e utensílios utilizados durante o processo de extração do RNA foram previamente tratados com DEPC (0,1 %), durante 12 horas e esterilizados em autoclave durante 20 minutos. As concentrações de RNA foram quantificadas com o auxílio de espectrofotômetro e analisadas por eletroforese em géis de agarose (1,2 %) contendo 20 mM de ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico (MOPS), 5 mM de acetato de sódio, 1 mM de EDTA, pH 7,0, 100 mg/L de brometo de etídio e 18 mL/L de formaldeído 37 % (12,3 M). O tampão de corrida foi composto por 20 mM de ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico (MOPS), 5 mM de acetato de sódio, 1 mM de EDTA, pH 7,0 e 20 mL/L de formaldeído 37% (12,3 M). O gel foi equilibrado por pelo menos 30 minutos no tampão de corrida antes do início da eletroforese, realizada a 80 V durante, 4 horas.

2.6.2.2. Análise de “Northern Blotting”

Dez microgramas de RNA total de cada amostra foram desnaturados e submetidos à eletroforese em gel de agarose nas condições descritas em

2.6.2.1. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado duas vezes sob agitação, durante 10 minutos, com água esterilizada e durante 20 minutos em solução de NaOH (0,05 N). As amostras de RNA total foram transferidas por capilaridade para membranas de náilon Hybond N+ (*Amersham Pharmacia Biotech*) seguindo as recomendações do fabricante. Como tampão de transferência foi usado SCC 20X (Citrato de sódio, 88,23 g/L e Cloreto de sódio, 175,32 g/L). Após a transferência, as membranas foram lavadas em SCC 2X para a retirada de fragmentos do gel ou de impurezas.

As membranas foram pré-hibridizadas a 65°C durante uma noite sob agitação em solução de hibridização (5X SSC, 5X de tampão de Denhardt, 0,5% p/v SDS) adicionado de 200 µg/L de DNA de esperma de salmão desnaturado. Após a pré-hibridização, procedeu-se à hibridização com 50 ng de cada sonda. Como sondas foram utilizados os cDNAs de uma glucanase básica de tabaco (*gluB*, 1kb) e da quitinase básica de feijão (*chiB*, 0,9 kb) fornecidos pela Universidad Central de Las Villas, Cuba. As sondas foram marcadas com [α -³²P] dCTP (3000 Ci mmol), utilizando-se a metodologia de “Random Priming”, conforme as especificações do fabricante (“Random priming DNA labelling system”, InVitrogen). As sondas marcadas foram adicionadas à solução de hibridização contendo as membranas. As membranas foram hibridizadas por 24 horas, a 65°C. A seguir, foram lavadas duas vezes por cinco minutos em 2x SSC, 0,1% SDS, a 65 °C, e uma vez, por vinte minutos em 1x SSC, 0,1% SDS a mesma temperatura. As membranas foram colocadas em cassete com intensificador de sinal contendo filmes Kodak-BioMax (Kodak, BioMax, MS Screen, Rochester, N.Y. U.S.A) e mantidas a -80°C durante sete dias.

2.7. Análise estatística

Nas análises estatísticas empregou-se o programa SAS (The SAS Institute Inc., Version 6.01, Cary, NC, Estados Unidos). Na análise de TEL utilizou-se a média dos três folíolos. Efetuou-se a análise de regressão linear dos valores de área lesionada em função do tempo (Área da lesão = $\alpha + \beta \cdot \text{Tempo}$), sendo o parâmetro β (inclinação) usado como estimador da taxa

de expansão da lesão ($\text{cm}^2.\text{dia}^{-1}$). Os valores de PI, NL e AACPD foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade.

Na análise dos componentes microscópicos da resistência efetuou-se a comparação dos terços dos cultivares, nos diferentes tempos de avaliação. Procedeu-se à análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a número de apressórios, número de penetrações e número de sítios de penetração com células exibindo HR e, posteriormente, a comparação das médias pelo teste Fisher LSD a 95 % de probabilidade (CHURCHILL *et al.*, 1988; GREEN e BAILLEY, 2000).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação dos componentes epidemiológicos da resistência

Os componentes epidemiológicos da resistência permitiram discriminar os cultivares quanto à resistência a pinta preta. O número de lesões (NL), a taxa de expansão das lesões (TEL) e a severidade foram os componentes que melhor discriminaram os cultivares quanto aos níveis de resistência. Nos três experimentos realizados foi observada a mesma tendência de resultados. Os dados mostrados correspondem ao experimento onde o coeficiente de variação foi menor.

A análise de cada componente é detalhada a seguir:

Período de incubação (PI). Os cultivares Bintje, Delta e Desirée não diferiram quanto ao PI. Porém, o PI em 'Aracy' foi significativamente mais longo nos três terços avaliados (Tabela 1).

Número de lesões (NL). A análise desse componente foi realizada com base no número de lesões contabilizadas aos cinco dias após a inoculação (d.a.i). Nesse tempo, o NL se manteve constante em relação à avaliação do dia anterior e não se observou o coalescimento das lesões. Aracy apresentou o menor NL nos três terços. Nos terços inferior e médio e Delta mostrou menor NL que Desirée e Bintje. O cultivar Desirée, relatado como suscetível, não

Tabela 1 - Período de incubação (horas) de *A. solani* nos terços inferior, médio e superior de quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta inoculadas com 10^3 conídios.mL⁻¹ de *A. solani*. Os valores apresentados correspondem ao número médio de horas após inoculação onde foram observados sintomas em todas as plantas de cada cultivar.

Cultivar ^b	Terço		
	Inferior	Médio	Superior
Aracy (r)	^a 58,8 a	61,2 a	76,8 a
Bintje (s)	43,2 b	45,6 b	48,0 b
Delta (mr)	46,8 b	48,0 b	49,2 b
Desirée (s)	46,8 b	43,2 b	51,6 b

^aValores na coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^bValores entre parênteses indicam o nível de resistência dos cultivares, r: resistente; mr: medianamente resistente; s: suscetível.

diferiu de Aracy no terço superior. Observou-se uma gradação da resistência, em função do terço analisado. Para todos os cultivares, o maior NL foi observado no terço superior e o menor, no terço inferior (Tabela 2).

Taxa de expansão da lesão (TEL). Independentemente do terço analisado a menor TEL foi observada no cultivar Aracy (Tabela 3). No terço inferior, os valores de TEL do cultivar Delta não diferiram dos cultivares Bintje e Desirée. Todos os cultivares apresentaram menor TEL no terço superior. Nesse terço os valores da TEL do cultivar Desirée, considerada como suscetível, não diferiram dos de 'Delta' (resistência intermediária). No terço superior, as lesões do cultivar Aracy ficaram praticamente restritas nos pontos de infecção, não se expandindo com o tempo (Figura 1).

Severidade. Os valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do cultivar Aracy foram os menores, independentemente do terço da planta analisado (Figura 2). No terço médio, o cultivar Delta apresentou menores valores de AACPD que 'Desirée' e 'Bintje'. O valor de

Tabela 2 - Número de lesões causadas por *Alternaria solani* nos terços inferior, médio e superior de quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta inoculadas com 10^3 conídios.mL⁻¹. Os valores apresentados correspondem à média do número de lesões em três folhas por terço de 15 plantas por cultivar.

Cultivar ^b	Terço		
	Inferior	Médio	Superior
Aracy (r)	^a 10,2 cA	8,1 cA	1,2 cB
Bintje (s)	34,8 aA	24,6 aB	15,8 aC
Delta (mr)	22,1 bA	16,2 bB	8,2 bC
Desirée (s)	32,0 aA	28,2 aA	4,0 cB

^aValores na coluna seguidos da mesma letra minúscula e valores nas filas seguidos da mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^bLetras entre parênteses indicam o nível de resistência dos cultivares, r: resistente; mr: medianamente resistente; s: suscetível.

AACPD do cultivar Desirée no terço superior não diferiu do de Aracy. No terço superior, os valores de AACPD foram menores quando comparados com o terço médio e inferior, respectivamente (Figura 2), mostrando que este componente é influenciado pela idade dos tecidos (Figura 3).

Número de esporos por área foliar afetada (NEAA). Constatou-se alta variabilidade e baixa repetibilidade dos resultados na avaliação deste componente. Não houve relação entre a quantidade de esporos presentes nas amostras coletadas com o tamanho das lesões nem com o nível de resistência dos cultivares. Não houve relação entre o NEAA e idade dos tecidos.

Período latente (PL). O PL não discriminou os cultivares quanto à resistência à pinta preta. Foram observadas lesões de até 4 cm² sem a presença de esporos e lesões de área menor (0,5 cm²) com a presença de esporos. Não houve relação entre o PL e idade fisiológica dos tecidos.

Tabela 3 - Comparação entre as estimativas do parâmetro b1 das equações de regressão lineal utilizadas para calcular a taxa de expansão das lesões (cm².dia⁻¹) em cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta, inoculadas com *Alternaria solani* (10³ conídios.mL⁻¹). Os valores apresentados correspondem à diferença entre o valor b1 de Desirée (“baseline”) e o de cada cultivar comparado.

Cultivar ^a	Terço Inferior		
	Aracy	Bintje	Delta
Aracy (r)	-	-	-
Bintje (s)	0,210 *	-	-
Delta (mr)	0,131 *	0,079 ns	-
Desirée (s)	0,344 *	0,554 ns	0,475 ns
Terço Médio			
	Aracy	Bintje	Delta
Aracy (r)	-	-	-
Bintje (s)	0,066 *	-	-
Delta (mr)	0,053 *	0,118 *	-
Desirée (s)	0,119 *	0,184 ns	0,066 *
Terço Superior			
	Aracy	Bintje	Delta
Aracy (r)	-	-	-
Bintje (s)	0,064 *	-	-
Delta (mr)	0,055 *	0,009 *	-
Desirée (s)	0,028 *	0,036 *	0,027 ns

ns: não significativo.

*diferença significativa a 5% de probabilidade.

^aLetras entre parênteses indicam o nível de resistência dos cultivares: r = resistente; mr = medianamente resistente; s = suscetível.

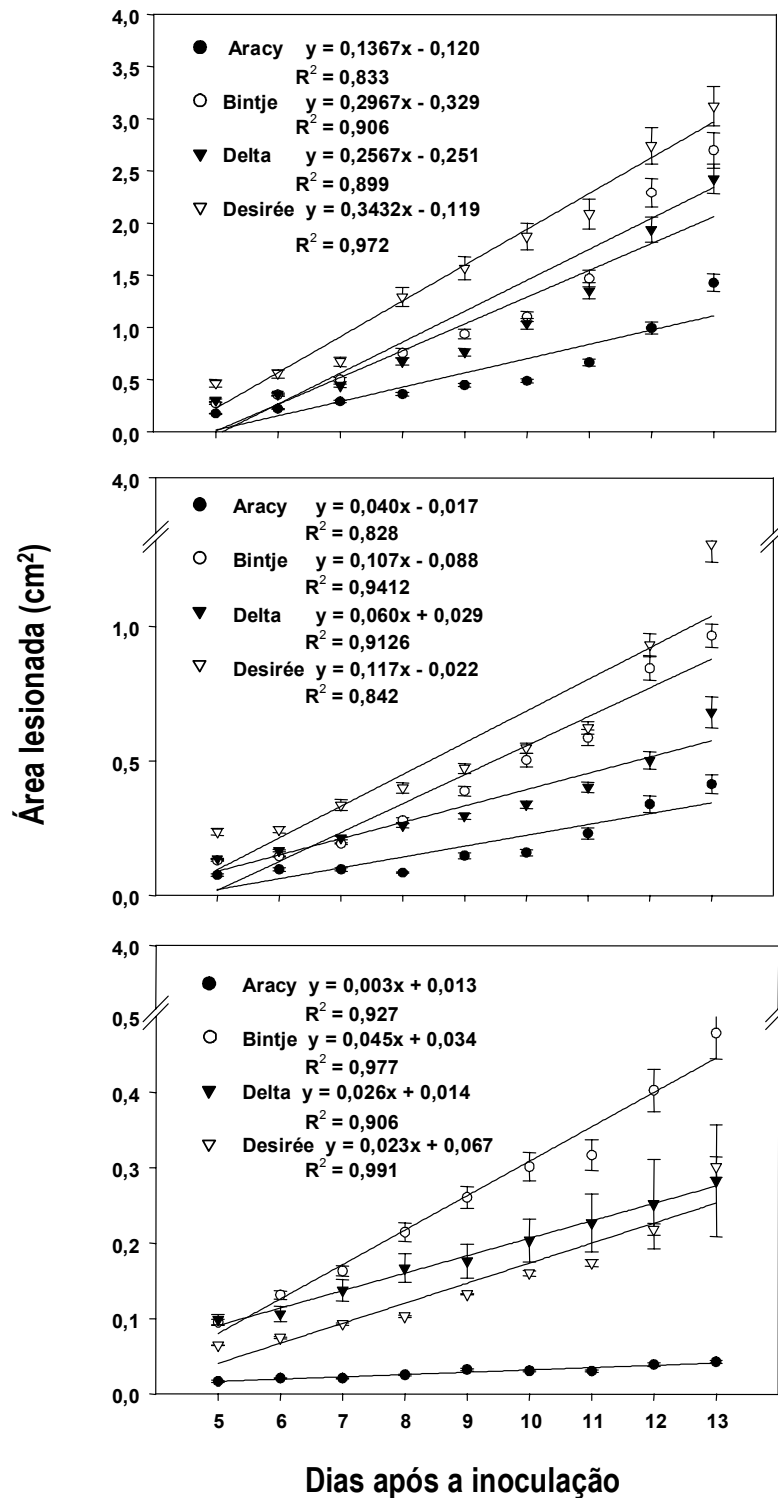


Figura 1 - Área lesionada média (cm²) em função do tempo decorrido após a inoculação com *Alternaria solani* (10³ conídios.mL⁻¹) em quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta. **A.**Terço inferior. **B.**Terço médio. **C.**Terço superior.

