



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Caracterização molecular, morfológica e  
biológica do agente etiológico da pinta-preta  
em solanáceas no Brasil**

**Celma Cardoso Peixoto**

**Recife – PE**

**2015**

**CELMA CARDOSO PEIXOTO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOLÓGICA E BIOLÓGICA DO  
AGENTE ETIOLÓGICO DA PINTA-PRETA EM SOLANÁCEAS NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ailton Reis

Co-Orientador: Prof<sup>o</sup>. PhD. Leonardo Silva Boiteux

**RECIFE-PE**

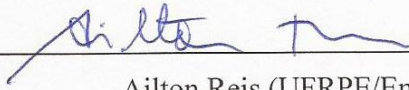
**FEVEREIRO – 2015**

**CARACTERIZAÇÃO, MOLECULAR, MORFOLÓGICA E BIOLÓGICA DO  
AGENTE ETIOLÓGICO DA PINTA-PRETA EM SOLANÁCEAS NO BRASIL**

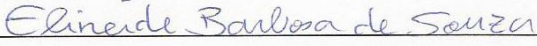
**CELMA CARDOSO PEIXOTO**


Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 26/02/2015.

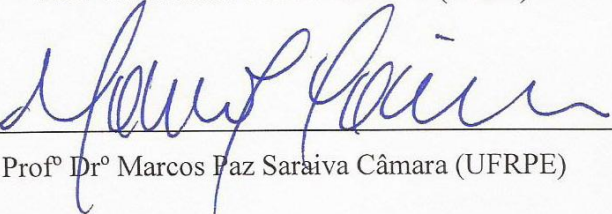
**ORIENTADOR:**


  
Ailton Reis (UFRPE/Embrapa Hortaliças)

**EXAMINADORES:**

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Vanusa da Silva (UFPE)

  
Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves de Oliveira (UFRPE)

**RECIFE-PE**

**FEVEREIRO – 2015**

*A meus pais Claudemiro e Celidalva e a  
meu irmão Júnior pelo apoio  
incondicional em todos os momentos.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS pela vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE e a Embrapa Hortaliças pela oportunidade de realização do curso e, à Capes, pela concessão da bolsa.

A meu orientador, Dr. Ailton Reis, pela confiança na condução deste trabalho e pela amizade adquirida.

A meu co-orientador, Dr. Leonardo Boiteux e a Dra. Esther, pela ajuda sendo esta essencial para a realização deste trabalho, contribuindo com suas experiências.

Ao Dr. Antônio Williams Moita (CNPq) pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao pessoal dos Laboratórios de Fitopatologia e Melhoramento: Fabiana, Edivânio, Luana, Cléia, Elenice, Niday, Fred, Amanda e Wagner pela convivência e momentos de descontração que, aliás, não foram poucos!

Ao amigo Maurício Rossato por estar sempre disposto a ajudar e pelo auxílio nas análises moleculares.

Ao técnico do Laboratório de Melhoramento Antônio Francisco Costa (Chico Bucha) pelos ensinamentos práticos, paciência e disposição em ajudar.

As “meninas do ponto” Néia, Cecília e Amanda pela amizade adquirida ao longo da condução deste trabalho.

A todos os colegas do curso pelo convívio e amizade e aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE.

E a todos aqueles que, de alguma forma, participaram do desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO GERAL.....	viii
GENERAL ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO I- Introdução Geral.....	12
1. Família Solanácea .....	13
1.1. Tomateiro.....	13
1.2. Batateira.....	14
1.3. Outras Solanáceas de importância econômica.....	15
1.4. Solanáceas invasoras.....	16
2. Doenças das Solanáceas.....	16
2.1. Pinta-preta.....	17
2.1.1. Gênero <i>Alternaria</i> .....	19
2.1.2. Caracterização morfológica.....	20
2.1.3. Caracterização molecular.....	22
2.1.4. Gama de hospedeiras e resistência a fungicidas.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO II - Caracterização morfológica e diversidade molecular dos agentes etiológicos da pinta-preta em solanáceas no Brasil.....	34
Resumo.....	35
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	40
Resultados e Discussão.....	44
Referências.....	53
Tabelas e Figuras.....	56
CAPÍTULO III - Patogenicidade e sensibilidade ao fungicida tebuconazole em isolados de <i>Alternaria</i> spp. de solanáceas.....	67
Resumo.....	68
Abstract.....	70
Introdução.....	71
Material e Métodos.....	73
Resultados e Discussão.....	75
Referências.....	81

Tabelas e Figuras.....	83
CONCLUSÕES GERAIS.....	89

## RESUMO GERAL

A pinta-preta, causada por fungos do gênero *Alternaria*, afeta diversas solanáceas importantes economicamente e as espécies *A. tomatophila* e *A. grandis* prevalecem como agentes causais da doença em batateira e tomateiro, respectivamente. O controle se baseia no uso de fungicidas protetores e sistêmicos. Todavia, existem relatos da existência de outras espécies de *Alternaria* causando pinta-preta em plantas da família Solanácea. O presente trabalho teve como objetivos realizar a caracterização molecular, morfológica e biológica de isolados de *Alternaria* oriundos de solanáceas cultiváveis e silvestres de diferentes regiões do Brasil. A caracterização molecular foi feita mediante sequenciamento e análises filogenéticas das regiões Alt a 1, GPD e Calmodulina. A caracterização morfológica foi conduzida por meio da mensuração das dimensões dos conídios e quantificação do número de septos e rostros. Na caracterização biológica realizou-se a avaliação da gama de hospedeiras solanáceas e testes *in vitro* de sensibilidade ao fungicida tebuconazole. As análises filogenéticas dos genes Alt a 1, GPD e Calmodulina possibilitaram a identificação das espécies *A. tomatophila*, *A. mimicula* e *A. dauci* oriundos de tomateiro, e também das espécies *A. grandis* e *A. solani* provenientes de batateira e lobeira. As características morfológicas da maioria dos isolados concordaram com a caracterização molecular. O isolado EH1642-BA identificado como *A. solani* foi capaz de causar pinta-preta em todos os hospedeiros exceto o pimentão. Já o EH1823-CE da espécie *A. tomatophila* e o EH1548-DF de *A. grandis* provenientes de tomateiro e batateira não apresentaram especificidade para as duas plantas hospedeiras originais. Contudo, os isolados EH1143-RS da espécie *A. dauci* e EH1377-CE de *A. mimicula* mostraram especificidade por hospedeira de origem ocasionando sintomas típicos da pinta-preta apenas em tomateiro. Isolados obtidos de tomateiro e berinjela causaram doença nas invasoras silvestres *Datura stramonium* e *Physalis pubescens* e isolados originários de *D. stramonium* e *Nicandra physaloides* provocaram sintomas em tomateiro, batateira e jiló. Em relação à sensibilidade ao tebuconazole verificou-se que em termos gerais os isolados apresentaram alta sensibilidade ao produto sob condições *in vitro*. Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram a ocorrência de *A. tomatophila* e *A. grandis* como agentes causais da pinta-preta em tomateiro e batateira e foram detectadas pela primeira vez no Brasil a presença das espécies *A. dauci* e *A. mimicula* associadas à doença em tomateiro. Verificou-se ainda que solanáceas invasoras podem atuar como fontes de inóculo do patógeno e que o tebuconazole apresentou eficiência no controle *in vitro* para todos os isolados avaliados.



**Palavras chave:** *Alternaria*, tomate, batata, solanáceas invasoras, controle químico.

## GENERAL ABSTRACT

Early blight caused by species from *Alternaria* genus affects several solanaceous of economic importance. Previous studies have shown that the species *A. tomatophila* and *A. grandis* prevail as causal agents of disease on tomato and potato, respectively. The control of this disease is based on the use of protective and systemic fungicides. However, there are reports of the existence of other species of *Alternaria* causing early blight in plants of the Solanacea family. This study aimed to perform molecular, morphological and biological characterization of *Alternaria* isolates from cultivated and wild solanaceous from different regions of Brazil. Molecular characterization of the isolates was done by sequencing and phylogenetic analysis of the genes Alt a1, GPD and Calmodulin. Morphological characterization was performed by measurement of dimensions of the conidia and quantification of the number of septa and rostrums. Biological characterization of *Alternaria* isolates was done by evaluation of host range and by the *in vitro* sensitivity to tebuconazole. Phylogenetic analysis of the genes Alt a1, GPD and Calmodulin allowed the identification of the species *A. tomatophila*, *A. mimicula* and *A. dauci* from tomato, and the species *A. grandis* and *A. solani* from potato and from lobeira, respectively. Morphologic characteristics of most isolates corroborate the molecular characterization. The isolate EH1642-BA, identified as *A. solani*, was able to cause early blight on all solanaceous hosts evaluated except the sweet pepper. EH1823-CE of the specie *A. tomatophila* and EH1548-DF of *A. grandis* isolates from tomato and potato, respectively, had not specificity for their original host plants. However, the isolates EH1143-RS of the specie *A. dauci* and EH1377-CE of *A. mimicula* showed specificity for original host causing typical symptoms of early blight only on tomato. *Alternaria* isolates from tomato and eggplant caused disease on wild invasive solanaceous *Datura stramonium* and *Physalis pubescens* and isolates from *D. stramonium* and *Nicandra physaloides* caused symptoms of early blight on tomato, potato and jiló. In the sensitivity tests to the fungicide tebuconazole in general the isolates showed high sensitivity under *in vitro* conditions. The results obtained in this study confirmed the occurrence of *A. tomatophila* and *A. grandis* as causal agents of early blight on tomato and potato, respectively, and in this work were detected for the first time in Brazil the presence of *A. dauci* and *A. mimicula* associated with the disease on tomato. It has been found that some wild solanaceous can act as pathogen inoculum sources and the tebuconazole was efficient in the *in vitro* control for the isolates evaluated.