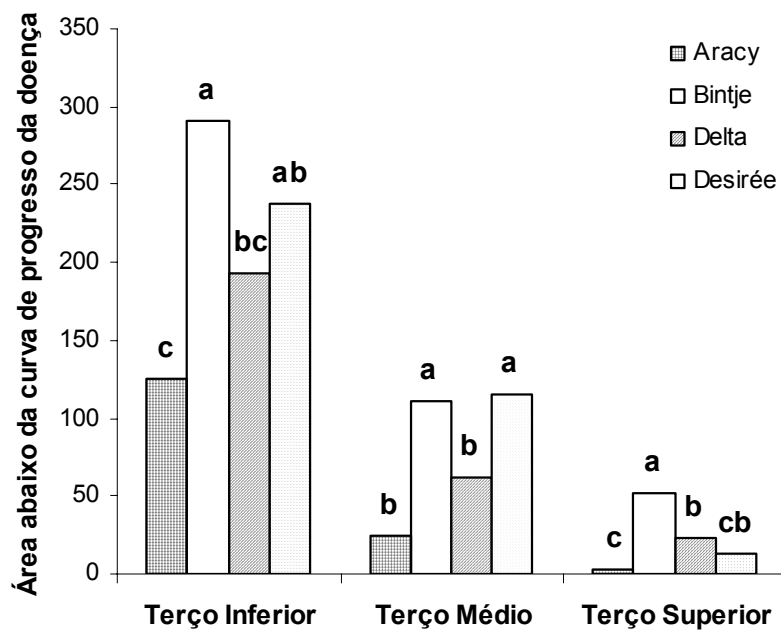


Figura 2 - Área abaixo da curva de progresso da doença, por terço, em quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta inoculadas com 10^3 conídios.mL⁻¹ de *Alternaria solani*. Foram realizadas avaliações a cada três dias desde o 5º até o 20º dia após a inoculação. Barras com a mesma letra dentro de um mesmo terço não diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

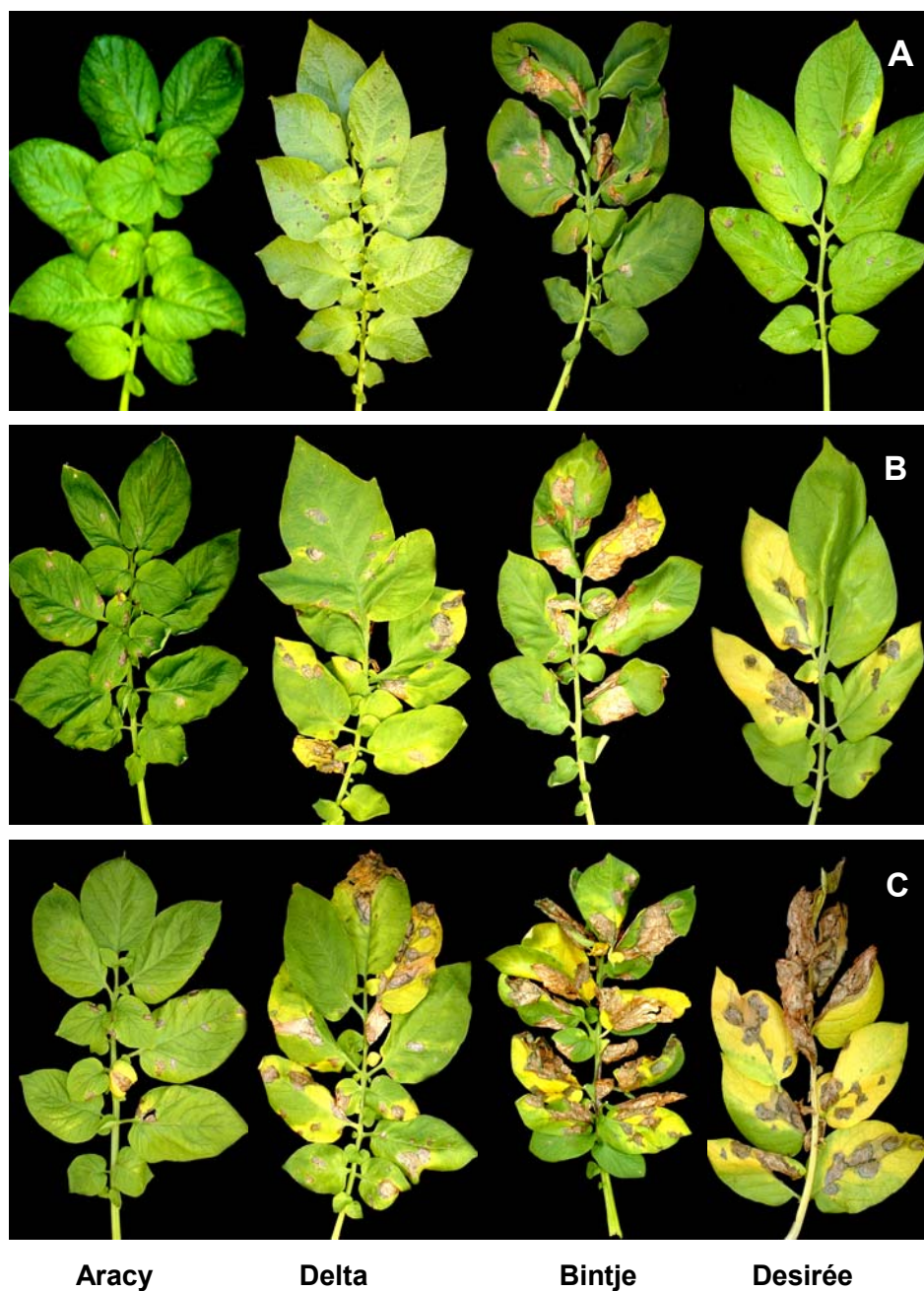


Figura 3 - Folhas de cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta mostrando lesões de causadas por *Alternaria solani* doze dias após a inoculação (10^3 conídios.mL⁻¹ em plantas). **A.** Terço superior. **B.** Terço médio. **C.** Terço inferior.

3.2. Estudo do processo de infecção de *Alternaria solani* em batata

Verificou-se que tanto a técnica de diafanização de tecidos quanto a metodologia de inoculação utilizada foram eficientes para a observação e quantificação de eventos do processo de infecção de *A. solani* em batata.

3.2.1. Descrição do processo de infecção de *A. solani* em batata

Às seis horas após a inoculação (h.a.i.) foram observados os primeiros conídios germinados, sendo que não foram constatados conídios sem pelo menos a presença de um tubo germinativo em nenhuma das avaliações realizadas. Cada conídio produziu em média $3,21 \pm 0,093$, (média \pm desvio padrão) tubos germinativos os quais, freqüentemente, se ramificavam e percorriam longas distâncias ao longo das junções das células, sem orientação visivelmente definida até formar apressórios e penetrar (Figura 4A). Foram observados conídios com tubos germinativos curtos com formação de apressórios e penetração (Figura 4B). A formação de apressórios aumentou significativamente às 24 h.a.i. e caracterizou-se pela presença de dilatações hialinas proeminentes formadas nas extremidades dos tubos germinativos (apressórios terminais, EMMETT e PARBERY, 1975) ou lateralmente nas hifas (Figuras 4C e 4D). Alguns apressórios germinaram dando origem a tubos germinativos, os quais podiam desenvolver novos apressórios e penetrar. A maioria dos apressórios formou-se nas junções das células epidérmicas (Figuras 5A e 5B). Na superfície dos apressórios, tubos germinativos e hifas foi observada uma substância semelhante a uma matriz extracelular que parece estar envolvida com a adesão dessas estruturas à superfície da planta (Figura 5).

A penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro teve um aumento às 36 h.a.i. e aconteceu quase exclusivamente de forma direta. A penetração por estômatos foi raramente observada (Figura 6A). Os pontos mais freqüentes de penetração foram entres as junções das células epidérmicas e em células do complexo estomático. Verificou-se que a hifa de penetração tornou-se espessa

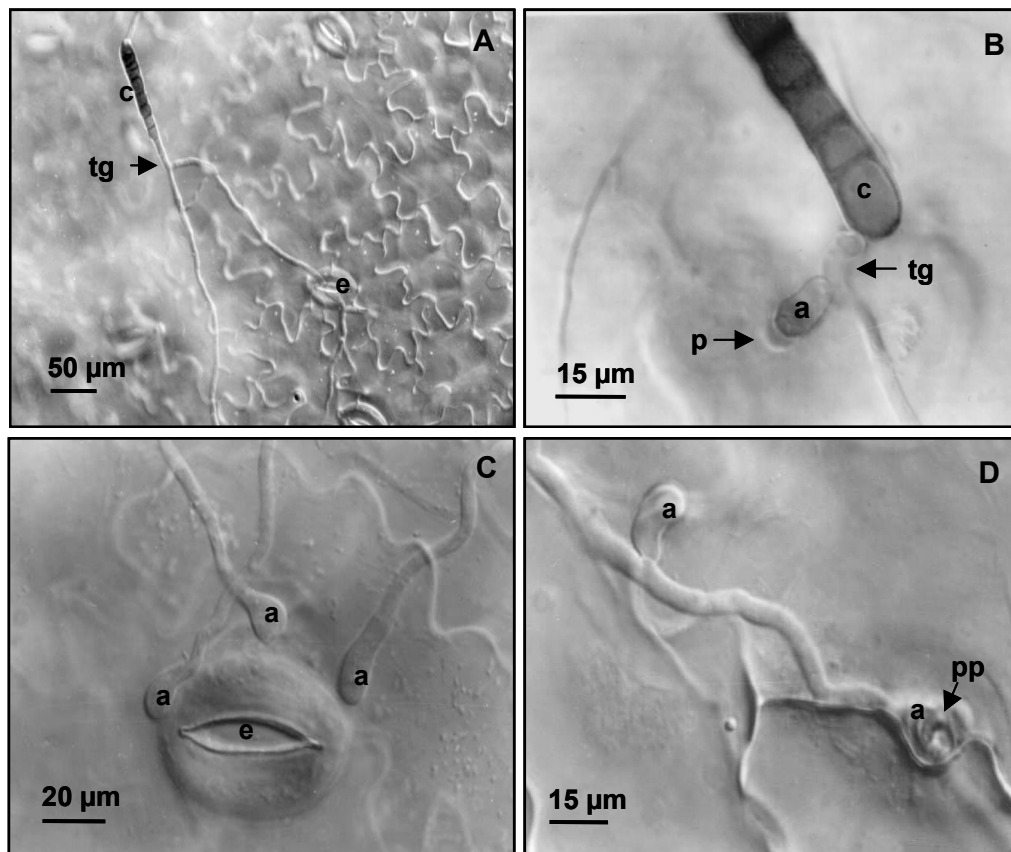


Figura 4 - Fotomicrografias de eventos de pré-penetração de *Alternaria solani* em batateira cultivar Bintje. **A.** Conídio (c) mostrando tubos germinativos (tg) longos; 12 horas após a inoculação (h.a.i). **B.** Conídio (c) com tubo germinativo (tg); 24 h.a.i. e papila (p). **C.** Apressórios (a) terminais formados próximos do estômato (e); 24 h.a.i. **D.** Formação de dois apressórios laterais em um mesmo tubo germinativo com um ponto de penetração (pp); 24 h.a.i.

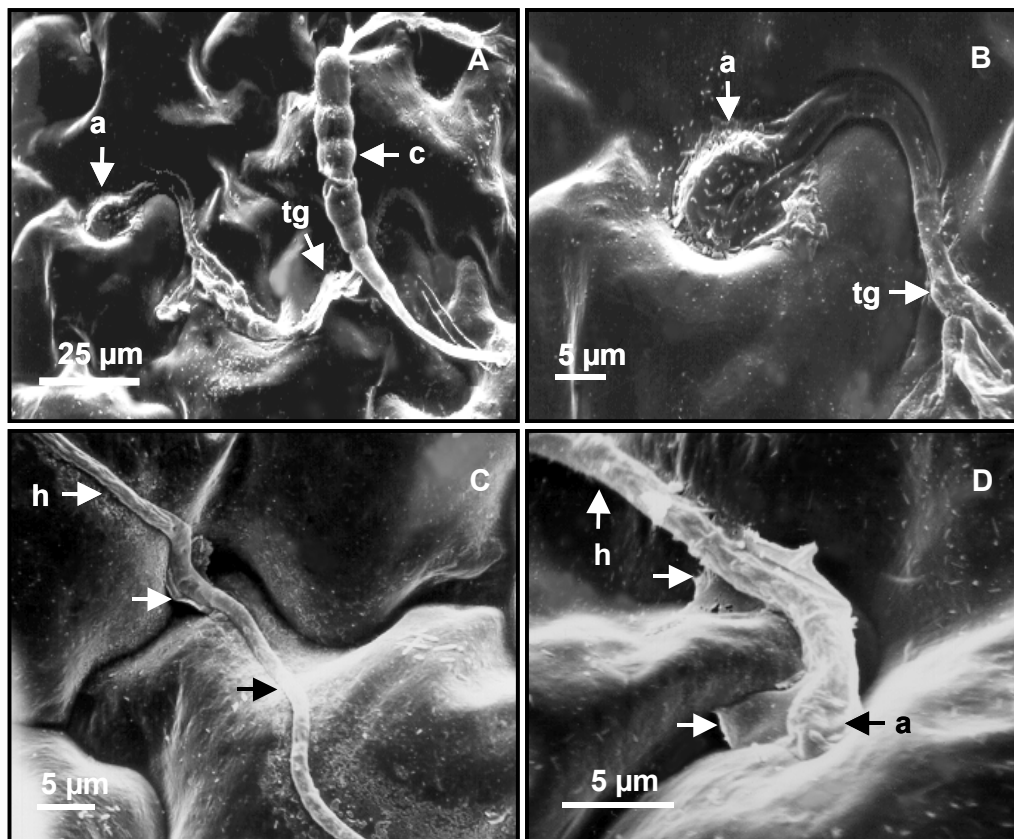


Figura 5 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura do processo de infecção de *Alternaria solani* no cultivar Bintje às 24 horas após a inoculação. **A e B** conídio (c) germinando com formação de apressório (a) nas junções das células epidérmicas. **C.** Hifa (h) aderida na superfície foliar sugerindo a presença de matriz extracelular envolvida na aderência ao tecido. **D.** Hifa (h) com formação de apressório (a). As setas indicam pontos com aparente adesão da hifa à superfície foliar.

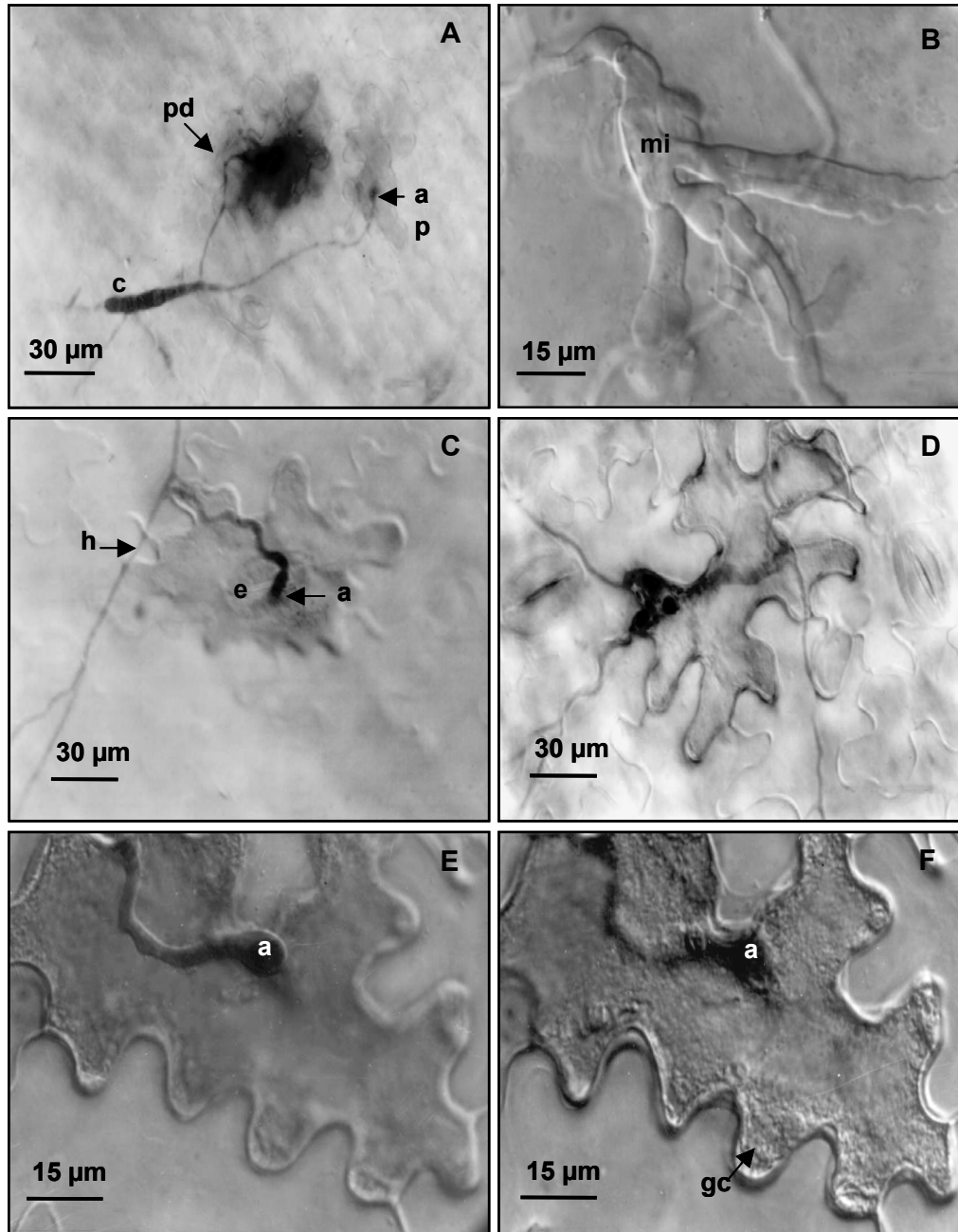


Figura 6 - Fotomicrografias de eventos de pós-penetração de *Alternaria solani* em batateira às 36 horas após a inoculação. **A.** Conídio germinado e penetrando em dois sítios diferentes no cultivar Bintje. Nota-se a necrose do tecido colonizado. **B.** Célula do cultivar Bintje com micélio intracelular (**mi**) mais grosso que a hifa de penetração. **C.** Apressório (**a**) e penetração por estômato (**e**) no cultivar Aracy. Nota-se a célula reagindo com HR. **D.** Célula do cultivar Aracy penetrada diretamente exibindo HR. **E.** Apressório (**a**) em fase inicial de penetração direta com a célula exibindo HR, cultivar Aracy. **F.** Célula do cultivar Aracy reagindo com granulações citoplasmáticas (**gc**), evidenciando a ocorrência de HR.

uma vez dentro do tecido, com diâmetro maior que o do tubo germinativo do conídio, e que originou abundante e espesso micélio interno (Figura 6B). O micélio interno ramificou-se colonizando os tecidos e provocando necrose. Às 48 h.a.i. foram observadas lesões macroscópicas nos tecidos diafanizados. A necrose provocada pela colonização do fungo impediu a quantificação de eventos no processo de infecção nas amostras coletadas às 72 h.a.i. O fenômeno descrito por GEES e HOHL (1988) como penetração abortiva, e que se refere ao insucesso na penetração do patógeno devido à formação de estruturas físicas de defesa, não foi observado.

Independentemente do modo de penetração, em algumas células adjacentes ao sítio de penetração, verificou-se a presença de alterações do conteúdo celular (Figuras 6C e 6D). Estas alterações caracterizaram-se pela presença de abundantes granulações no citoplasma e espessamento da parede celular (Figuras 6E e 6F). Essas células, ao serem observadas sob microscopia de fluorescência, apresentavam níveis de autofluorescência mais intensos do que os observados em células necrosadas e colonizadas pelo patógeno (dados não mostrados). Esse tipo de reação, caracterizado como reação de hipersensibilidade (HR), foi observada com maior frequência nas penetrações que ocorreram próximo aos estômatos. Embora, de modo geral, o patógeno foi visivelmente restrito nos pontos de infecção, onde se observou a HR, foram notados pontos de penetração onde apesar das células reagirem com HR, o tecido adjacente estava visivelmente necrosado, sugerindo a continuidade do processo de colonização.

A análise dos tecidos diafanizados revelou que, independentemente do cultivar, o número de células/área de tecido foliar, está diretamente relacionado com a idade dos tecidos. Tecidos mais jovens possuem maior número de células/cm² (Figura 7).

3.2.2. Avaliação dos componentes microscópicos da resistência

Da análise das amostras coletadas nos diferentes períodos após a inoculação do patógeno, verificou-se que 36 h.a.i. foi o tempo que permitiu a

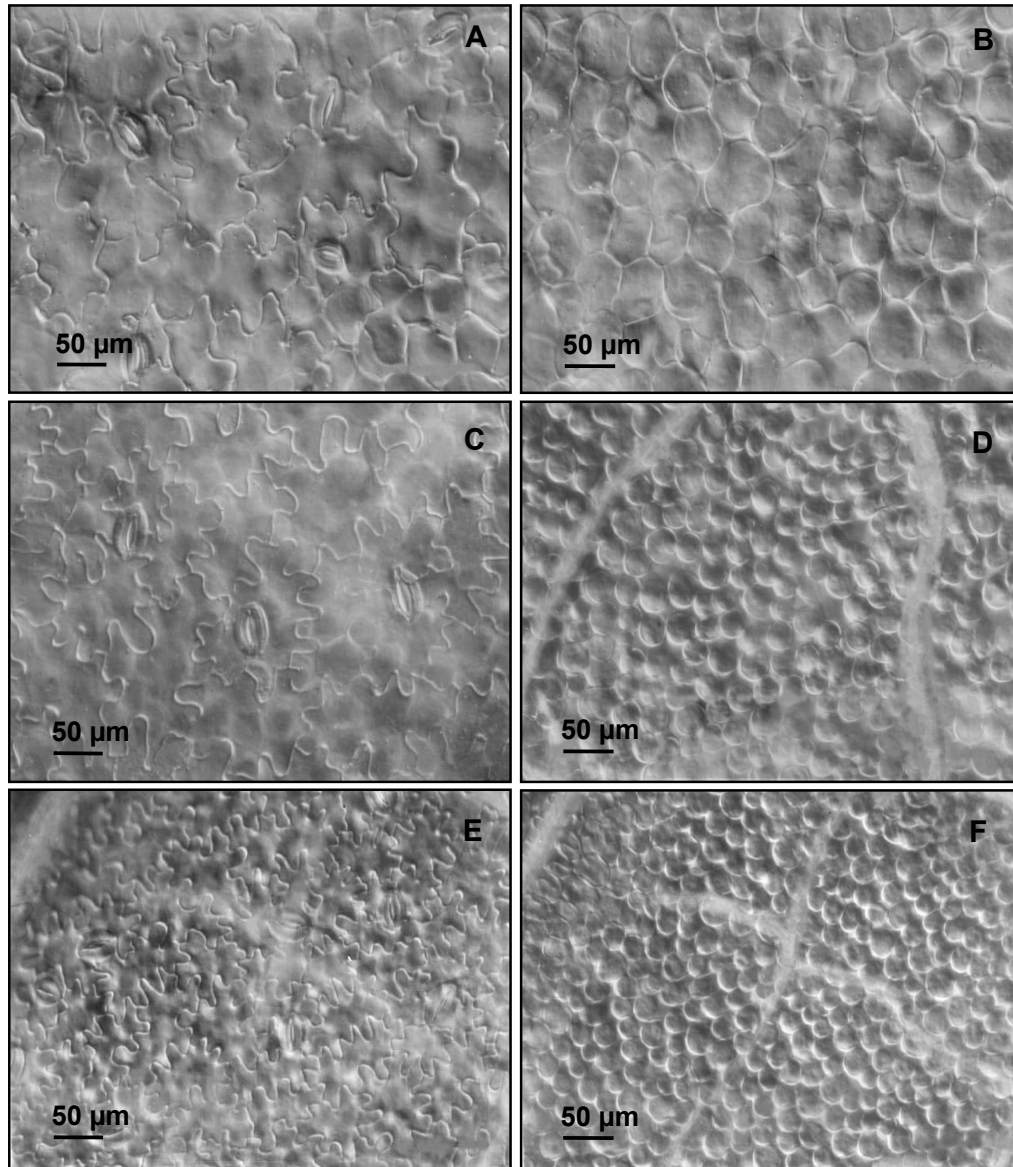


Figura 7 - Variação no número de células por área de tecido foliar em diferentes tecidos de batateira cultivar Bintje. **A.** Células epidérmicas de folíolo do terço inferior. **B.** Células do tecido paliçádico de folíolo do terço inferior. **C.** Células epidérmicas de folíolo do terço médio. **D.** Células do tecido paliçádico de folíolo do terço médio. **E.** Células epidérmicas de folíolo do terço superior. **F.** Células do tecido paliçádico de folíolo do terço superior.

melhor descrição dos componentes avaliados nos quatro cultivares. Uma vez que não se constatou interação entre o tempo de ocorrência dos eventos e cultivares, esse tempo foi escolhido para as análises estatísticas. Não foram observadas diferenças entre cultivares quanto às características morfo-fisiológicas do processo infeccioso. Essas características não foram influenciadas pela idade dos tecidos.