**Keywords:** *Alternaria*, tomato, potato, solanaceous wild, chemical control.

## **CAPÍTULO I**



### **Introdução Geral**

# CARACTERIZAÇÃO, MOLECULAR, MORFOLÓGICA E BIOLÓGICA DO AGENTE ETIOLÓGICO DA PINTA-PRETA EM SOLANÁCEAS NO BRASIL

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Família Solanaceae

A família Solanaceae, pertencente ao grupo das plantas vasculares, está incluída na subclasse Asteridae, no grupo das Euasterides na ordem Solanales (JUDD et al., 1999; HUNZIKER, 2001). Esta família compreende cerca de 96 gêneros e três mil espécies, habitando sistemas ecológicos estabelecidos pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde a América do Sul está como centro da diversidade e distribuição (GRIFFIN; LIN, 2000; NIÑO; CORREA; MOSQUERA, 2009; WINK, 2003). Segundo Stehmann et al. (2014) especificamente no Brasil existem cerca de 34 gêneros abrangendo 469 espécies e, dentre estas, 225 são exclusivas do país.

O grupo das Solanáceas possui grande relevância econômica pelo fato de incluir espécies utilizadas como importantes fontes de alimento, além do uso medicinal e ornamental. No Brasil o setor de hortaliças é responsável por 2,0% do PIB agrícola (MELO, 2014) sendo que a produção total atingiu 18.769 toneladas, cultivadas em uma área de 800,1 mil hectares, em 2012 (IBGE, 2012). De acordo com Melo (2006), cerca de 75% da produção está concentrada nas regiões Sudeste e Sul, e os 25% restantes estão distribuídos no Nordeste e Centro-Oeste, sendo a produção do Norte incipiente. Dentre as espécies de hortaliças solanáceas adotadas na alimentação humana destacam-se o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), a batateira (*S. tuberosum* L.), a berinjela (*S. melogena* L.) e o pimentão (*Capsicum annuum* L.). O tomateiro e a batateira possuem os maiores percentuais de produção, 20,6 e 19,9% respectivamente, considerando a produção total de hortaliças no Brasil (IBGE, 2012).

#### 1.1. Tomateiro

O tomateiro é originário da zona Andina, localizada na América do Sul, sendo introduzido no país por imigrantes europeus no fim do século XIX (ALVARENGA, 2004). Esta hortaliça fruto caracteriza-se por ter ciclo anual e fácil adaptação, apresentando sistema

radicular amplo, caule anguloso e fruto tipo baga com coloração variando entre amarelo e vermelho (MANUAL..., 2013).

A cultura do tomateiro é uma das mais expressivas no cenário agrícola mundial, e o seu fruto, fonte de vitamina A e C, Ácido Ascórbico, fósforo e cálcio, constitui-se importante produto para o comércio “in natura” sendo a China, os Estados Unidos, a Turquia, a Índia e a União Européia os principais produtores. Em relação ao tomate e produtos que passam por processamento registrou-se no ano de 2006 cerca de 9,7 milhões de toneladas em exportações e 8,7 milhões de toneladas em importações no mercado mundial, destacando-se a União Européia, os Estados Unidos, a China e a Turquia como exportadores, e a União Européia, Estados Unidos e Rússia em importação (ESTUDO..., 2009). O Brasil, além de ser o maior produtor de tomate da América Latina, também é o principal país em termos de produção dentro do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) (DADOS..., 2012).

O tomateiro é cultivado em todo território nacional sendo que em 2013 foram produzidas cerca de 4.187.646 toneladas com rendimento médio de 66.802 kg.ha<sup>-1</sup>. A produção está concentrada principalmente nas regiões Sudeste e Centro Oeste e o Estado de Goiás é o principal produtor (IBGE, 2013). Para este espera-se que sejam produzidas cerca de 1.025.567 toneladas de tomate com rendimento médio de 88.047 kg.ha<sup>-1</sup>. Em termos de produção esperada o estado de São Paulo está em segundo lugar, com 849.052 toneladas de tomate e rendimento médio de 75.124 kg.ha<sup>-1</sup>. Além destes estados, Minas Gerais também tem uma importante participação com valores de produção e rendimento médio estimados de 674.962 toneladas e 72.631 kg.ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2015).

## **1.2. Batateira**

Também originária dos Andes, a batateira é uma planta anual com sistema radicular superficial apresentando hastes aéreas, estólons, crescendo no sentido horizontal, e em suas extremidades os tubérculos (SCHWARTZMANN, 2010; TOFOLI et al., 2012).

A batateira é cultivada nos cinco continentes, sob condições de clima temperado, subtropical e tropical e nos mais variados agro-ecossistemas, níveis tecnológicos e sistemas de produção. Na América Latina a produção de batata aumentou cerca de 80% nos últimos 30 anos sendo que a Argentina, o Brasil e a Colômbia destacam-se como centros de produção (FERREIRA et al., 2008). Dentre os países do MERCOSUL a Argentina é o principal

produtor com uma produção de 28,5 t.ha<sup>-1</sup> (DADOS..., 2012; NAKANO; DELEO; BOTEON, 2006).

No Brasil a batata não é considerada um alimento básico como o feijão e o arroz, porém é a olerácea que abrange a maior área cultivada (CAMARGO FILHO; CAMARGO, 2008). A produção de batata no país em 2013 foi de 3.553.772 toneladas com rendimento médio de 27.752 kg.ha<sup>-1</sup> destacando-se as regiões Sul e Sudeste como as principais produtoras (IBGE, 2013). O estado de Minas Gerais apresenta a maior produção esperada de batata do país (1.200.359 toneladas) seguido pelo Paraná (838.140 toneladas) com rendimentos médios esperados de 31.463 kg.ha<sup>-1</sup> e 28.216 kg.ha<sup>-1</sup> respectivamente (IBGE, 2015).

### **1.3. Outras Solanáceas de importância econômica**

A berinjela é uma solanácea de ciclo anual a qual pode ser cultivada em diversos tipos de solos, desde os arenosos até os muito argilosos (ANTONINI et al., 2002; SOARES NETO; BUENO; SANTOS, 2010). Apresenta caule do tipo semi-lenhoso, ereto ou prostrado com frutos grandes, pendentes, do tipo baga, de formato variável (oval, oblongo, redondo, oblongo-alongado, alongado etc.), comumente brilhantes, de coloração branca, rosada, zebrina, amarela, púrpura ou preta (RIBEIRO et al., 2007).

A produção da berinjela no Brasil é de 78.217 toneladas sendo que 90% desta concentra-se na região Sudeste e 61% do total produzido está localizado no estado de São Paulo. Em relação ao total da produção de hortícolas, a berinjela representa uma pequena parcela, cerca de 1,3% do total da produção no Brasil, e 3,2% no estado de São Paulo (ANEFALOS et al., 2008, CENSO AGROPECUÁRIO, 2006).

O pimentão, hortaliça solanácea de origem latino-americana, apresenta porte arbustivo sendo cultivada como planta anual, podendo permanecer, também, como planta semiperene (LIMA et al., 2007). Os frutos possuem formato retangular, quadrado ou cônico apresentando as colorações vermelho, amarelo, laranja, verde, creme e roxo. (FAEP, 2009; FILGUEIRA, 2003).

Esta cultura pode ser implantada tanto em campo aberto quanto em estufas prevalecendo no Brasil o cultivo em campo aberto. A produção total de pimentão no Brasil foi de 248.767 toneladas (CENSO AGROPECUÁRIO, 2006), destacando-se os estados de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Distrito Federal e Estados do Nordeste (MALDONATO, 2001; EMATER-DF, 2011).

#### 1.4. Solanáceas invasoras

Além das plantas cultivadas comercialmente existem ainda no grupo das solanáceas outras espécies denominadas de invasoras silvestres. Estas merecem atenção pelo fato de, além de competirem com as culturas olerícolas, serem potenciais fontes de inóculo de vários patógenos os quais podem causar consideráveis danos aos cultivos de hortaliças comercializáveis.

Silva-Barreto et al. (2010) conseguiram detectar isolados de *Rhizoctonia solani* K. associados a espécies de invasoras patogênicos a batateira em campos de cultivo desta cultura. Em trabalhos de pesquisa com o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), vírus patogênico a tomateiro, detectou-se a ocorrência desse fitopatógeno na planta invasora *Nicandra physaloides* L. comprovando o potencial desta invasora como fonte de inóculo do begomovírus (BARBOSA et al., 2009). A similaridade genética entre as diversas espécies de solanáceas, incluindo as invasoras, justifica a existência de uma ampla gama de doenças em comum nestas espécies (DOGANLAR et al., 2002; ZAMBOLIM; VALE; COSTA, 2000).

## 2. Doenças das Solanáceas

As hortaliças solanáceas podem ser acometidas por uma série de doenças de etiologia fúngica as quais causam perdas econômicas na produção de diversas espécies cultiváveis pertencentes a este grupo. Os fungos fitopatogênicos e oomicetos são capazes de provocar doenças em diferentes partes das plantas podendo resultar em subdesenvolvimento do vegetal com consequente diminuição na produção ou afetam diretamente os produtos a serem comercializados, ou seja, folhas, frutos e tubérculos.

Dentre as principais doenças causadas por fungos e oomicetos especificamente em solanáceas destacam-se: a murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersyci* S.) a murcha, requeima ou podridão de raiz (*Phytophthora capsici* L.); a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* P.); a podridão de Sclerotinia ou mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* L.); a podridão algodão, (*P. vexans* B. e *Phytophthora* spp. B.); a seca dos ramos (*Ascochyta phaseolorum* S.); a murcha de Verticillium (*Verticillium albo-atrum* R. & B.); o *damping off* ou podridão de colo e raízes (*A. solani* E & G, *Colletotrichum* sp. P., *Diaporthe capsici* P., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* S., *Phytophthora capsici* L., e



*Phomopsis vexans*); as manchas foliares (*Alternaria* spp. N., *Cercospora* spp. e *Stemphylium* spp.) e os oídios (*Oidium* spp.) (AGROLINK, 2014).