Número de conídios germinados. Foram observados conídios de *A. solani* germinados em todos os cultivares estudados, independentemente dos níveis de resistência. O cultivar Bintje apresentou a maior quantidade de conídios germinados nos três terços diferindo apenas de 'Delta' no terço inferior e de 'Aracy' e 'Desirée' no terço médio e dos demais cultivares no terço superior (Tabela 4). Quando a análise foi efetuada por terços não houve relação entre o número de conídios germinados com a idade dos tecidos (Tabela 5).

Número de apressórios. Não houve associação entre o número de apressórios por conídios germinados (apressórios/conídios germinados), e a resistência dos cultivares. Apenas no terço superior Delta diferiu do resto dos cultivares (Tabela 4). Este componente não foi influenciado pela idade dos tecidos (Tabela 5).

Número de penetrações diretas. Nos quatro cultivares, a penetração do fungo ocorreu predominantemente de forma direta. O número de penetrações (penetrações/ conídios germinados) diferiu entre os cultivares apenas no terço inferior, esse valor foi menor no cultivar Aracy o qual diferiu somente de 'Bintje' (Tabela 4). A penetração do fungo foi maior no terço médio, e não foram detectadas diferenças significativas do número de penetrações entre o terço inferior e superior (Tabela 5).

Número de sítios de penetração exibindo células com reação de hipersensibilidade (HR). Constataram-se células exibindo HR em todos os cultivares. Não se observou, diferença entre cultivares e os terços quanto à velocidade de ocorrência de células com HR (dados não mostrados). Nos três terços, 'Aracy' apresentou o maior número de sítios de penetração exibindo células com HR (Tabela 4). Este valor foi significativamente maior no terço superior dos quatro cultivares (Tabela 5).

Tabela 4 - Quantificação dos componentes microscópicos da resistência no processo de infecção de *Alternaria solani* em quatro cultivares de batata às 36 horas após a inoculação. Os dados do número de conídios germinados correspondem à média de três repetições em uma área avaliada de 2 cm²/repetição. Os valores referentes às variáveis apressórios, penetrações diretas e de sítios de penetração com células exibindo HR correspondem a proporções calculadas em relação ao número de conídios germinados.

Cultivar ^b	Terço Inferior			
	Número de conídios germinados	Apressórios/conídios germinados	Penetrações diretas/conídios germinados	Sítios de penetração com células exibindo HR/conídios germinados
Aracy (r)	^a 24,0 ba	0,510 a	0,105 b	0,080 a
Delta (mr)	16,3 b	0,600 a	0,386 ab	0,022 b
Bintje (s)	29,0 a	0,600 a	0,424 a	0,011 b
Desirée (s)	20,0 ba	0,592 a	0,375 ab	0,013 b
Terço Médio				
Aracy (r)	^a 17,3 b	0,890 a	0,447 a	0,064 a
Delta (mr)	30,6 a	0,961 a	0,606 a	0,010 a
Bintje (s)	36,0 a	0,559 b	0,385 a	0,012 a
Desirée (s)	14,0 b	0,782 ab	0,662 a	0,018 a
Terço Superior				
Aracy (r)	^a 11,6 b	0,656 b	0,303 a	0,282 a
Delta (mr)	16,0 b	1,165 a	0,389 a	0,015 c
Bintje (s)	29,6 a	0,330 b	0,186 a	0,025 c
Desirée (s)	14,6 b	0,328 b	0,296 a	0,109 b

^aValores na coluna seguidos de uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

^bLetras entre parênteses indicam o nível de resistência dos cultivares: r = resistente; mr = medianamente resistente; s = suscetível.

Tabela 5 - Quantificação dos componentes microscópicos da resistência de terços de quatro cultivares de batata ao processo de infecção de *Alternaria solani*, às 36 horas após a inoculação. Os valores do número de conídios germinados correspondem à média dos quatro cultivares. Os valores referentes às variáveis apressórios, penetrações diretas e de sítios de penetração com células exibindo HR correspondem a proporções calculadas em relação ao número de conídios germinados.

Terços	Número de conídios germinados	Apressórios/conídios germinados	Penetrações diretas/conídios germinados	Sítios de penetração com células exibindo HR/conídios germinados
Inferior	^a 22,3a	0,575 a	0,322 b	0,031 b
Médio	24,5 a	0,798 a	0,525 a	0,026 b
Superior	18,0 a	0,619 a	0,294 b	0,108 a

^aValores na coluna seguidos de uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade.

3.3. Estudo da expressão diferencial de genes que codificam para proteínas relacionadas à patogênese (PR)

A avaliação do número de lesões confirmou o sucesso da inoculação (Tabela 6).

Tabela 6 - Número de lesões causadas por *Alternaria solani* nos terços inferior e superior de dois cultivares de batata Aracy (Resistente) e Bintje (Suscetível) inoculadas com 10^3 conídios.mL⁻¹. ^aValores correspondem à média do número de lesões em três folhas por terço de 5 plantas por cultivar.

Cultivar	Terço	
	Inferior	Superior
Aracy	^a 12,6 a	2,1 a
Bintje	38,1 b	20,0 b

Os métodos de extração e quantificação de RNA utilizados garantiram a obtenção de RNA total de qualidade, bem como a “equalização” da concentração das amostras para a realização das análises de “northern blotting” (Figura 8).

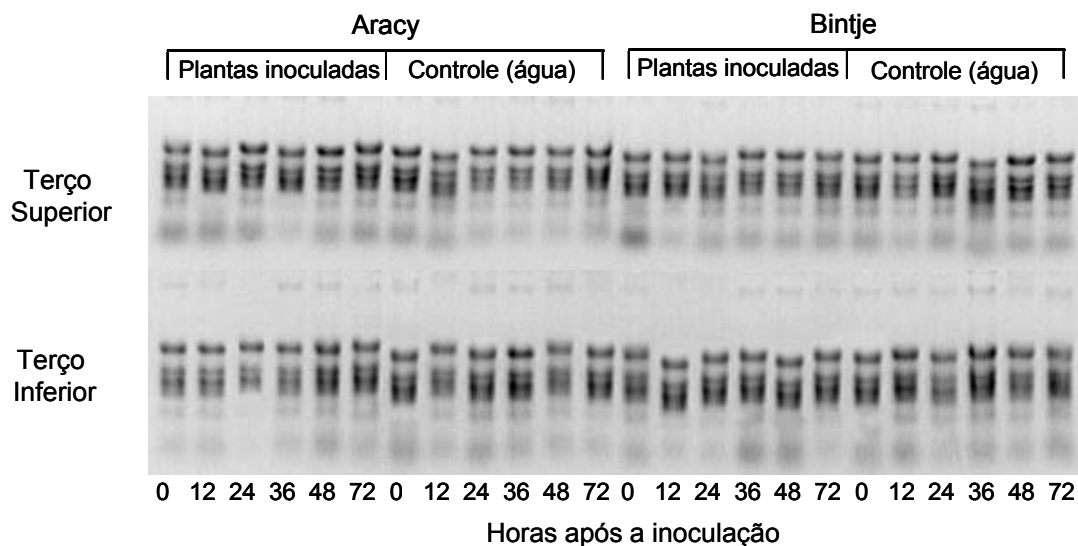


Figura 8 - Análise eletroforética do RNA total isolado de tecido foliar de dois cultivares de batata, Aracy (resistente) e Bintje (suscetível) coletado em diferentes tempos após a inoculação com *Alternaria solani* (10^3 conídios.mL⁻¹). Em cada canaleta foram carregados 10 ug de RNA total, que foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,2%) contendo 20 mM de ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico (MOPS), 5 mM de acetato de sódio, 1 mM de EDTA, pH 7,0, 100mgL⁻¹ de brometo de etídio e 18 mL/L de formaldeído 37% (12,3 M). A corrida eletroforética foi realizada a 80 V, durante 4 horas.

A análise de expressão dos genes da glucanase básica de tabaco (*gluB*) e a quitinase básica de feijão (*chiB*) em batata revelou que transcritos correspondentes a esses genes estão presentes em folíolos do terço superior e inferior dos cultivares Bintje e Aracy, independente da interação com *A. solani* (Figuras 9 e 10).

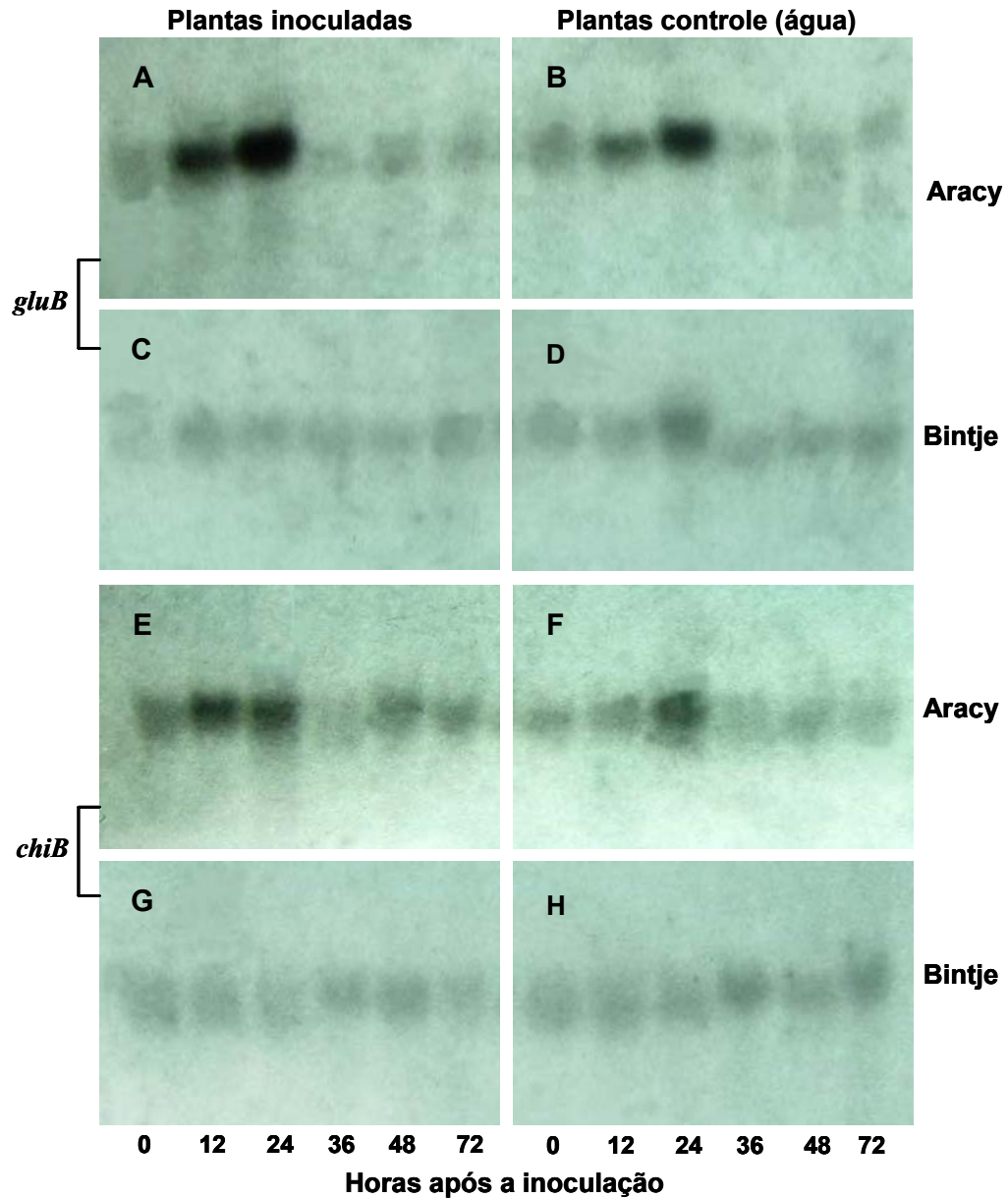


Figura 9 - Expressão de genes homólogos ao da glucanase básica de tabaco (*gluB*) e da quitinase básica de feijão (*chiB*) no terço inferior dos cultivares Aracy (Resistente) e Bintje (Suscetível) inoculadas com 10^3 conídios.mL⁻¹ de *Alternaria solani*. Para cada amostra empregaram-se 10 µg de RNA total. O RNA foi fracionado por eletroforese em gel de agarose, transferido para membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia) e hibridizado durante 24 horas, a 65°C, com os cDNA dos genes *gluB* e *chiB* marcados com [³²P]. A autoradiografia foi realizada a -80 °C durante sete dias utilizando filmes Kodak-BioMax.