## 2.1. Pinta-preta

As alternarioses, ocasionadas por fungos do gênero *Alternaria*, estão entre as doenças fúngicas mais comuns das hortaliças em todos os locais onde há produção. Caracterizam-se por afetar plântulas, folhas, caules, hastes, flores e frutos de várias hortaliças além das solanáceas, tais como, apiáceas, aliáceas, crucíferas, cucurbitáceas e chichoriáceas. A doença pode receber diferentes denominações a depender do grupo de hortaliças que afetam sendo conhecida como “pinta-preta” para tomateiro, batateira e pimentão; “mancha de alternaria”, para crucíferas, chichoriáceas e cucurbitáceas em geral; “mancha púrpura” para aliáceas, e queima das folhas para as apiáceas (TOFOLI; DOMINGUES, 2004).

Entre as doenças que afetam as solanáceas, a pinta-preta é uma das mais importantes em termos econômicos devido às perdas que causa na produção e qualidade do produto apresentando elevado potencial destrutivo. A doença, preferencialmente, incide sobre plantas mais velhas com tecidos mais maduros, provocando, sob condições ideais de temperatura e umidade, a destruição completa de folhas, queda do vigor das plantas, quebra de hastes, depreciação de frutos e tubérculos e morte de plantas (PAULA; OLIVEIRA, 2003; PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; TOFOLI; DOMINGUES, 2004).

As lesões da pinta-preta podem ocorrer de forma isolada ou em grupos apresentando ou não halo clorótico. Os sintomas aparecem primeiramente nas folhas mais velhas expressando-se por meio de lesões foliares pardo escuras necróticas, circulares ou não com anéis concêntricos típicos e bordos bem definidos. Em caules e hastes de plantas adultas os sintomas surgem na forma de manchas marrom-escuras, alongadas, deprimidas, podendo ou não apresentar halos concêntricos evidentes. Pode haver a formação de cancrios no colo de plantas jovens que provocam muitas das vezes tombamento e morte das mesmas. Em frutos os sintomas característicos, comumente localizados na região do pedúnculo, são manchas escuras, deprimidas e com anéis concêntricos (Figura 1). Nos tubérculos as lesões, quando aparecem, são escurecidas, deprimidas, com forma circular a irregular apresentando bordos de coloração púrpura ou bronzeada. Quando a lesão chega a atingir a polpa, esta ganha um aspecto coriáceo de cor amarela a castanha (Figura 2) (REIS; BRUNE; MIZUBUTI, 2002; TOFOLI; DOMINGUES, 2004).



**Figura 1.** Sintomas de pinta-preta causada por *Alternaria* sp. em folha (A), frutos (B) e haste (C) de tomateiro. Fotos: A e B - Ailton Reis e C - Carlos Lopes.



**Figura 2.** Sintomas de pinta-preta causada por *Alternaria* sp. em folha (A), e tubérculo (B) de batateira. Fotos: A - W. R. Stevenson. e B - Portal do Agronegócio.

### 2.1.1. Gênero *Alternaria*

O gênero *Alternaria* foi primeiramente descrito em 1816 por Nees von Esenbeck o qual denominou o espécime tipo como *A. tenuis* N. No ano de 1832 Fries, não reconhecendo a descrição anterior, redescreveu *A. tenuis* como *Torula alternata* F. em seu livro intitulado *Systema Mycologicum*. No século seguinte Keissler (1912) reavaliou as caracterizações realizadas por Nees e Fries e sinonimizou os espécimes como *A. alternata* o qual é atualmente o tipo reconhecido para o gênero. Estudando a taxonomia de *Alternaria* com base em características morfológicas Simmons conseguiu descrever cerca de 275 espécies dentro do gênero (SIMMONS, 2007). As espécies de *Alternaria* estão presentes em diversos ambientes como o ar, poeira, solo, sementes e plantas mortas e são capazes de sobreviver em condições de baixa e alta temperatura, característica que confere ao gênero ampla adaptabilidade (ROTEM, 1994).

*Alternaria* é um gênero de fungos mitospóricos que possuem conídios com comprimento e largura variável, geralmente individuais e raramente catenulados, retos ou ligeiramente curvos, com corpo oblongo ou elipsoidal que afina-se em direção ao ápice, formando um rostro comprido, sinuoso e ocasionalmente ramificado. Apresentam coloração palha, parda ou ouro claro, com septos transversais e poucos ou nenhum longitudinal. Os conídios são inseridos em conidióforos septados retos ou sinuosos que ocorrem isolados ou em grupos. As populações de *Alternaria* spp. são caracterizadas por apresentarem-se morfológicamente heterogêneas, diferindo quanto à coloração do micélio, produção de pigmentos em meio de cultura, presença ou ausência de esporulação em condições de laboratório, bem como quanto à patogenicidade e formação de setores em meio de cultura (TOFOLI; DOMINGUES, 2004).

Espécies do gênero *Alternaria*, as quais fazem parte do grupo de fungos causadores de manchas foliares, são capazes de sobreviver, como micélio ou esporos, em restos de culturas, matéria orgânica presente no solo, no interior ou na superfície das sementes, em hospedeiros alternativos ou ainda em tecidos da planta caso a mesma seja perene. A disseminação dos propágulos pode ser feita pelo vento, respingos de água decorrente de chuvas e sementes contaminadas. A infecção tem início no momento em que os conídios entram em contato com a superfície da planta hospedeira os quais podem penetrar no tecido mediante ferimentos ou de forma direta via emissão de apressório, sendo a presença de água livre fundamental para a ocorrência da germinação e infecção. Uma vez no interior da hospedeira inicia-se o processo

de colonização intercelular, favorecida por temperaturas amenas (24 a 28°C), o que leva a alteração de processos fisiológicos da planta resultando no aparecimento dos sintomas típicos (Figura 3). A reprodução do patógeno se dá a medida que os tecidos vegetais vão sendo colonizados havendo produção de conídios nos tecidos necrosados, mais precisamente no centro da lesão. Os conídios exteriorizam-se mediante rupturas na superfície foliar ou via estômatos. Temperaturas noturnas de 16 a 24°C associadas a umidade do ar elevada favorecem a ocorrência de epidemias (AGRIOS, 2005; BEDENDO, 2011; PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013).

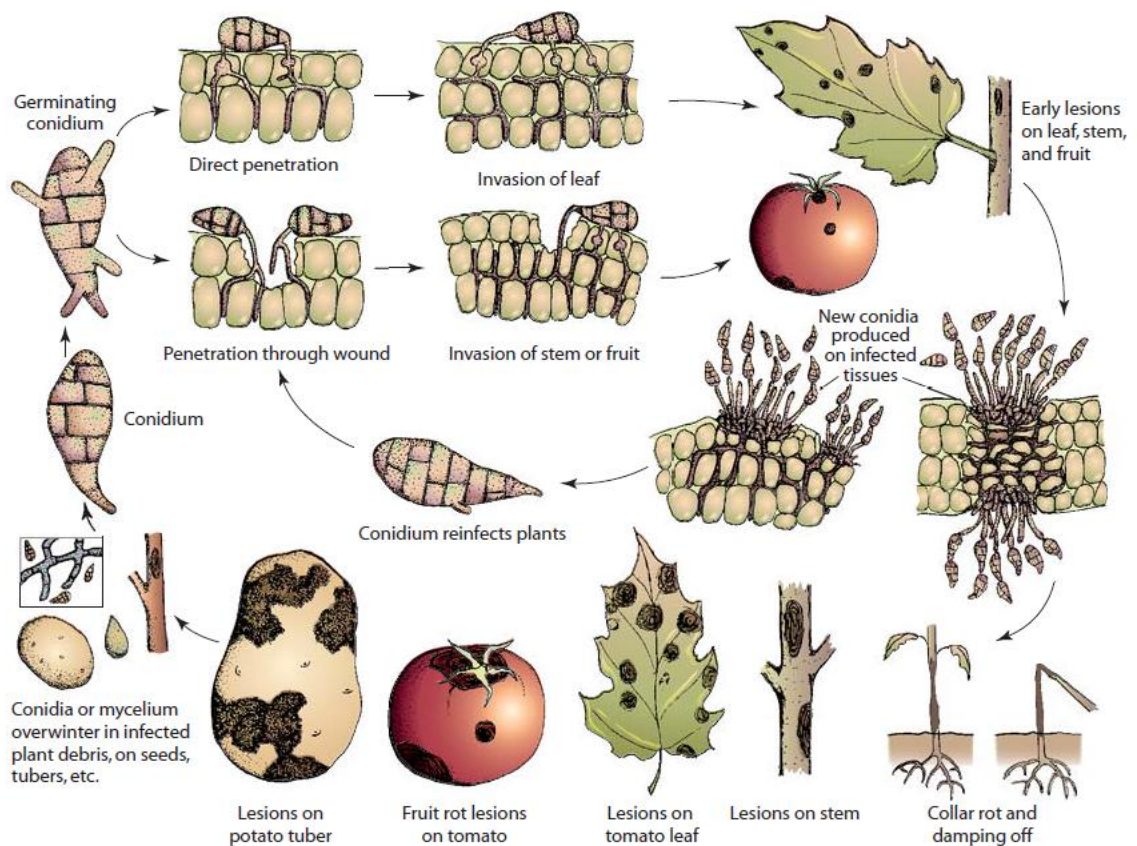


Figura 3. Ciclo da pinta-preta (Agrios, 2005).

### 2.1.2. Caracterização morfológica

A análise morfológica é o método clássico utilizado na identificação de fungos fitopatogênicos e inclui avaliações de características intrínsecas e extrínsecas de fungos tais como pigmentação, textura, forma marginal das colônias e velocidade de crescimento

micelial; processo de formação, forma e tamanho de esporos (BURGESS; MALAJCZUK; DELL, 1995). Especificamente para *Alternaria* spp., que ocorrem em solanáceas, as características morfológicas utilizadas na identificação de espécies são as dimensões dos conídios, comprimento do rostro, o número de septos transversais e longitudinais e número de rostros que cada conídio apresenta (RODRIGUES et al., 2010; RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009).

Conídios jovens de *A. solani* são hialinos, geralmente medem  $50 \times 12 \mu\text{m}$ , são alongados a ovóides e têm número de septos variável entre 3 a 6. Os conídios maduros geralmente têm comprimento e largura que variam de  $90$  a  $100 \times 18$  a  $24 \mu\text{m}$ , respectivamente, têm de 10 a 11 septos transversais, de 1 a 2 septos longitudinais. Eles são lisos e tipicamente ovóides e marrons. O rostro tem 5 a 8  $\mu\text{m}$  de largura e 40 a 80  $\mu\text{m}$  de comprimento, podendo atingir até 150  $\mu\text{m}$ . Os conidióforos de *A. solani* têm, geralmente,  $50 \times 10 \mu\text{m}$  de tamanho (comprimento e largura). Conídios com um único rostro afilado predominam na população de *A. solani*, seguido por aqueles que têm dois rostros; raramente ocorrem conídios com três rostros (SIMMONS, 2000).

Em trabalhos de pesquisa realizados nos Estados Unidos, Simmons (2000) propôs uma nova espécie, *A. tomatophila* Simmons, para aquelas populações que causam a pinta-preta em tomateiro ao invés de *A. solani*. As populações adaptadas a batateira seriam denominadas de *A. grandis*. Tal proposta era baseada em diferenças nas características da morfologia dos conídios e esporulação (SIMMONS, 2000). Morfologicamente, as espécies *A. grandis*, *A. tomatophila* e *A. solani* são bem distintas. Na espécie *A. tomatophila* os conídios apresentam três e até quatro rostros enquanto que em *A. grandis* e *A. solani*, a maioria dos conídios possui um único rostro. Posteriormente, Simmons (2007), baseando-se ainda em características morfológicas, conseguiu identificar isolados oriundos de tomateiro como *A. tomatophila* e aqueles oriundos de batata como *A. grandis*.

Silva (2006) observou a ocorrência de pouca variação entre isolados de *A. solani* de plantas de batateira e tomateiro oriundas de nove estados das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e do Distrito Federal quanto as características morfológicas dos conídios, tais como número de septos transversais, número de septos longitudinais, comprimento do corpo, largura, comprimento do rostro, número de rostros, coloração e formato predominantes. No entanto, outras pesquisas mostraram que as espécies *A. grandis*, *A. tomatophila* e *A. solani* podem ser facilmente diferenciadas por meio da dimensão dos conídios, sendo que estes são maiores em largura e comprimento na espécie *A. grandis* (RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009).

Em outras pesquisas, Rodrigues et al. (2010) trabalhando com isolados de *Alternaria* oriundos de tomateiro e batateira demonstraram que a espécie *A. solani* aparentemente não está associada a ocorrência da pinta-preta nestas culturas. Segundo os autores os agentes causais da doença seriam *A. tomatophila* e *A. grandis* para tomateiro e batateira, respectivamente, havendo a possibilidade de distinção destas espécies via morfologia.

Outras espécies fitopatogênicas a solanáceas foram identificadas por Simmons (2007) por meio de características morfológicas: *A. cretica*, *A. elegans*, *A. mimicula*, *A. subcylindrica*, *A. tomatocola* e *A. tomato* associadas a pinta-preta em tomateiro; *A. bataticola*, *A. beringelae* e *A. capsici* causando doença em batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) berinjela (*S. melongena* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) respectivamente.

### **2.1.3. Caracterização molecular**

Apesar de ser relativamente útil a caracterização morfológica de fungos fitopatogênicos não tem sido suficiente para a identificação de espécies devido basicamente a alguns fatores tais como: o baixo número de caracteres passíveis de serem analisados, a alta instabilidade e dependência da composição do meio utilizado para o crescimento da cultura, as condições de incubação além das variações intrínsecas ao patógeno (FUNGARO, 2000; PERES et al, 2003). Neste sentido a utilização das técnicas moleculares para a identificação de fungos fitopatogênicos a nível de espécie tem se tornado uma ferramenta fundamental nos trabalhos de pesquisa pelo fato de propiciar resultados bastante precisos.

Os marcadores moleculares têm sido amplamente usados em taxonomia por permitirem a avaliação de níveis de diversidade genética e relações filogenéticas inter e intraespecíficas. A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foi utilizada em estudos de caracterização de 28 isolados de *Curvularia* sp endofíticos de milho sendo obtidos 185 marcadores dentre os quais 142 mostraram polimorfismo. O agrupamento fundamentado nestes marcadores possibilitou a distinção destes isolados em quatro espécies e também detectou uma ampla variabilidade genética intraespecífica em *Curvularia lunata* (SHAN et al., 2008). Em pesquisas realizadas em 2010, foram descritas as espécies *Stemphylium phaseolina* e *S. variabilis*, isoladas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), mediante caracterização morfológica e sequenciamento dos genes ITS (Internal Transcribed Spacer) e GPD (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). (WANG et al., 2010). Recentemente Manamgoda et al. (2014) reconstruíram a filogenia molecular do gênero *Bipolaris* baseando-se em análise

concatenada de sequências dos genes ITS, GPD e TEF-1 $\alpha$  e descreveram morfologicamente 47 espécies dentro do gênero.

O sequenciamento de DNA constitui-se em ferramenta muito utilizada na identificação de espécies de *Alternaria*. A análise de alguns genes tem mostrado diferenças nas sequências de nucleotídeos sendo que essas diferenças muitas vezes são suficientes para separar espécies dentro de um mesmo gênero. Especificamente para o gênero *Alternaria*, as regiões gênicas mais comumente utilizadas são a Alt a 1, gene que codifica para a principal proteína alergênica do gênero, e a GPD cuja sequência codifica para uma enzima essencial na via da glicólise e da gliconeogênese (BROETTO, 2010; WEITCHEL et al., 2003).

Comparações entre sequências de genes ribossômicos e codificadores de proteínas, tais como ITS, mt SSU rDNA e GPD permitiram a detecção de diferenças entre as sequências de *A. alternata* e *A. brassicicola* (PRYOR; BIGELOW, 2003). Cramer e Lawrence (2003) conseguiram identificar divergência de sequências ao comparar regiões genômicas homólogas àquelas que codificam para a proteína alergênica Alt a 1 de *A. alternata* (Figura 2) e *A. brassicicola*. Estes autores verificaram que este homólogo é diferencialmente expresso na patogênese de *A. brassicicola* S. em *Arabidopsis thaliana* L. sugerindo um possível papel biológico no processo de infecção. Em pesquisas com sequenciamento da região Alt a 1 foi possível a distinção de subpopulações dentro da espécie *A. solani* associados a batateira e ao tomateiro indicando uma provável diversidade genética entre estas subpopulações (LOURENÇO JR. et al., 2009). Rodrigues et al. (2010) avaliando sequências das regiões genômicas Alt a 1 e GPD conseguiram diferenciar *A. tomatophila* e *A. grandis*, como agentes causais da pinta preta em tomateiro e batateira, respectivamente, utilizando a análise de parcimônia e neighbor-joining. Outros pesquisadores trabalhando com análises multilocus das regiões ITS, GPD e Alt a 1 conseguiram distinguir as espécies *A. dauci* K., *A. porri* E., *A. solani* P., e *A. tomatophila* S. (BRUN et al., 2013).

Recentemente têm sido realizadas pesquisas com uma nova região gênica denominada de Calmodulina, sendo esta codificadora de proteínas que funcionam como sensores celulares de cálcio, a qual tem se mostrado promissora na distinção de espécies de *Alternaria*. Grupos de espécies do gênero foram diferenciados por Lawrence et al. (2013) por meio de análises dessa com altos valores de suporte. Já Gannibal et al. (2014), trabalhando com sequências de DNA das regiões Alt a 1, GPD, e Calmodulina juntamente com características morfológicas e associação patógeno-hospedeiro, distinguiram dois grupos de isolados denominados *A. solani* e *A. tomatophila*. Em outras pesquisas foram detectadas 63 espécies de *Alternaria* dentro da

seção *Porri*, sendo que 10 destas foram recém descritas e 27 foram sinonimizadas mediante análise filogenética concatenada das sequências dos genes ITS, GPD, RPB2 (RNA Polymerase second largest subunit), TEF-1 $\alpha$  e Alt a 1 e também por meio de estudos de morfologia e características culturais. As espécies *A. tomatophila*, *A. subcylindrica* e *A. cretica*, agentes causais da pinta-preta em tomateiro, agruparam-se em um mesmo clado sendo sinonimizadas como *A. linariae*. *A. protenta* foi descrita como agente etiológico da pinta-preta em batateira juntamente com *A. solani* e *A. grandis* (WOUDENBERG et al., 2014).

#### **2.1.4. Gama de hospedeiras e resistência a fungicidas**

Outras características do gênero *Alternaria*, como por exemplos a gama de hospedeiras e a resistência a determinados fungicidas, podem ser relacionadas à distinção de espécies dentro do gênero, fornecendo informações importantes sobre a biologia do fitopatógeno, as quais poderão subsidiar a adoção de medidas de controle diversas.