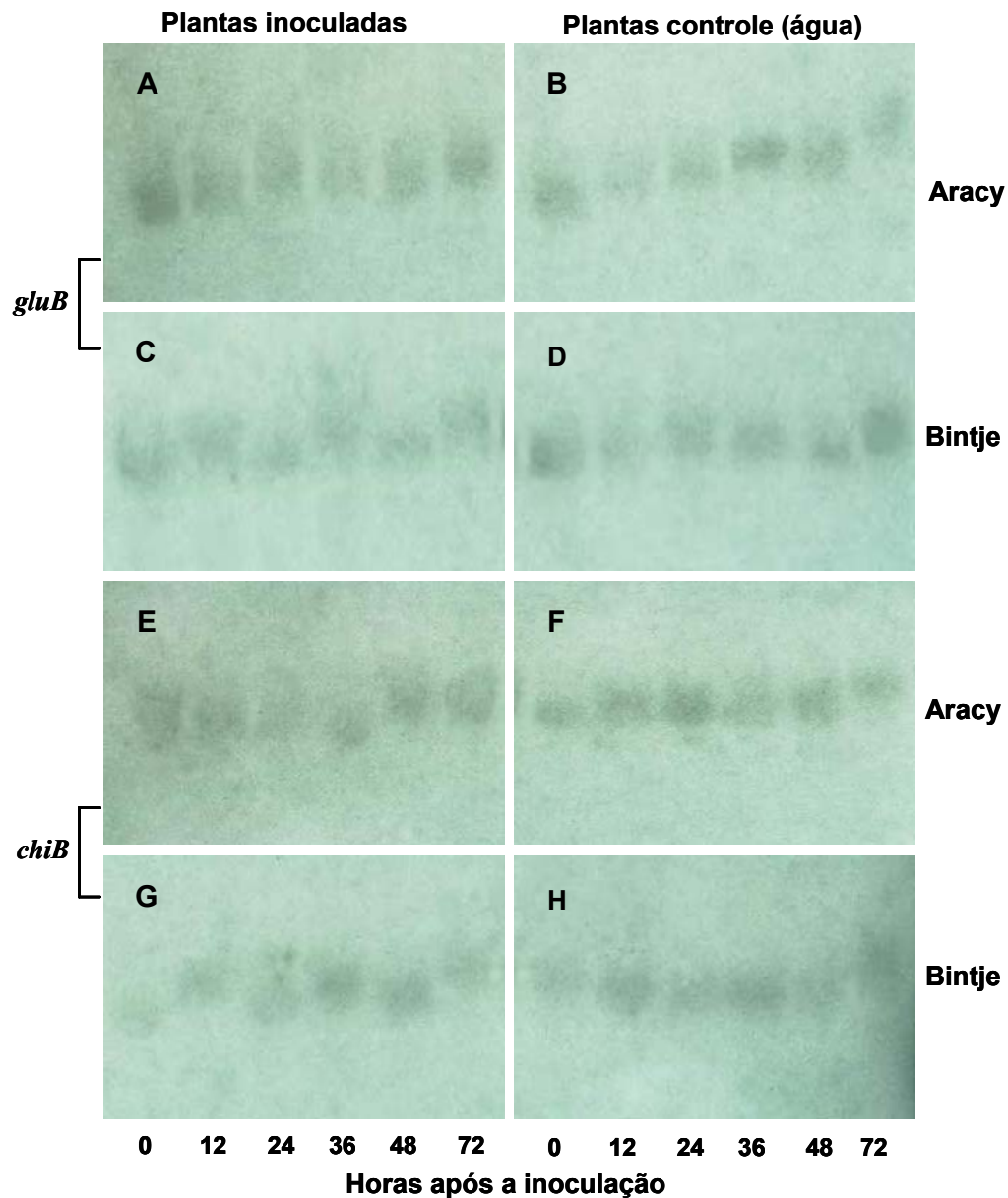


Figura 10 - Expressão de genes análogos ao da glucanase básica do tabaco (*gluB*) e da quitinase básica do feijão (*chiB*) no terço superior dos cultivares Aracy (Resistente) e Bintje (Suscetível) inoculadas com 10^3 conídios.mL⁻¹ de *Alternaria solani*. Para cada amostra empregaram-se 10 µg de RNA total. O RNA foi fracionado por eletroforese em gel de agarose, transferido para membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia) e hibridizado durante 24 horas, a 65 °C, com os cDNA dos genes *gluB* e *chiB* marcados com [³²P]. A autoradiografia foi realizada a -80 °C durante sete dias utilizando filmes Kodak-BioMax.

Um aumento nos níveis desses transcritos em resposta à inoculação com *A. solani* foi somente detectado no terço inferior do cultivar Aracy, às 12 e 24 horas após a inoculação (Figuras 9A, 9B, 9E e 9F). Embora em níveis menores, no terço inferior das plantas não inoculadas de 'Aracy' foi detectado um aumento nos transcritos correspondentes a *gluB* e *chiB*, neste mesmo período (Figuras 9B e 9F). No cultivar Bintje não foi detectada a indução destes genes em nenhum dos tratamentos (Figuras 9 e 10).

4. DISCUSSÃO

A resistência do cultivar Aracy à pinta preta caracterizou-se por um aumento no PI, redução do NL, da TEL e conseqüentemente da severidade em todos os terços avaliados. Já o menor NL, TEL, e severidade no terço médio explicam a resistência moderada de 'Delta'. O cultivar Desirée, considerado como suscetível, apresentou, no terço superior, valores de NL e AACPD similares a 'Aracy'.

Embora o PI tenha diferenciado o cultivar Aracy dos demais, esse componente não detectou a resistência intermediária de 'Delta'. O PI tem sido relatado como um componente correlacionado com a resistência à pinta preta em batata, assim como em outros patossistemas (PELLETIER e FRY, 1989; ROTEM, 1994; PARLEVLIT, 1979). É possível que o PI permita diferenciar classes de resistência à pinta preta em batata quando o nível de resistência presente nos genótipos é alto, sendo pouco eficiente para detectar níveis de resistência intermediária. Assim, a utilização do PI como critério de seleção em programas de melhoramento para a resistência à pinta preta em batata deve ser considerado cuidadosamente, pois genótipos com níveis de resistência intermediários e com características agrônômicas de interesse podem ser descartados durante o processo de seleção.

O NEAA e o PL provavelmente foram influenciados pelo fato de os experimentos terem sido conduzidos em condições de casa de vegetação onde a umidade relativa é baixa e o molhamento foliar é praticamente zero. Um fator

importante para a esporulação de espécies do gênero *Alternaria* bem como de outros fungos nos tecidos do hospedeiro é a umidade ou molhamento do tecido foliar (MILLER, 1975; HOLLEY *et al.*, 1985; EVERTS e LACY, 1990). NUNES (1983) encontrou diferenças entre genótipos de batata quanto à resistência à pinta preta avaliando estes dois componentes em condições de casa de vegetação. Esta discrepância de resultados pode ser devido às características dos isolados utilizados, genótipos de batata avaliados, assim como a metodologia de quantificação empregada.

Em trabalhos conduzidos em campo houve correlação entre resistência à pinta preta e a quantidade de esporos produzidos por área foliar afetada (PELLETIER e FRY, 1989). O NEAA tem sido relatado como um componente que não é afetado pela duração do ciclo da cultura nem pela idade dos tecidos (ROTEM, 1994; MORETTO e BARRETO, 1997). Segundo JOHNSON e TAYLOR (1976), o NEAA é uma variável adequada para avaliar tanto a patogenicidade quanto a resistência, uma vez que mede a multiplicação do patógeno “per se”. Segundo os autores, o NEAA representa a soma dos efeitos de todos os componentes da resistência. A importância deste componente na resistência tem sido constatada no patossistema milho-*Bipolaris maydis*, onde a resistência conferida pelo gene *rhm1* é caracterizada por uma inibição marcante da esporulação (SIMMONS *et al.*, 2001). Assim é importante que, em trabalhos futuros, seja aprimorada a metodologia de incubação e inoculação para averiguar se a resistência do cultivar Aracy é também caracterizada por um menor NEAA.

Todos os componentes foram influenciados pela idade dos tecidos. Maior PI e menores valores de NL, TEL e severidade foram observados no terço superior, comprovando a menor suscetibilidade desses tecidos a *A. solani*. A variabilidade de reação desses tecidos nos diferentes cultivares sugere que características genéticas do cultivar, além do estado fisiológico de seus tecidos, determinam o grau de suscetibilidade à pinta preta. Uma descrição da resistência dos cultivares similar à descrita por REIFSCHNEIDER *et al.* (1985) é obtida quando se considera o terço médio das plantas. Esses resultados corroboram os resultados de CHRIST (1991). Este autor ao estudar o efeito do método de avaliação na caracterização de cultivares de batata

quanto à resistência à pinta preta, sugeriu que a avaliação no terço médio é a mais eficiente na diferenciação de cultivares.

A relação entre idade fisiológica dos tecidos e suscetibilidade parece ser característica de todos os patossistemas envolvendo o gênero *Alternaria*. Esta relação já foi relatada para *A. macrospora* em algodão (BASHI *et al.*, 1983), para *A. helianthi* em girassol (ALLEN *et al.*, 1983b), para *A. porri* em cebola (AVELING *et al.*, 1994), e para *A. cirsinoxia* em *Cirsium* (GREEN e BAILLEY, 2000). O maior número de células por unidade de superfície nos tecidos mais jovens sugere uma relação com a resistência tanto do ponto de vista físico, pelo fato de haver maior compactação celular nos tecidos mais jovens, quanto do ponto de vista bioquímico, pelo fato de que uma maior quantidade de células por unidade de área ser capaz de produzir maior quantidade de transcritos relacionados à resposta de defesa. Porém, a ausência diferenças no número de penetrações entre os terços não condiz com a hipótese de fatores físicos contribuírem para a maior resistência dos tecidos jovens. É possível que fatores relacionados à qualidade e/ou à quantidade dos metabólitos nestes tecidos sejam responsáveis pela resistência.

Embora os menores valores de NL sugiram a possibilidade da existência de mecanismos atuando na fase de pré-penetração, a análise histológica não permitiu determinar nos cultivares Aracy e Delta fatores de resistência que atuem sobre a germinação dos conídios, alongação dos tubos germinativos, formação de apressórios e penetração do patógeno. A resistência desses cultivares estaria relacionada com mecanismos atuando após a penetração do patógeno.

O número de sítios de penetração com células exibindo HR foi o componente microscópico de maior associação com a resistência do cultivar Aracy. A autofluorescência detectada nas lesões consideradas como HR, já foi relatada em pimentão (*Capsicum annuum* L.) uma planta não hospedeira, como resposta à infecção por *A. solani* (ARAÚJO, 2000). Essa autofluorescência é devido ao acúmulo de substâncias de defesa como polifenóis (KAMOUN *et al.*, 1999; FREYTAG *et al.*, 1994; VLEESHOUWERS *et al.*, 2000b). Reações de defesa com características similares às descritas neste trabalho e denominadas de HR foram igualmente detectadas em genótipos resistentes e suscetíveis de batata quando desafiados com *P. infestans*

(SCHRÖDER *et al.*, 1992; FREYTAG *et al.*, 1994; VLEESHOUWERS *et al.*, 2000b) e PVY (HINRICHS-BERGER *et al.*, 1999). A maior frequência de HR observadas em áreas do complexo estomatal poderiam estar relacionadas com um acúmulo diferencial e órgão específico de substâncias relacionadas com este fenômeno. BÜCHTER *et al.* (1997) e HOEGEN *et al.* (2002) constataram maior acúmulo de proteínas PR em áreas do complexo estomatal de tecidos de batata como resposta à infecção de *P. infestans*. Embora não tenha sido confirmado, os autores especulam que esse padrão de expressão poderia estar relacionado com o fato de os estômatos serem aberturas usadas por muitos patógenos para a penetração. Assim, o acúmulo destas proteínas poderia representar um mecanismo de defesa constitutivo contra o ataque de patógenos.

A associação entre o número de sítios de penetração mostrando HR com níveis de resistência parcial tem sido demonstrado para *Melampsora lini* em linho (KOWALSKA e NUIKS, 1999), e para *P. infestans* em batata (GEES e HOHL, 1988; VLEESHOUWERS *et al.*, 2000b). No caso da resposta a *P. infestans* em batata, VLEESHOUWERS *et al.* (2000b) verificaram que não só o número de células envolvidas na HR, mas também a velocidade de reação dessas células se correlaciona com a resistência dos cultivares. Genótipos silvestres do gênero *Solanum* com resistência “completa” reagiram mais rapidamente e com menor número de células envolvidas do que cultivares comerciais com resistência parcial. Segundo KOMBRINK e SCHMELZER (2001), este tipo de resposta pode ser explicado utilizando o modelo clássico de interação dos genes *R-Avr* (de WIT *et al.*, 1992), considerando-se a existência de diferenças na afinidade de proteínas R e AVR. Dessa maneira interações “fortes” ocorrem quando o nível de afinidade é elevado e interações “fracas” quando este nível é menor. No caso das interações “fortes”, a HR seria rápida e intensa e confinaria o patógeno nos sítios de penetração, enquanto que nas interações fracas, levariam a uma HR tardia incapaz de conter o avanço do patógeno. É possível também que apesar das células terem reagido com HR na “velocidade apropriada”, a quantidade de substâncias antimicrobianas (ex. proteínas relacionadas com a patogênese, fitoalexinas, compostos fenólicos) que normalmente são acumuladas como parte do

processo que leva ao fenômeno de HR, não foram produzidas na concentração necessária para conter ao patógeno no ponto de penetração.

Embora *A. solani* seja um patógeno necrotrófico, é possível que nas etapas iniciais do processo de infecção ocorram interações entre substâncias produzidas pelo patógeno e receptores na planta levando à ocorrência de HR. Reações de HR que ocorreram no tempo apropriado poderiam então explicar o menor NL no cultivar Aracy. A possibilidade de ocorrência de HR é suportada pelo trabalho de LAWRENCE *et al.* (2000). Esses autores constataram que elicitores obtidos a partir do tratamento de esporos e tubos germinativos de *A. solani* com enzimas hidrolíticas purificadas de tomateiro resistente ao patógeno são capazes de provocar HR em tomateiro.

A observação de HR nos cultivares suscetíveis sugere que esta reação de defesa obedece a critérios quantitativos e temporais. Assim, a frequência e, ou, a velocidade com que são detectadas pode estar associada com os níveis de resistência presentes nos genótipos em estudo. GEES e HOHL (1988) compararam as respostas de defesa à infecção de *P. infestans* de um genótipo de batata com resistência raça específica (interação incompatível) com outro genótipo com resistência parcial. Na interação incompatível, todas as células penetradas pelo patógeno reagiram com HR, enquanto no genótipo com resistência parcial a frequência de esta reação variava de 33 a 98 %. Os autores destacam que reações de defesa exibidas em interações compatíveis e incompatíveis apresentam um fenótipo indistinguível em nível citológico. Similarmente, XI *et al.* (2000) estudando a interação cevada - *Rhynchosporium secalis* verificaram que a resistência no cultivar Johnston estava associada com a presença de halos e aposições que confinavam o patógeno nos pontos de penetração. Essa reação de defesa também foi observada no cultivar suscetível, embora em menor frequência. Reações de hipersensibilidade em genótipos suscetíveis também foram observadas em estudos citológicos realizados nas interações batata-*P. infestans* (FERRIS, 1955; VLEESHOUWERS *et al.*, 2000b), batata-PVY (HINRICHS-BERGER *et al.*, 1999) e milho-*Colletotrichum graminicola* (MIMS e VAILLANCOURT, 2002). Embora uma maior velocidade de ocorrência de pontos de penetração com HR não tenha sido constatada no presente trabalho, é possível que com a

utilização de intervalos de amostragens menores e a execução de maior número de observações se detectem efeitos semelhantes.

A frequência de HR parece explicar só em parte a resistência presente em Aracy, uma vez que apenas 33,3 % dos sítios de penetração no cultivar Aracy (dados não mostrados) apresentaram HR. É possível que existam outros mecanismos de defesa que atuem conjuntamente com a HR retardando a colonização dos tecidos. No terço inferior, parece que o mecanismo adicional é a indução de proteínas PR em resposta à infecção uma vez que foi observado um aumento na expressão coordenada de genes homólogos ao gene da glucanase básica de tabaco (*gluB*) e ao da quitinase básica de feijão (*chiB*) às 12 e 24 h.a.i. Maior nível de expressão basal e indução de expressão de genes PR em resposta à infecção têm sido observados em tomateiro resistentes à *A. solani* (LAWRENCE *et al.*, 1996, 2000) e em cultivares de tomate com diferentes níveis de resistência a *P. infestans*.

Além da ação direta sobre as estruturas do patógeno mediante a hidrólise da quitina e glucanos presentes na parede celular fúngica, as proteínas PR podem também contribuir com a liberação de fragmentos (quitosanas, glucanos) que poderiam atuar como elicitores da resposta de hipersensibilidade (KOMBRINK *et al.*, 1988; Van LOON e Van STRIEN, 1999). No caso do cultivar Aracy, foi constatada uma maior frequência de células reagindo com HR como resposta à infecção de *A. solani* do que no cultivar Bintje. Esta reação teve um incremento às 24 h.a.i. coincidindo com o tempo de maior acúmulo de transcritos dos genes *gluB* e *chiB* neste cultivar. Embora estudos simultâneos de citologia e expressão gênica precisem ser feitos, os resultados obtidos fornecem evidências sobre o possível envolvimento direto ou indireto destes genes na resposta de HR no terço inferior neste patossistema.

A ausência da expressão diferencial no terço superior, onde se observou maior frequência de células exibindo HR, pode ser explicada por uma regulação da expressão dos genes PR dependente do estágio de desenvolvimento, do tipo de tecidos e de órgãos específicos relatada para outros genes PR (BÜCHTER *et al.*, 1997; ANCILLO *et al.*, 1999; HORNER *et al.*, 1999; HOEGEN *et al.*, 2002). De modo geral, tem-se verificado maior acúmulo de glucanases e quitinases básicas nas folhas velhas do que nas

jovens (LOTAN *et al.*, 1989; SAMAC *et al.*, 1990; SHCRÖDER *et al.*, 1992; BEERHUES e KOMBRINK, 1994; LAWTON *et al.*, 1994). A expressão relacionada à idade dos tecidos e ao tipo de órgão, parece ser regulada de forma específica. BÜCHTER *et al.* (1997) constataram que os níveis de expressão basal do gene da quitinase ácida (*chtA*) em batata eram maiores nas folhas velhas do que as jovens. No entanto, quando analisaram o padrão de expressão nos internódios encontraram um gradiente oposto. ANCILLO *et al.* (1999) clonaram dois genes que codificam para quitinases (*chtB* e *chtC*) em batata e verificaram que *chtC* era expresso em maior quantidade nas folhas jovens. Ao contrário, a quantidade de mRNA de *chtB* e da proteína correspondente aumentou proporcionalmente com a idade fisiológica da folha. Os autores concluíram que a regulação da expressão de genes da quitinase em batata é um processo dependente tanto da posição da folha quanto do estádio de desenvolvimento da planta.

O aumento da expressão de genes PR detectado nas plantas do cultivar Aracy não inoculadas com *A. solani* pode ter sido devido a estresses ocorridos durante o processo de inoculação. Embora vinte e quatro horas antes da inoculação as plantas tivessem sido transferidas para a câmara de inoculação, é possível que a manutenção por vinte e quatro horas em câmara de nevoeiro após a inoculação possa ter induzido a expressão das proteínas PR neste cultivar. É interessante observar que este fenômeno não foi observado em plantas do cultivar Bintje submetidas às mesmas condições. Isto também poderia ser considerado como uma evidência de sua baixa capacidade de expressar proteínas PR como resposta a estresses. O aumento nos níveis de expressão de genes PR encontrado nas plantas controle em experimentos conduzidos com patógenos, bem como as variações detectadas entre experimentos, têm sido atribuídos a possíveis condições de estresse (Van PELT-HEERSCHAP e SMIT-BAKKER, 1999; KEMP *et al.*, 1999; VLEESHOUWERS *et al.*, 2000a). Estresses provocados por ferimentos (KRISHNAVENI *et al.*, 1999), aplicação de produtos químicos (COQUOZ *et al.*, 1995; SPLETZER e ENYEDI, 1999), exposição a raios ultravioletas (EL GHAOUTH *et al.*, 2003), poluentes do ar (BAHL *et al.*, 1995) entre outros, podem causar um aumento nos níveis de expressão de genes PR, na ausência de interação com patógenos.

O isolamento dos genes PR de expressão diferencial, no cultivar Aracy e posterior transformação genética de Bintje com estes genes sob o controle de promotores tecido-específicos, ou constitutivos poderia fornecer evidências mais concretas sobre sua função específica nestes tecidos e comprovar o papel direto desses genes na resistência do cultivar Aracy.

A relação entre senescência dos tecidos e a suscetibilidade ou resistência a doenças é ainda pouco conhecida. A regulação de ambos fenômenos é complexa, sendo que o mesmo processo que regula a morte celular na senescência pode ser utilizado em outros tipos de morte celular programada como, por exemplo, na reação de hipersensibilidade (NOODÉN e PENNY 2001; YOSHIDA, 2003). A senescência e a HR têm aspectos fisiológicos e moleculares em comum. Genes que regulam a senescência compartilham homologia com genes de resposta de defesa como domínios LRR ("leucine rich repeat"), domínios transmembranas e domínios Serina/Treonina quinase (TORII, 2000, YOSHIDA, 2003). Estudos que relacionem estes processos devem ser conduzidos para um maior entendimento dos mecanismos que governam a resistência associada à idade dos tecidos. Tais conhecimentos poderão fornecer subsídios em estratégias de melhoramento genético e controle de doenças em plantas.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A pinta preta é a principal doença fúngica da batata em condições de clima quente e úmido. Os cultivares resistentes disponíveis normalmente não apresentam boas características comerciais. Visando entender os mecanismos envolvidos na resistência de quatro cultivares de batata à pinta preta, esse trabalho teve por objetivos: 1) quantificar os componentes epidemiológicos da resistência de quatro cultivares de batata com diferentes níveis de resistência à pinta preta e estudar o efeito da idade dos tecidos nesses componentes; 2) realizar a análise histológica do processo infeccioso nesses cultivares visando identificar possíveis mecanismos estruturais e/ou bioquímicos relacionados com os níveis de resistência dos cultivares e com a resistência de tecidos jovens; 3) verificar se a expressão diferencial de genes homólogos aos genes que codificam as proteínas PR gluB (glucanase básica de tabaco) e chiB (quitinase básica de feijão) respectivamente, se correlaciona com os níveis de resistência dos cultivares analisadas, e com a maior resistência dos tecidos jovens.

Os componentes epidemiológicos da resistência, período de incubação (PI), número de lesões (NL), a severidade, taxa de expansão das lesões (TEL), período latente médio (PL) e o número de esporos por área foliar afetada (NEAA) foram quantificados nos terços inferior, médio e superior de plantas das cultivares Aracy (resistente), Delta (resistência intermediária), Desirée (suscetível) e Bintje (suscetível) inoculadas com *Alternaria solani* (isolado

ASA02) numa concentração de 10^3 conídios.mL⁻¹. Os componentes que melhor diferenciaram as cultivares quanto à resistência à pinta preta foram o NL, a TEL e a severidade, sendo influenciados pela idade dos tecidos. O PL e o NEAA não se mostraram adequados para a avaliação da resistência em condições de casa de vegetação e, provavelmente, foram influenciados pela falta de molhamento foliar. Pela confiabilidade dos resultados e facilidade de avaliação, a severidade no terço médio mostrou-se como o componente mais adequado na avaliação da resistência, contudo, esta escolha estará sujeita aos interesses específicos da pesquisa.

A análise histológica do processo infeccioso de *A. solani* nas diferentes cultivares e tecidos, foi realizada por meio da técnica de diafanização de tecidos. Avaliou-se qualitativa e quantitativamente o número de conídios germinados, a formação de apressórios, a penetração, e sítios de penetração mostrando reação de hipersensibilidade (HR). Os resultados dessa análise demonstraram que mecanismos de resistência atuando na fase de pré-penetração do patógeno não são responsáveis pelos níveis de resistência dos cultivares estudadas, nem pela maior resistência dos tecidos jovens. Constatou-se uma relação positiva entre o número de sítios de penetração mostrando HR e a resistência dos cultivares e tecidos jovens.