Pesquisas têm mostrado que a variabilidade em patógenos pode resultar no estabelecimento de populações específicas a determinados hospedeiros (McDONALD; LINDE 2002). *Alternaria alternata* f. sp. *citri* possui duas diferentes formas que apresentam especificidade por planta hospedeira: o “patótipo limão rugoso”, que é específico para o limão rugoso (*Citrus jambhiri* L.) e limão 'Cravo' (*C. limonia* O.), sendo capaz de provocar lesões em folhas destas duas espécies, e o “patótipo tangerina”, que causa a mancha marrom em tangerineiras e em seus híbridos (tangores e tangelos) (LOPES; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2009; MASUNAKA et al., 2005). Batista et al. (2009) estudando a ação de isolados de *A. cucumerina*, obtidos de melancia (*Citrullus lanatus* Thunb) e de caxixe (*Lagenaria* sp), sobre diferentes hospedeiros, incluindo cucurbitáceas, solanáceas, gramíneas e leguminosas observaram incidência da doença apenas em cucurbitáceas indicando a ocorrência de especificidade por hospedeiros para este último grupo. Contudo, outras pesquisas demonstraram a especificidade parcial de isolados de *Alternaria* obtidos de batateira e tomateiro, sendo que os isolados das espécies que afetam tomateiro foram capazes de causar infecção em batateira e os isolados de *A. grandis*, que afetam batateira, causaram doença em tomateiro (RODRIGUES, 2009). Em estudos de patogenicidade sob condições de laboratório Gannibal et al. (2014) verificaram que a espécie *A. solani* foi igualmente agressiva



tanto à batateira quanto ao tomateiro enquanto que *A. tomatophila* mostrou-se altamente agressiva ao tomateiro apresentando, contudo, baixa agressividade à batateira.

Em relação à resistência a fungicidas tem se verificado que diferentes espécies de *Alternaria* podem apresentar sensibilidade diversa a diferentes produtos ou ainda há a possibilidade de isolados distintos mostrarem vários graus de sensibilidade a um mesmo fungicida. Shibata (2008) avaliando a resistência de isolados de *A. dauci* ao fungicida iprodione observou diminuição no crescimento micelial e inibição da germinação conidial em condições laboratoriais. Já isolados de *A. alternata* se mostraram sensíveis ao fungicida azoxistrobin havendo redução do crescimento micelial do fungo, enquanto que *A. solani* apresentou sensibilidade intermediária ao mesmo produto (LÉLIS et al., 2007; TOFOLI et al., 2003). Rosenzweig et al. (2007) trabalhando com isolados de *A. solani* coletados em campos de cultivo de batata tratados com azoxistrobin nos anos de 1998, 2002 e 2003 verificou a ocorrência de uma redução de 20 vezes na sensibilidade dos isolados a este fungicida em testes *in vitro* entre estes três anos detectadas mediante baixos valores de CE<sub>50</sub>. Segundo este autor esta diminuição na sensibilidade dos isolados ao produto estaria relacionada a ocorrência de mutações.

Os estudos voltados à caracterização molecular, morfológica e biológica de *Alternaria* de hortaliças solanáceas tem mostrado resultados interessantes no que diz respeito à variabilidade genética e a identificação de novas espécies associadas a culturas importantes economicamente tais como a batateira e o tomateiro. Estes resultados adquirem relevância pelo fato de implicarem diretamente na adoção de medidas de controle da pinta-preta em condições de cultivo. Desta forma a pesquisa teve como objetivos inicialmente realizar a caracterização molecular e morfológica de isolados de *Alternaria* obtidos de hortaliças solanáceas cultiváveis e invasoras presentes em campos de cultivo, e posteriormente, avaliar a gama de hospedeiras sob condições de casa de vegetação e a sensibilidade ao fungicida Folicur® (princípio ativo tebuconazole) mediante ensaios *in vitro* dos isolados previamente selecionados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. Flórida: Academic Press, 2005. 922 p.

AGROLINK. **O portal do conteúdo Agropecuário**. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004. 400 p.

ANEFALOS, L. C. et al. Sazonalidade da oferta de produtos hortícolas: o mercado de berinjela. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008. **Anais eletrônicos...** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2008. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/817.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2011.

ANTONINI, A. C. C. et al. Capacidade produtiva de cultivares de berinjela. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p.646-648, 2002.

BARBOSA, J. C. et al. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p. 440-443, 2009.

BAKHSHI, M. et al. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. **Persoonia**, v. 34, p. 65-86, 2015.

BATISTA, P. F. et al. Hospedeiros alternativos de *Alternaria cucumerina*. **Revista Verde**, v.4, n.4, p. 162-167, 2009.

BEDENDO, I. P. Manchas foliares. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. Princípios e Conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 459-466.

BOGALE, M. et al. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. **Fungal Diversity**, p. 51-66, 2006.

BOIEIRO, M. **Tabaco**. Portugal, 2008. Disponível em: <<http://www.institutohipocrates.pt/index.php/medicinas-nao-convencionais/fitoterapia/192-tabaco.html>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

BROETTO, L. **Caracterização funcional da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase na superfície celular do entomopatógeno *Metarhizium anisopliae***. 2010. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BRUN, S. et al. Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives. **Fungal Biology**, v.117, p. 32 -40, 2013.

BURGESS, T.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Variation in *Pisolithus* and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research**, v. 99, p. 1-13, 1995.

CAMARGO FILHO, W. P. C.; CAMARGO, F. P. Produção de batata no Brasil, 1990-2007: evolução, distribuição regional e safras. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 1024-1026, 2008. Suplemento.

CENSO AGROPECUÁRIO. **Brasil, grandes regiões e unidades da Federação**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil\\_2006/Brasil\\_censoagro2006.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf)>. Acesso em: 29 nov. 2014.

CRAMER, R. A.; LAWRENCE, C. B. Cloning of a Gene Encoding an Alt a 1 Isoallergen Differentially Expressed by the Necrotrophic Fungus *Alternaria brassicicola* during *Arabidopsis* Infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2361-2364, 2003.

DADOS DE PRODUÇÃO AGRÍCOLA MERCOSUL. Ministério das Relações Exteriores/Departamento de Promoção Comercial e Investimentos/Divisão de Inteligência Comercial, 2012. Disponível em: <<http://www.brasilglobalnet.gov.br>>. Acesso em: 29 jan 2014.

DOGANLAR, S. et al. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. **Genetics**, Austin, v. 161, p. 1697-1711, 2002.

EMATER DF- Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. Informações Agropecuárias do Distrito Federal – 2011. Disponível em: <<file:///C:/Users/Cliente/Downloads/produo%20agropecuarias%20-%202011.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DA AGRICULTURA FAMILIAR NAS CADEIAS PRODUTIVAS DO SUÍNO E DO TOMATE. Curitiba: Projeto de Cooperação Técnica BRA/IICA/03/005, 2009. Disponível em: <[http://www.deser.org.br/pub\\_read.asp?id=147](http://www.deser.org.br/pub_read.asp?id=147)>. Acesso em: 24 jan. 2014.

FAEP. Pimentão. Disponível em:

<<http://www.faepe.com.br/comissoes/frutas/cartilhas/hortalicas/pimentao.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

FERREIRA, P. B. et al. O mercado de batatas congeladas no Brasil. Estudo de caso: batatas Maccain. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA. 46., 2008, Recife. **Anais eletrônicos...** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/349.pdf>>. Acesso em : 12 set. 2011.

FIGUEIREDO, A. **Programa de diversificação de lavouras de tabaco nas encostas da serra geral, atividades e potencialidades**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias, 2008. Disponível em: <[www.tcc.cca.ufsc.br/agronomia/ragr052.pdf](http://www.tcc.cca.ufsc.br/agronomia/ragr052.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2015.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças**. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.

FRIES, E. M. **Systema mycologicum**. Lundae, 1832. v. 3, 210 p.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia - Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 3, n. 14, p. 12-16, 2000.

GANNIBAL, P.B. et al. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. **Eur J Plant Pathol**, v. 139, p.609–623, 2014.

GRIFFIN, W. J.; LIN, G. D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, New York, v. 53, n. 6, p. 623-637, 2000.

HEEMANN, F. **O cultivo do fumo e condições de saúde e segurança dos trabalhadores rurais**. 2009, 170 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

HONG, S. G. et al. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis

of phylogenetic content and secondary structure. **Fungal Genetics and Biology**, v.42 p.119-129, 2005

HUNZIKER, A. T. **Genera Solanacearum: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system**. Lichtenstein: A.R.G. Gantner Verlag, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático de Produção Agrícola**. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em:  
<[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201309.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201309.pdf)>. Acesso em:9 mar. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal. Culturas temporárias e permanentes**. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. Disponível em:  
<[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2012\\_v39\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2012_v39_br.pdf)>. Acesso em:9 mar. 2015.

JEEWON, R. et al. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**, v. 57 , p. 562–572, 2008.

JUDD, W. S; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A; STEVENS, P.F. **Plant Systematics: A phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999.

KEISSLER K. **Zur kenntnis der pilzflora krains**. Beihefte zum Botanischen Zentralblatt, v.29: p. 395–440, 1912.

LAWRENCE, D. P. et al. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. **Mycologia**, v.105, n. 3, p. 530–546, 2013.

LELIS, M. M.; LOURENCO JR, V.; AQUINO, L. A.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Sensibilidade de isolados brasileiros de *Alternaria solani* aos fungicidas clorotalonil, mancozeb e azoxystrobin. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 2006, Goiânia. **Anais...** 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, v. 24. 2007. CD ROM.

LIMA, V. G. de. et al. **Produção de mudas de pimentão em substratos combinando areia, solo e Plantmax**. Ciência e Consciência, v. 1, 2007. Disponível em:  
<<http://revista.ulbrajp.edu.br/seer/inicia/ojs/viewarticle.php?id=875>>. Acesso em: 5 fev. 2013.

LOPES, E. B.; ALBUQUERQUE, I. C.; ARAÚJO, E. Mancha-marrom-de-alternaria: uma grave doença nos pomares de tangerina da Paraíba. **Tecnologia. & Ciência. Agropecuária**, v.3, n.3, p.23-27, 2009.

LOURENÇO JR., V. et al. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. **Phytopathology**, v. 99, n. 6, p.765-774, 2009.

MALDONADO, V. **O cultivo do pimentão**. Revista Cultivar, 5 ed. Pelotas, 2001  
Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=100>>  
Acesso em: 6 fev. 2013.

MANAMGODA, D. S. et al. The genus *Bipolaris*. **Studies in Mycology**, v. 79, p.221-288, 2014.

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS-TOMATE. Disqual. Otimização da qualidade e redução dos custos na cadeia de distribuição de produtos hortofrutícolas frescos. Disponível em: <<http://opac.iefp.pt:8080/images/winlibimg.exe?key=&doc=11404&img=44>>  
Acesso em 4 de fevereiro de 2013.

MASUNAKA, A. et al. An isolate of *Alternaria alternata* that is pathogenic to both tangerines and rough lemon and produces two host-selective Toxins, ACT- and ACR-Toxins. **Phytopathology**, v.95, n.3, p. 241-247, 2005.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v. 124, n. 2, p. 163-180, 2002.

MELO, P. C. T. **Panorama atual da cadeia de produção de hortaliças no Brasil**. Associação Brasileira de Horticultura, 2006. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/Default.asp?id=4925>>  
Acesso em: 1 fev. 2013.

MELO, P. C. T. **Situação da Olericultura no Brasil**. Disponível em: <[http://www.cnph.embrapa.br/seminarios\\_hortalicas/Situacao\\_da\\_olericultura.pdf](http://www.cnph.embrapa.br/seminarios_hortalicas/Situacao_da_olericultura.pdf)>. Acesso: 10 nov 2014.

NAKANO, D. H.; DELEO, J. P. B.; BOTEON, M. Choque de competitividade. **Hortifruti Brasil**, n. 51, p. 6-17, 2006.

NEES VON ESENBECK C.G. (Ed.). **Das system der pilze und schwämme**. Wurzburg: University of Illinois Urbana-Champaign, 1816. v. 1, 480 p.

NIÑO, J.; CORREA, Y. M.; MOSQUERA, O. M. Biological activities of steroidal alkaloids isolated from *Solanum leucocarpum*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 47, n. 3, p. 255-259, 2009.

PAULA, R. S.; OLIVEIRA W. F. Resistência de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) ao patógeno *Alternaria solani*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 2, n. 33, p. 89-95, 2003.

PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. **Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto**. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças, 2013. 5 p. (Comunicado Técnico, 95).

PERES, A. P, et al. Variabilidade morfo-cultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 27, n. 5, p.1053-1062, 2003.

PRYOR, B. M.; BIGELOW, D. M. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. **Mycologia**, v. 95, n. 6, p. 1141–1154, 2003.

RIBEIRO, C. S. C. et al. **Berinjela (*Solanum melongena* L.)**. Sistemas de Produção, 3; ISSN 1678-880x, 2007. Distrito Federal: Embrapa Hortaliças, 2007. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Beringela/Beringela\\_Solanum\\_melongena\\_L/](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Beringela/Beringela_Solanum_melongena_L/)> Acesso em: 5 fev. 2014.

REIS, A.; BRUNE, S.; MIZUBUTI, E. S. G. **Pinta preta da batata**. Batata Show, n. 4, 2002. Disponível em: < [http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista04\\_022.htm](http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista04_022.htm)>. Acesso em: 2 dez. 2014.

RODRIGUES, T. T. M. S. **Morphological, molecular characterization, and inference about recombination, for species of *Alternaria* related to early blight of potato and tomato**. 2009, Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

RODRIGUES, T.; MIZUBUTI, E. S. G. Pinta-preta: surge uma nova espécie. **Batata Show**, Associação Brasileira da Batata, n. 24, p. 14-16, ago. 2009.

RODRIGUES, T.T.M.S. et al. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. **New Disease Reports**, 22, p.28, 2010.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria* biology, epidemiology, and pathogenicity**. Saint Paul: APS Press, 1994. 326p.

ROSENZWEIG, N. et al. Monitoring and tracking changes in sensitivity to azoxystrobin fungicide in *Alternaria solani* in Wisconsin. **Plant Disease**, v. 92, p. 555-560, 2008.

SCHWARTZMANN, M. Potato: a world production, a European business. **PPO-Special Report**, Arras, n. 14, p. 11-16, 2010.

SHIBATA, E.T. **Reação de cultivares de cenoura à queima das folhas, prevalência de patógenos, diversidade genética e sensibilidade de *Alternaria dauci* a fungicidas**. 2008, 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SHAN, F.Y. et al. Parasitic fitness and RAPD analysis of *Curvularia* species on corn. **Journal of Agricultural University of Hebei**, v.31, n.1, p. 37-41, 2008.

SILVA-BARRETO, F.A.S. et al. Associação de *Rhizoctonia solani* Grupo de Anastomose 4 (AG-4 HGI e HGIII) à espécies de plantas invasoras de área de cultivo de batata. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.145-154, 2010.

SILVA, C. F. B. **Características culturais e agressividade de isolados de *Alternaria solani* em batateira e tomateiro**. 2006, 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* themes and variation (244-286). Species on Solanaceae. **Mycotaxon**, v. 75, p. 55-163, 2000.

SIMMONS, E. G. ***Alternaria: An Identification Manual***. Utrecht, Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007.

SOARES, E.L.C.et. al. Família Solanaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 177-188, 2008.

SOARES NETO, H. J. B.; BUENO, J. L. C.; SANTOS, L. C. Consorciamento de cultura entre a berinjela e o pepino nos diferentes tipos de adubação. In: SEMINÁRIO DE



INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA, 14. 2010, Feira de Santana. **Anais...** 2010. p. 654-656.

STEHMANN, J.R. et al. *Solanaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB225>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

TOFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; KUROZAWA, C. Ação “*in vitro*” de fungicidas no crescimento micelial e germinação de conídios de *Alternaria solani*, agente causal da pinta preta do tomateiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p. 337-345, 2003.

TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. **Alternarioses em hortaliças: sintomatologia, etiologia e manejo integrado**. São Paulo: Instituto Biológico, 2004. p. 23-33. (Divulgação Técnica, 66).

TOFOLI, J.G. et al. Doenças fúngicas da cultura da batata: sintomas, etiologia e manejo. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.63-73, 2012.

WANG, Y. Molecular and morphological description of two new species of *Stemphylium* from China and France. **Mycologia**, v. 102, n. 3, p. 708–717, 2010.

WEICHEL, M. Nuclear transport factor 2 represents a novel cross-reactive fungal allergen. **Allergy**, v. 58, p. 198–206, 2003.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, New York, v. 64, n.1, p. 3-19, 2003.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. v. 1, 879 p.

WOUDENBERG, J. H. C. et al. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 1-47, 2014.

## **CAPÍTULO II**

---

**Caracterização morfológica e diversidade molecular dos agentes etiológicos da pinta-preta em solanáceas no Brasil.**

1 **Caracterização morfológica e diversidade molecular dos agentes etiológicos da**  
2 **pinta-preta em solanáceas no Brasil**

3  
4 **Celma C Peixoto<sup>1</sup>; Leonardo S Boiteux<sup>2</sup>; Maria Esther N Fonseca<sup>2</sup>; Ailton Reis<sup>2</sup>**

5 <sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Área de Fitossanidade, Dpt<sup>o</sup> Agronomia,  
6 CEP 52171-900, Recife-PE; <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, CP 218, 70351-970 - Brasília-DF;  
7 celmapeixoto22@gmail.com;leonardo.boiteux@embrapa.br;maria.boiteux@embrapa.br  
8 ailton.reis@embrapa.br.

9  
10 **Resumo**

11  
12 Extensivos levantamentos conduzidos recentemente no Brasil têm mostrado que os  
13 preponderantes agentes causais da doença pinta-preta do tomateiro (*Solanum*  
14 *lycopersicum* L.) e da batata (*S. tuberosum* L.) são as espécies *Alternaria tomatophila* e  
15 *A. grandis*, respectivamente. Entretanto, a literatura registra a existência de outras  
16 espécies de *Alternaria* induzindo sintomas similares aos da pinta-preta em plantas de  
17 outros gêneros e espécies da família Solanaceae. Foram estudados 117 isolados,  
18 coletados em uma ampla gama de plantas hospedeiras solanáceas em distintas regiões  
19 geográficas do Brasil. A caracterização molecular foi feita via sequenciamento de  
20 homólogos do gene codificador da proteína alergênica de *A. alternata* (Alt a 1),  
21 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) e calmodulina. Para a caracterização  
22 morfológica realizou-se o cultivo nos meios V8 (pH 6,4) e PCA. Verificou-se  
23 agrupamento de isolados de tomateiro com *A. tomatophila* e isolados de batateira com e  
24 *A. grandis* tanto para a filogenia das regiões Alt a1, GPD e Calmodulina separadamente  
25 quanto para a análise concatenada. As características morfológicas da maioria dos  
26 isolados concordaram com a caracterização molecular. Foram identificados isolados das  
27 espécies *A. dauci* e *A. mimicula* causando pinta-preta em tomateiro, sendo este o  
28 primeiro registro formal no Brasil. No entanto, *A. tomatophila* e *A. grandis* ainda  
29 permanecem como os principais agentes causais da pinta-preta em tomateiro e batateira  
30 no Brasil, respectivamente.

31  
32 **Palavras chave:** *Alternaria*, batata, tomate, *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum*.