A expressão de genes homólogos à glucanase básica de tabaco (*gluB*) e à chitinase básica de feijão (*chiB*) como resposta a infecção de *A. solani* foi analisada nos terços inferior e superior das cultivares Bintje e Aracy, mediante a técnica de “Northern Blotting”. Um aumento na expressão de transcritos a *gluB* e *chiB* foi constatado no terço inferior da cultivar Aracy, mas não em Bintje. Esse padrão de expressão sugere um possível envolvimento de isoformas destes genes com a resistência da cultivar Aracy a *A. solani*. Essa expressão diferenciada não foi observada em folhas do terço superior dessa cultivar sugerindo um padrão de regulação gênica dependente da idade dos tecidos, e o envolvimento de outros mecanismos bioquímicos na resistência de folhas jovens.

Estudos detalhados envolvendo técnicas mais sensíveis como “microarrays” hibridização “in situ” e utilizando um número maior de genes, deverão ser conduzidos visando entendimento dos mecanismos de resistência associados à idade dos tecidos neste patossistema. A superexpressão ou

silenciamento destes genes mediante o uso de plantas transgênicas também poderia ser uma ferramenta útil no intuito de entender a função de genes com expressão tecido-específica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, S.J., BROWN, J.F., KOCHMAN, J.K. The infection process, sporulation and survival of *Alternaria helianthi* on sunflower. **Annual of Applied Biology**, v.102, p.413-419, 1983a.
- ALLEN, S.J., BROWN, J.F., KOCHMAN, J.K. The effect of leaf age, host growth stage, leaf injury and pollen infection on sunflower by *Alternaria helianthi*. **Phytopathology**, v.73, p.896-898, 1983b.
- .ANCILLO, G.; WITTE, B.; SCHMELZER, E.; KOMBRINK, E. A distinct member of the basic (class I) chitinase gene family in potato is specifically expressed in epidermal cells. **Plant Molecular Biology**, v.39, p.1137-1151, 1999.
- ANGUELOVA, V.S.; VAN DER WESTHUIZEN, A.J.; PRETORIUS, Z.A. Intercellular proteins and beta-1,3-glucanase activity associated with leaf rust resistance in wheat. **Physiologia Plantarum**, v.106, p.393-401, 1999.
- ARAÚJO, J.C.A. de. **Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiro resistente e suscetível**. Viçosa, MG, UFV. 53p. (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- AVELING, T.A.S., SNYMAN, H.G., RIJKENBERG, F.H.J. Morphology of infection of onion leaves by *Alternaria porri*. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p.1164-1170, 1994.
- BAHL, A.; LOITSCH, S.M.; KAHL, G. Transcriptional activation of plant defense genes by short-term air pollutant stress. **Environmental Pollution**, v.89, p.221-227, 1995.
- BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, v.22, p. 87-108, 1964.

- BASHI, E.; ROTEM, J.; PINNSCHMIDT, H.; KRANZ, J. Influence of controlled environment and age on development of *Alternaria macrospora* and shedding of leaves of cotton. **Phytopathology**, v.73, p.1145-1147, 1983.
- BEERHUES, L., KOMBRINK, E. Primary structure and expression of mRNA encoding basic chitinases and 1,3- β -Glucanases in potato. **Plant Molecular Biology**, v.24, p.353-367, 1994.
- BOITEUX, L.S.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Identificação e caracterização da resistência do tipo redutora da taxa de progresso do cretamento foliar (*Alternaria solani*) em clones e cultivares de batata. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.86-90, 1993.
- BOITEUX, L.S.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; FONSECA, M.E.; BUSO J.A. 1995. Search for sources of early blight (*Alternaria solani*) field-resistance not associated with vegetative late maturity in tetraploid potato germplasm. **Euphytica**, v.83, p. 63-70, 1995.
- BRANDWAGT, B.F.; KNEEPERS, T.J.A.; VAN DER WEERDE, G.M.; NIJKAMP, H.J.J., HILLE JACKES. Most ALL toxin- sensitive *Nicotiana* species are resistant to the tomato fungal pathogen *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Molecular Plant- Microbe Interaction**, v.14, p.460-470, 2001.
- BROGGIO, M.; RANUCCI, A. *In vitro* infection for potato early blight *Alternaria solani*. **Rivista di Agricola, Subtropicale e Tropicale**, p.355-366, 1992.
- BROGLIE, K.; CHET, I.; HOLIDAY M.; CRESSMAN, R.; BIDDLE P, KWOLTON, S.; MAUVAIS, C.J.; BROGLIE, R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. **Science**, v.254, p.1194-1197. 1991.
- BRUNE, S.; DE MELO P.E.; LIMA M.F. Resistência a *Alternaria solani*, característica agrônômica e qualidade de fritura em clones de batata imunes a PVY e PVX. **Horticultura Brasileira**, v.12, p.125-130, 1994.
- BÜCHTER, R.; STROMBERG, A.; SCHMELZER, E.; KOMBRINK, E. Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.749-761, 1997.
- CARUSO, C.; CHILOSI, G.; CAPORALE, C.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. **Plant Science**, v.140, p.87-97,1999.
- CHRIST, B.; MACZUGA, S.A. The effect of fungicides schedules and inoculum levels on early blight severity and yield of potato. **Plant Disease**, v. 73. p.695-698, 1989.
- CHRIST, B.J. Effect of disease assessment method on ranking potato cultivars for resistance to early blight. **Plant Disease**, v.75, p.353-356. 1991.

- CHURCHILL, A.C.L.; BAKER, C.J.; O'NEILL, N.R.; ELGIN, J.H.. Development of *Colletotrichum trifolii* races 1 and 2 on alfalfa clones resistant and susceptible to anthracnose. **Canadian Journal of Botany**, v.66, p.75-81, 1988.
- COQUOZ, J.L.; BUCHALA, A.J.; MEUWLY, P.; METRAUX, J.P. Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v.85, p.1219-1224, 1995.
- DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; RICHBERG, M. H. Death don't have no mercy: Cell death program in plants. **Plant Cell**, v.8, p.1793-1807, 1996.
- DATTA, K.; VELAZHAHAN, R.; OLIVA, N.; ONA, I.; MEW, T.; KHUSH, G.S.; MUTHUKRISHNAN, S., DATTA, S.K. Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.1138-1145, 1999.
- De WIT, P.J.G.M. Molecular characterization of gene for gene system in plant-fungus interaction and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.391-418, 1992.
- DOUGLAS, D.R.; PAVEK, J.J. Screening potatoes for field resistance to early blight. **American Potato Journal**, v.49, p.1-6, 1972.
- DOW, M.; NEWMAN, MA.; VON ROEPENAK, E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. **Annual Review of Phytopathology**, v.38, p.241, 2000.
- EL GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; CALLAHAN, A.M. Induction of chitinase e β -1,3-Glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. **Phytopathology**, v.93, p.349-355, 2003.
- EMMETT, R.W., PARBERY, D.G. Appressoria. **Annual Review of Phytopathology**, v.13, p.147-167, 1975.
- ESNAULT, R.; BUFFARD, D.; BREDAS, C.; SALLAUD, C.; ELTURK, J.; KONDOROSI, A. Pathological and molecular characterizations of alfalfa interactions with compatible and incompatible bacteria, *Xanthomonas campestris* pv *alfalfae* and *Pseudomonas syringae* pv *pisi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.655-664, 1993.
- EVERTS, K.L.; LACY, M.L. The influence of the dew duration relative humidity, and leaf senescence in on conidia formation and infection of onion by *Alternaria porri*. **Phytopathology**, v.80, p.1203-1207, 1990.
- FERRIS, V.R. Hystological study of pathogen-suscep relationships between *Phytophthora infestans* and derivatives of *Solanum demisium*. **Phytopathology**, v.45, p.546-552, 1955.

- FRANK, J.A.; WEBB, R.E.; DOUGLAS, D.R. Evaluation of several USDA potato clones for resistance to early blight. **Plant Disease Reporter**, v.63, p.392-394, 1979.
- FREYTAG, S.; ARABATZIS, N.; HALBROCK, K.; SCHEMELZER, E. Reversible cytoplasmatic rearrangements precede wall appositions, hypersensitivity cell death and defense-related gene activation in potato/*Phytophthora infestans* interactions, **Planta**, v.194, p.123-135, 1994.
- GAO, A.G.; HAKIMI, S.M.; MITTANCK, C.A.; WU, Y.; WOERNER, B.M.; STARK, D.M.; SHAH, D.M.; LIANG, J.H.; ROMMENS, C.M.T. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, v.18, p.1307-1310, 2000.
- GEES, R.; HOHL, H.R. Cytological comparison of specific (R3) and general resistance to late blight in potato leaf tissue. **Phytopathology**, v.78, p.350-357, 1988.
- GIANINAZZI, S.; MARTIN, C.; VALLÉE, J.C. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. **CR Academic Science of Paris**, v.270, p.2383-2386, 1970.
- GREEN, S.; BAILEY, K.L. Effects of leaf maturity, infection site, and application rate of *Alternaria circinnoxia* conidia on infection of Canada thistle (*Cirsium arvense*). **Biological Control**, v.19, p.167-174, 2000.
- HAMMERSSCHMIDT, R. Phytoalexins, what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, v.37, p.285-306, 1999.
- HARRISON, M.D.; LIVINGSTON, C.H.; OSHIMA, N. 1965. Epidemiology of potato early blight in Colorado. Initial infection disease development and the influence of environmental factors. **American Potato Journal**, v.42, p.279-291, 1965.
- HENSEL, G.; KUNZE, G.; KUNZE, I. Expression of the tobacco gene CBP20 in response to developmental stage, wounding, salicylic acid and heavy metals. **Plant Science**, v.148, p.165-174, 1999.
- HERRIOTT, A.B.; HAYNES, J.F.L.; SHOEMAKER, P.B. Inheritance of resistance to early blight disease in tetraploid x diploid crosses of potatoes. **Hortscience**, v.25, p.224-226, 1990.
- HINRICHS-BERGER, J.; HARFOLD, M.; BERGER, S. BUCHENAUER, H. Cytological responses of susceptible and extremely resistant potato plants to inoculation with potato virus Y. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.143-150, 1999.

- HOEGEN, E.; STROMBERG, A.; PIHLGREN, U.; KOMBRINK, E. Primary structure and tissue-specific expression of pathogenesis-related protein PR-1b in potato. **Molecular Plant Pathology**, v.3, p.329-45, 2002.
- HOLLEY, J.D.; HALL, R.; HOFSTRA, G. Effect of cultivar resistance, leaf wetness and temperature on rate of development of potato early blight. **Canadian Journal of Plant Science**, v.65, p.179-184, 1985.
- HOOKER, W. Compendio de Enfermedades de la Papa. Lima: CIP, 1980. 166p.
- HORNER, H.T.; PALMER R.G.; SHOEMAKER, R.C. Analysis and mapping of gene families encoding beta-1,3-glucanases of soybean Jin. **Genetics**, v.153, p.445-452, 1999.
- JOHANSON, A.; THURSTON, H.D. The effect of cultivars maturity on the resistance of potatoes to early blight caused by *Alternaria solani*. **American Potato Journal**, v. 67, p. 615-622, 1990.
- JOHNSON, R.; TAYLOR, A.J. Spore yield of pathogens investigations of the race-specificity of host resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.14, p. 97-119, 1976.
- JONGEDIJK, E.; TIGHELAAR, H.; VANROEKEL, J.S.C.; BRESVLOEMANS, S.A.; DEKKER, I.; VANDENELZEN, I. Synergistic activity of chitinases and beta-1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. **Euphytica**, v.85, p.173-180, 1995.
- KAMOUN, S.; HUITEMA, E.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? **Trends in Plant Science**, v.4, p.196-200, 1999.
- KAUFFMANN, S. LEGRAND, M; GEOFFROY, P.; FRITIG, B. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related protein have 1,3- β -Glucanase activity. **EMBO Journal**, v.6, p.3209-3212, 1987.
- KEMP, G.; BOTHA, A.M.; KLOPPER F.J.; PRETORIUS, Z.A. Disease development and β -1,3-Glucanase expression following leaf rust infection in resistant and susceptible near-isogenic wheat seedling. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p. 45-52, 1999.
- KISHIMOTO, K.; NISHIZAWA, Y.; TABELI, Y.; HIBI, T.; NAKAJIMA, M.; AKUTSU K. Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). **Plant Science**, v.162, p.655-662, 2002.
- KOMBRINK, E.; SCHMELZER, E. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p. 69-78, 2001.