33 **Molecular and morphological characterization of the causal agent of early blight in**  
34 **solanaceous in Brazil.**

35

36

**Abstract**

37

38 Extensive surveys have shown that currently *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* are  
39 the major causal agents of early blight on tomato and potato in Brazil, respectively.  
40 However, the early blight disease has been also reported in a number of other genera  
41 and species of the Solanaceae family. In this work, a collection of 117 isolates of  
42 *Alternaria* from a wide range of solanaceous hosts and geographic locations was  
43 characterized via sequencing analyses of homologs of the *A. alternata* allergen protein-  
44 coding gene (Alt a 1), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) and  
45 Calmodulin. Morphological characterization of this fungal collection was also carried  
46 out by growing the isolates in either V8 (pH 6.4) or PCA. The tomato isolates clustered  
47 together with *A. tomatophila* isolates and the potato isolates formed a distinct group  
48 with *A. grandis* in both individual and concatenated phylogenetic analyses.  
49 Morphological characteristics of most isolates were in agreement with molecular data.  
50 *Alternaria dauci* and *A. mimicula* were identified causing early blight on tomato and  
51 this is the first report of the vegetable crop as host of these fungal species in Brazil.  
52 However, *A. tomatophila* and *A. grandis* still prevail as major causal agents of early  
53 blight on tomato and potato in Brazil, respectively.

54

55 **Keywords:** *Alternaria*, potato, tomato, *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum*.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

## 65 **Introdução**

66

67 As solanáceas se destacam dentro do grupo das hortaliças pelo fato de incluir  
68 espécies de alta importância econômica. O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e a  
69 batateira (*S. tuberosum* L.) constituem-se exemplos de espécies cujos produtos são  
70 amplamente valorizados tanto no mercado interno quanto no mercado externo. Assim  
71 como outras hortaliças, as solanáceas também são afetadas por diversos problemas  
72 fitossanitários destacando-se a pinta-preta também denominada de alternariose ou  
73 mancha de alternaria (Lopes *et al.*, 2005). A suscetibilidade da planta à infecção  
74 aumenta à medida que os tecidos alcançam a maturidade sendo que a doença pode afetar  
75 folhas, ramos, frutos e tubérculos, o que resulta em prejuízos consideráveis aos  
76 produtores rurais destas hortaliças (Tofoli & Domingues, 2006).

77 As espécies do gênero *Alternaria* são classificadas dentro dos deuteromicetos,  
78 um grupo que abrange os fungos mitospóricos ou imperfeitos que se caracterizam pela  
79 produção de estruturas denominadas de conídios (Kemmitt, 2002). *Alternaria* é um  
80 gênero composto por fungos cosmopolitas com ampla adaptabilidade a distintos  
81 ambientes, o que explica a ocorrência desses fungos como saprófitas e patógenos  
82 vegetais em diferentes regiões geográficas (Rotem, 1994).

83 A pinta-preta é uma importante doença foliar podendo levar a perdas de  
84 produção e qualidade nos cultivos de tomate e batata em campo aberto no Brasil (Lopes  
85 *et al.*, 2005). A doença é favorecida por temperatura e umidade altas, sendo, portanto,  
86 mais severa durante o verão chuvoso. O fungo se espalha através de esporos conduzidos  
87 pelo vento e pode ser transmitido pela semente botânica. No Brasil, o agente causal da  
88 pinta-preta nos cultivos de tomate e batata bem como em outras solanáceas foi  
89 inicialmente descrito como *A. solani* (Lopes *et al.*, 2005; Rodrigues & Mizubuti, 2009).  
90 No entanto, em estudos subsequentes realizados nos Estados Unidos a espécie *A.*  
91 *tomatophila* foi proposta como uma nova espécie, sendo essa o agente causal da pinta-  
92 preta no tomateiro. Para a batateira o causador da pinta-preta foi identificado como  
93 sendo a espécie *A. grandis* (Simmons, 2007). Neste novo cenário, *A. solani* foi  
94 caracterizada como sendo a única espécie do gênero capaz de provocar a doença tanto  
95 no cultivo da batata quanto do tomate.

96 Outras espécies de *Alternaria* têm sido reportadas causando sintomas similares  
97 aos da pinta-preta em solanáceas incluindo: *A. alternata* em batateira (Boiteux &  
98 Reifschneider, 1994), *A. cretica*, *A. elegans*, *A. mimicula*, *A. subcylindrica*, *A.*  
99 *tomaticola* e *A. tomato* em tomateiro; *A. beringelae* em berinjela (*S. melongena*) e *A.*  
100 *capsici* em pimentão (*Capsicum annuum*). Estas espécies foram inicialmente  
101 identificadas mediante avaliação de características morfológicas dos conídios  
102 (Simmons, 2000, 2007).

103 No entanto, a análise de sequências de DNA tem sido largamente utilizada na  
104 identificação de fungos no nível de espécie sendo que pequenas diferenças nas  
105 sequências de nucleotídeos muitas vezes são suficientes para distingui-las dentro do  
106 mesmo gênero. Pesquisas voltadas a análise filogenética de sequências de DNA de  
107 determinadas regiões gênicas de fungos fitopatogênicos tem sido desenvolvidas e novas  
108 espécies estão sendo descritas (Manamgoda *et al.*, 2014; Woudenberg *et al.*, 2014;  
109 Bakhshi *et al.*, 2015). Para análises taxonômicas de fungos do gênero *Alternaria* em  
110 nível de espécie inicialmente empregou-se a região ITS (Pryor & Gilbertson, 2000). Os  
111 trabalhos de filogenia molecular de espécies de *Alternaria* vêm sendo ampliados, tendo  
112 homólogos do gene codificador da proteína alergênica de *A. alternata* (Alt a 1) e o gene  
113 codificador da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) como as regiões genômicas  
114 mais utilizadas para o estabelecimento das relações filogenéticas entre as espécies  
115 (Pryor & Gilbertson, 2000; Chou & Wu, 2002; Hong *et al.*, 2005; Lourenço-Júnior *et*  
116 *al.*, 2009). O gene Alt a1 codifica para proteínas específicas que induzem respostas  
117 alérgicas em humanos tais como a enolase, fator de transporte nuclear, aldeído  
118 desidrogenase e proteínas ribossomais (Achatz *et al.*, 1995; Simmon-Nobbe., 2000;  
119 Weitchel *et al.*, 2003). Já a região GPD codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato  
120 desidrogenase a qual desempenha papel essencial na via da glicólise e da  
121 gliconeogênese atuando desta forma no metabolismo do fungo (Hara & Snyder, 2006).  
122 Outra região gênica que tem sido recentemente utilizada para a distinção de espécies de  
123 *Alternaria* é a Calmodulina, que codifica uma família de proteínas capazes de se  
124 complexarem ao cálcio com diferentes afinidades e especificidades regulando a  
125 concentração deste elemento no interior da célula (Silva *et al.*, 2009).

126 A caracterização molecular e morfológica para a identificação de espécies de  
127 fungos fitopatogênicos têm sido conduzidas no Brasil com resultados bastante

128 promissores. Em relação especificamente à identificação de espécies de *Alternaria* de  
129 solanáceas verifica-se ainda a necessidade de estudos mais extensivos empregando uma  
130 ampla gama de isolados de diferentes espécies de solanáceas (Lourenço-Júnior *et al.*,  
131 2009).

132 O presente trabalho foi realizado com o propósito de trazer novas informações  
133 acerca da identidade de espécies de *Alternaria* de hortaliças e o papel desses patógenos  
134 como potenciais fontes de inóculo para culturas economicamente importantes. Neste  
135 contexto, o principal objetivo do presente trabalho foi caracterizar (molecularmente e  
136 morfológicamente) isolados de *Alternaria* obtidos de lesões foliares do tipo pinta-preta  
137 em tomateiro, batateira, berinjela, pimentão e fumo bem como em solanáceas invasoras  
138 silvestres que estão comumente associadas com áreas de cultivo nas diferentes regiões  
139 produtoras do Brasil.

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160 **Material e Métodos**

161

162 **1. Coleção dos isolados**

163

164 Cento e dezessete (117) isolados de *Alternaria* de hortaliças solanáceas obtidos  
165 em diferentes regiões do Brasil foram coletados em 5 gêneros e 12 espécies de  
166 solanáceas ao longo de 30 anos (Tabela 1). Esses isolados têm sido mantidos no Banco  
167 de Fungos e Oomicetos da Embrapa Hortaliças. Os isolados foram obtidos a partir de  
168 culturas monospóricas e têm sido preservados em água destilada (Castellani, 1939).

169

170 **2. Caracterização molecular**

171

172 **2.1. Extração de DNA**

173

174 Para a obtenção do micélio fúngico usado na extração de DNA realizou-se  
175 inicialmente a recuperação dos isolados mediante repicagem de discos de micélio para  
176 placas de Petri contendo meio de cultura V8 10% (100 mL de Suco V8 – Campbell®), as  
177 quais foram mantidas em câmara de crescimento (tipo BOD) sob temperatura de 25°C,  
178 fotoperíodo de 12 horas de luz negra e 12 horas de ausência de luz por 7 dias. Após este  
179 período, o micélio foi retirado da placa com o auxílio de um bisturi, em câmara de fluxo  
180 laminar, sendo acondicionado em tubos para Precellys e armazenado em freezer.