- KOMBRINK, E.; SCHRODER, M. HAHLBROCK, K. Several 'pathogenesis-related' proteins in potato are 1,3- β -Glucanases and chitinases. **Proceedings of the National Academy, USA**, v.85, p.782-786, 1988.
- KOWALSKA, A.; NUIKS, R.E. Histology of quantitative resistance in flax to flax rust fungus (*Melampsora lini*). **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.21, p.354-360, 1999.
- KRISHNAVENI, S.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIANG, G.H.; WILDE, G.; MANICKAM, A. Induction of chitinases and 1,3- β -glucanases in resistant and susceptible cultivars of sorghum in response to insect attack, fungal infection and wounding. **Plant Science**, v.144, p. 9-16, 1999.
- LAWRENCE, C.B.; JOOSTEN, M.H.A.J.; TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.48, p.361-377. 1996.
- LAWRENCE, C.B.; SINGH, N.P.; QIU, J.; GARDNER, R.G.; TUZUN, S. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.57, p.211-220, 2000.
- LAWTON, K.A.; BECK, J.; POTTER, S.; WARD, E.; RYALS, J. Regulation of cucumber class III chitinases gene expression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, p.48-57, 1994.
- LEGRAND, M., KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; FRITIG, B. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related protein are chitinases. **Proceedings of the National Academy, USA**, v.84, p.6750-6754, 1987.
- LIU, D.; RAGHOTHMA, K.G.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Osmotin over expression in potato delays development of disease symptoms. **Proceedings of the National Academy, USA**, v.91, p.1888-1892, 1994.
- LONGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v.163, p.16- 20, 1987.
- LONGO, N.; NALDINI, B.; DROVANDI, F.; GONNELLI, T.; TANI, G. Penetration and early colonization in basidiospore-derived infection of *Melampsora pulcherrima* (Bub.) Maire on *Mercurialis annua* L. **Caryologia**, v.47, p.207-222, 1994.

- LORITO, M.; WOO, S.L.; FERNANDEZ, I.G.; COLUCCI, G.; HARMAN, G.E.; PINTOR-TORO, J.A.; FILIPPONEM, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C.B.; ZOINA, A.; TUZUN, S.; SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy, USA**, v.95, p.7860-7865, 1998.
- LOTAN, T.; ORI, N.; FLUHR, R. Pathogenesis-related proteins developmentally regulated in tobacco flowers. **Plant Cell**, v.1, p.881-887, 1989.
- LUDWIG, R.A.; RICHARDSON, L.T.; UNWIN, C.H. A Method for inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. **Canadian Plant Disease Survey**, v.42, p.149-150, 1962.
- MATSUOKA, K. **Resistência de *Capsicum annum* L. a *Phytophthora capsici* Leonian**. Viçosa, MG: UFV, Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 112 p. 1988.
- MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolase in Pea tissue. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and 1,3- β -glucanase. **Plant Physiology**, v.88, p.936-942, 1988.
- MAYER, R.T.; INBAR, M.; MCKENZIE, C.L.; SHATTERS, R.; BOROWICZ, V.; ALBRECHT, U.; POWELL C.A.; DOOSTDAR, H. Multitrophic interactions of the silverleaf whitefly, host plants, competing herbivores, and phytopathogens. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.51, p.151-169, 2002.
- MCKENZIE, C.L.; SHATTERS, R.G.; DOOSTDAR, H.; LEE, S.D.; INBAR, M.; MAYER, R.T. Effect of geminivirus infection and *Bemisia* infestation on accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.49, p.203-214, 2002.
- McROBERTS, N.; LENNARD, J.H. Pathogen behavior and plant cell reactions in interactions between *Alternaria* species and leaves of host and nonhost plants. **Plant Pathology**, v.45, p.742-752, 1996.
- MIHOVILOVICH, E.; MARTIN, C.; TORRES, H. Tamizado para resistencia al tizón temprano (*Alternaria solani*) en la colección de germoplasma do CIP (grupo andigena). **Fitopatologia**, v. 25, p.23-26. 1990.
- MILLER, M.E. Environmental factors associated with the spread of purple blotch . (Abst.). **Proceeding of American Phytopathology Society**, v.2. p.35, 1975.
- MIMS, C.W.; VAILLANCOURT, L .J. Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletorichum graminicola* and by *C. graminicola* pathogenicity mutant. **Phytopathology**, v.92, p.802-813, 2002.

- MORETTO, K.C.K.; BARRETO, M. Effect of the evaluation criterion in the determination of tomato resistance to early blight. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.228-231, 1997.
- MOURICHON, X.; CARLIER, J.Y.; FOURÉ, E. Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis*, surjeunes plantules de bananier issues de culture in vitro. **Fruit**, v.45, p.195-198, 1987.
- MULTANI, D.S.; MEELEY R.B.; PATTERSON, A.H.; GRAY, J.; BRIGGS, S.P.; JOHALS, G.S. Plant pathogens microevolution: Molecular basis for the origins of the fungal disease in maize. **Proceedings of the National Academy, USA**, v.95, p.1686-1691. 1998.
- NEUENSCHWANDER, U.; FRIEDRICH, L.; DELANEY, T.; VERNOOIJ, B.; KESSMANN, H., RYALS, J. Activation of plant disease resistance. **Aspects of Applied Biology**, v.42. p. 217-225, 1995.
- NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYERE, T.; GEES, R.; STINTZI, A.; LEGRAND, M, FRITTING, B.; MOSINGER, E. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: isolation and characterization of three 14 k-daltons proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**, v.108, p.17-27, 1995.
- NOODÉN, L.D.; PENNY JP. Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.2151-2159, 2001.
- NUNES. M.A. Parâmetros que expressam a resistência da batateira (*Solanum tuberosum* L.) à pinta preta (*Alternaria solani* Ellis & Martin Jones & Grout). Tese de Mestrado. Departamento de Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, 58 p. 1983.
- PALVA, T.K.; HOLMSTROM, K.O.; HEINO, P.; PALVA, E.T. Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.190-196, 1993.
- PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, v.17, p.203-22, 1979.
- PELLETIER, J.R., FRY, W.E. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: incubation period, lesion expansion rate, and spore production. **Phytopathology**, v.79, p.511-517, 1989.
- PELLETIER, J.R., FRY, W.E. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: receptivity, **Phytopathology**, v.80, p.361-366, 1990.
- PIÑA, A. **Estudio biológico y control de *Alternaria solani* en papa**. Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal. MINAGRI. Habana. Cuba. 1980.

- RAHIMI, S.; PERRY, RN.; WRIGHT, D.J. Identification of pathogenesis-related proteins of induced in leaves of potato plants infected with potato cyst nematodes, *Globodera pallida* species. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.49-59, 1996.
- RAHIMI, S.; WRIGHT, D.J.; PERRY, RN. Identification and localization of chitinase induced in the roots of potato plants infected with the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Fundamental Applied Nematology**, v.21, p.705-713, 1998.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CARRIJO, O.A.; LACERDA, F.N.; LOPES, A.C. Tamanho e número de lesões como indicadores de resistência de batata (*Solanum tuberosum* L.) a *Alternaria solani* (Ell e Mart.) Soraeur. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p.277-280, 1981.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CORDEIRO, C.M.T.; FILGUEIRA, F.A.R.; BITTENCOURT, C.; FONSECA, M.E.N. Avaliação da resistência de germoplasma de batata (*Solanum* spp.) a *Alternaria solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, p.597-604, 1985.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B.; FURUMOTO, O. FILGUEIRA, F.A.R. Illustrated key for the evaluation of early blight of potatoes. **Plant Protection Bulletin**, v.32, p.91-94, 1984.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B.; LOPES, C.A.; COBBE, R.V. Manejo integrado das doenças da batata. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, (EMBRAPA-CNPQ, Circular Técnica, 7). 1989. 15p.
- ROHINI, V.K.; RAO, S. Transformation of peanut (*Arachys hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response to leaf spot disease. **Plant Science**, v.160, p.889-898, 2001.
- ROTEM, J. **The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity**. St. Paul: APS Press, 1994. 326p.
- SAMAC, D.A.; HIRONAKA, D.M.; YALLALY, P.E.; SHAH, D.M. Isolation and characterization of the genes encoding basic and acid chitinase in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 93, p.907-914, 1990.
- SCHLAGNHAUFER, C.D.; ARTECA, R.N.; PELL, E.J. Sequential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes in response to biotic and abiotic stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.683-688, 1997.
- SCHRÖDER, M.; HAHNBROCK, K; KOMBRINK, E. Temporal and spatial patterns of 1,3- β -Glucanases and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. **Plant Journal**, v.2. 161-172, 1992.
- SCHULUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VOGELI, V.; BOLLER, T. Plant chitinase are a potent inhibitor of fungal growth. **Nature**, v.324, p.265-267, 1986.

- SELA-BUURLAGE, M.B.; PONSTEIN, A.S.; BRESS VLOEMANS, S.A.; MELSCHER, L.S.; VAN DEN ELZEN, P.J.M.; CORNELISEN B.J.C. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and beta-1,3-Glucanase exhibit antifungal activity. **Plant Physiology**, v.101, p. 857-863, 1993.
- SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization in the expression of Slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v.67, p.1051-1056, 1977.
- SHTIENBERG, D. FRY, W.E. Quantitative analysis of host resistance, fungicide and weather effects on potato early and late blight using computer simulation models. **American Potato Journal**, v.67, p. 277-286, 1990a.
- SHTIENBERG, D.; BERGERON, S.N.; NICHOLSON, A.G.; FRY, W.E.; EWING, E.E. Development and evaluation of a general model for yield loss assessment in potatoes. **Phytopathology**, v.80, p. 466-472, 1990.
- SHTIENBERG, D.; BLACHINSKY, D.; BEN-HADOR, G.; DINOOR, A. Effects of growing season and the fungicide type on the development of *Alternaria solani* and potato yield. **Plant Disease**, v.80, p.994-998, 1996.
- SHTIENBERG, D.; FRY, W.E. Influence of host resistance and crop rotation on appearance of potato early blight. **Plant Disease**, v.74, p.849-852, 1990b.
- SILLERO, J.C.; RUBIALES D. Histological characterization of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in faba bean. **Phytopathology**, v.92, p.294-299, 2002
- SIMMONS, C.R.; GRANT, S.; ALTIER, D.J.; DOWD, P.F.; CRASTA, O.; FOLKERTS, O.; YALPANI, N. Maize *rhm1* resistance to *Bipolaris maydis* is associated with few differences in pathogenesis-related proteins and global mRNA profiles. **Molecular Plant-Microbe interactions**, v.14, p.947-954, 2001.
- SPLETZER, M.E.; ENYEDI, A.J. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. **Phytopathology**, v.89, p.722-727, 1999.
- STEVENSON, W.R. The potential impact of field resistance to early blight on fungicide inputs. **American Potato Journal**, v.71, p.317-324, 1994.
- TORII, K.U. Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emergent pictures. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.361-367, 2000.
- Van DYKE, C.G., TRIGIANO, R.N. Light and scanning electron microscopy of the interaction of the biocontrol fungus *Alternaria cassiae* with sicklepod (*Cassia obtusifolia*). **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.9, p.230-235, 1987.

- Van LOON, L.C.; Van KAMMEN, A. Polyacrilamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Sansum NN' II. Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, 40: 199- 201, 1970.
- Van LOON, L.C; Van STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activity and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.
- Van PELT-HEERSCHAP, H.; SMIT-BAKKER, O. Analysis of defense related proteins in the stem tissue of carnation inoculated with a virulent an avirulent race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.681-691, 1999.
- VLEESHOUWERS, V.G.A.A.; VAN DOOIJEWERT, W.; GOVERS, F.; KAMOUN, S.; COLON, L.T. Does basal PR gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.57, p.35-42, 2000a.
- VLEESHOUWERS, V.G.A.A.; VAN DOOIJEWERT, W.; GOVERS, F.; KAMOUN, S.; COLON, L.T. The hypersensitivity response is associated with host and non-host resistance to *Phytophthora infestans*. **Planta**, v.210, p.853-864, 2000b.
- WEINGARTNERT, D.P. Early blight. In: W.J. Hooker (Ed.) **Compendium of potato disease**. St Paul. MN: American Phytopathological Society, 1981. p.43-44.
- WESSELS J.G.H.; SIETSMA, J.H. Fungal cells walls: a survey: in Tanner, W. Loewus F.A eds. *Encyclopedia of Plant Physiology*. v.13B. *Plant carbohydrates*. Berlin. Springer- Verlag. p.352-394,1981.
- XI, K.; BURNETT, P.A.; TEWARI, J.P.; CHEN, M.H.; TURKINTON, T.K.; HELM. J.H. Histopathological study of barley cultivars resistant and susceptible to *Rhynchosporium secalis*. **Phytopathology**, v.90, p.94-102, 2000.
- YOSHIDA, S. Molecular regulation of leaf senescence. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.79-84, 2003.
- ZHAO, K.J.; CHYE, M.L. Methyl jasmonate induces expression of a novel *Brassica juncea* chitinase with two chitin-binding domains. **Plant Molecular Biology**, v.40, p.1009-1018, 1999.
- ZHU, Q.; MAHER, E.A.; MASOUND, S, DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. **Bio/Technology**, v.12, p.807-812, 1994.

ZIADI, S.; BARBEDETTE, S.; GODARD, J.F.; MONOT, C.; L.E.; CORRE, D.; SILUE, D. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)-downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. **Plant Pathology**, v.50, p.579-586, 2001.