181 No momento da extração de DNA os tubos contendo o micélio fúngico foram  
182 retirados do freezer e adicionaram-se seis *beads* (esferas de cerâmica) em cada um. Em  
183 capela de exaustão pipetou-se 750 µL de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) por  
184 tubo seguido de trituração no aparelho Precellys (Bertin Technologies). Posteriormente  
185 os tubos foram colocados em banho-maria a 65°C por 10 minutos. Após resfriamento  
186 por 3 minutos acrescentou-se 750 µL de Clorofil (clorofórmio + álcool isoamílico, na  
187 proporção 24:1) aos mesmos em capela de exaustão, procedendo-se agitação vigorosa  
188 em vórtex e centrifugação a 9.000 rpm por 5 minutos. Depois da centrifugação retirou-se  
189 600 µL da fase superior, a qual foi transferida para tubos de 1,5 mL, adicionando-se  
190 em seguida 300 µL de isopropanol gelado. O material foi agitado manualmente e  
191 submetido à nova centrifugação por 13 minutos a 12.000 rpm, eliminou-se o



192 sobrenadante e realizou-se rapidamente e cuidadosamente a lavagem do pellet com  
193 álcool 70%. Os tubos abertos foram submetidos à secagem em BOD a 37 °C por 20  
194 minutos. Após este procedimento acrescentou-se 100 µL de TE (Tris 0,01M; EDTA  
195 0,001M; pH 7,0) e os mesmos foram armazenados em freezer (Boiteux *et al.*, 1999). No  
196 dia seguinte realizou-se a quantificação do DNA extraído em espectrofotômetro  
197 NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) e as concentrações foram  
198 ajustadas para 20 ng/µL mediante diluição em TE.

199

## 200 **2.2. Reações de PCR**

201

202 Foram realizadas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em  
203 termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems) utilizando os primers específicos para  
204 três regiões genômicas: gene codificador da proteína alergênica de *A. alternata* (Alt a  
205 1), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) e Calmodulina (Tabela 2).

206 As reações de amplificação foram realizadas com oligonucleotídeos da IDT  
207 (Integrated DNA Technologies) e os demais reagentes da Invitrogen Life Technologies  
208 diluídos em água Milli-Q. A reação final foi de 20 µL contendo tampão da enzima 1X,  
209 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µM de cada dNTP, 0,2 unidades de *Taq* DNA polimerase  
210 recombinante, 20 nM de cada oligonucleotídeo e 60 ng de DNA genômico purificado. O  
211 ciclo da PCR constituiu-se de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos mais 35 ciclos  
212 de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 64°C por 1  
213 minuto, e extensão a 72°C por 13 segundos) com extensão final a 72°C por 10 minutos.

214 O mix para a reação de amplificação da região GPD foi similar ao descrito  
215 acima. O ciclo de PCR para amplificar a região GPD foi composto de desnaturação  
216 inicial a 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C  
217 por 30 segundos, anelamento a 63°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 20 segundos)  
218 com extensão final a 72°C por 3 minutos.

219 O mix para a reação de amplificação da região Calmodulina teve as  
220 concentrações descritas acima com volume final 25 µL. O ciclo foi constituído de  
221 desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos mais 35 ciclos de amplificação (desnaturação  
222 a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58,5°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por  
223 13 segundos) com extensão final a 72°C por 5 minutos.

224 Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1,5%  
225 (p/v), corados com brometo de etídeo e visualizados em fotodocumentador (Bio-Rad).  
226 Posteriormente realizou-se a purificação dos produtos utilizando o PureLink PCR  
227 Purification Kit Invitrogen K3100-02.

228

### 229 **2.3. Sequenciamento e análise das sequências**

230

231 Os amplicons purificados foram sequenciados com cada um dos iniciadores  
232 utilizados na PCR. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador ABI Prism  
233 (modelo 3100) da Embrapa Hortaliças, utilizando o kit ABI Prism BigDye version 3.0  
234 chemistry da Applied Biosystems. A avaliação da qualidade das sequências foi feita  
235 com o programa SeqMan e o alinhamento com sequências disponíveis no GenBank foi  
236 realizado com o programa Megalign DNASTar (Lasergene, Madison-WI).

237

### 238 **2.4. Análises filogenéticas**

239

240 A obtenção dos contigs, análise dos cromatogramas e edição das sequências  
241 foram realizados no programa SeqMan (DNASTar, Madison, WI, USA). Para o  
242 alinhamento das sequências e análise Bayesiana das regiões Alt a 1, GPD e  
243 Calmodulina utilizou-se o programa Genious Versão 8 (<http://www.geneious.com>). As  
244 análises de parcimônia e verossimilhança foram realizadas no programa PAUP  
245 (Swofford, David L. 2001 “Paup\*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other  
246 methods) 4.0. B5.”). As análises foram realizadas separadamente e concatenadas  
247 utilizando-se os critérios de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Análise  
248 Bayesiana. As sequências obtidas com os isolados de *Alternaria* empregados neste  
249 estudo foram alinhadas e analisadas juntamente com sequências disponíveis GenBank  
250 (Tabela 3).

251

## 252 **3. Caracterização morfológica**

253

254 Para a caracterização morfológica dos isolados foram utilizados os meios PCA  
255 (*Potato Carrot Agar*) e V8 17,5% com pH ajustado para 6,4. Os isolados foram

256 repicados para placas de Petri com meio de cultura, seguido de uma etapa de incubação  
257 em BOD sob 22°C e fotoperíodo de 8 horas de luz branca e 16 horas de escuro por 5 a 7  
258 dias. As placas foram mantidas sem filme plástico (Simmons, 2007). Os conídios  
259 produzidos pelo fungo foram utilizados na confecção das preparações microscópicas.  
260 Após a obtenção destas preparações realizou-se a mensuração do comprimento e largura  
261 do corpo, comprimento do rostro dos conídios. Foi também efetuada a quantificação do  
262 número de septos transversais, longitudinais e número de rostros (50 conídios por  
263 isolado) em microscópio óptico (objetiva com aumento de 40×).

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

## 288 **Resultados e Discussão**

289

### 290 **Caracterização molecular**

291

292 A Figura 1 mostra o resultado da análise filogenética baseada em inferência  
293 Bayesiana, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança da região Alt a 1 dos 117  
294 isolados de *Alternaria* empregados no presente estudo (Tabela 1) após a obtenção dos  
295 haplótipos. Dentre os 474 pares de base obtidos 76 foram informativos a nível de  
296 parcimônia. *Alternaria calendulae* foi utilizada como grupo externo. Verificou-se a  
297 formação de dois grupos principais, sendo que os isolados agruparam-se em sua maioria  
298 de acordo com o hospedeiro de origem e não de acordo com o local de coleta. Um grupo  
299 incluiu 34 isolados oriundos de batateira mais os isolados de referência *A. solani*  
300 BMP181 de tomateiro dos Estados Unidos, *A. grandis* EGS44106 e *A. solani*  
301 EGS45020 ambos de batateira também dos Estados Unidos, com e *bootstraps* de 89 e  
302 73% para Máxima Verossimilhança. Já o outro agrupamento incluiu 46 isolados obtidos  
303 de tomateiro juntamente com os de referência *A. tomatophila* BA1524 oriundo da  
304 Austrália, *A. tomatophila* BA1526 da Nova Zelândia, *A. cretica* EGS46188 da Grécia,  
305 *A. tomatophila* EGS42156, *A. solani* ATCC58177 e *A. subcylindrica* EGS45113, sendo  
306 estes três últimos originários dos Estados Unidos. Todos os isolados de referência foram  
307 obtidos de tomateiro com exceção de *A. solani* ATCC58177 que tem como hospedeiro  
308 de origem a batateira. Este grupo obteve valor de 0,99 para probabilidade posterior e  
309 valores de *bootstrap* de 72% para Máxima Parcimônia e 68% para Máxima  
310 Verossimilhança. Dois isolados oriundos de *Datura* e um de tomateiro formaram um  
311 grupo com os isolados de referência *A. capisici* BMP0180 e *A. capisici* EGS45075  
312 ambos de pimentão; *A. crassa* DDGAcr1 e *A. crassa* EGS44071 originários,  
313 respectivamente, de *Datura* sp. e *Nicandra physalodes* com altos valores de suporte (1,  
314 95% e 94% para Bayesiana, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança,  
315 respectivamente). Os demais isolados não se agruparam com nenhum de referência.

316 Nesta análise filogenética apenas utilizando a região gênica Alt a 1 verificou-se  
317 que, apesar de haver uma separação dos isolados por hospedeiro, não foi possível a  
318 distinção das espécies *A. solani*, *A. tomatophila* e *A. grandis*, sendo que ocorreu  
319 agrupamento de isolados de *A. solani* tanto com *A. grandis* (*A. solani* BMP181 oriundo

320 de tomateiro dos Estados Unidos) quanto com *A. tomatophila* (*A. solani* ATCC58177 de  
321 batateira dos Estados Unidos). Contudo, *A. tomatophila* reuniu-se com grande parte dos  
322 isolados provenientes de tomateiro, enquanto que *A. grandis* permaneceu no mesmo  
323 grupo da maioria dos isolados oriundos de batateira. Desta forma, a filogenia da região  
324 gênica Alt a 1 obteve êxito restrito na distinção das espécies *A. tomatophila* e *A.*  
325 *grandis*.

326 Lourenço Júnior *et al.* (2009) trabalhando com diversidade molecular e  
327 processos evolutivos de *A. solani* no Brasil detectaram a diferenciação de cinco  
328 haplótipos, estando estes associados a 16 mutações, na genealogia do gene Alt a 1. Os  
329 haplótipos 4 e 5 foram compostos por isolados de tomate enquanto que o haplótipo 1  
330 reuniu os isolados de batata. Ainda, segundo estes autores, apesar da comprovação da  
331 existência de diversidade genética entre isolados provenientes de tomateiro e batateira, o  
332 número de mutações nos genes analisados foi relativamente baixo. Possivelmente o  
333 número de mutações existentes no gene Alt a 1 em determinadas espécies dentro do  
334 gênero *Alternaria* pode ser insuficiente para subsidiar a separação entre tais espécies por  
335 meio de análises filogenéticas da referida região gênica o que justificaria os resultados  
336 obtidos neste trabalho no qual não foi relatada a separação de *A. solani* das espécies *A.*  
337 *tomatophila* e *A. grandis*. No entanto, o gene Alt a 1 tem sido ainda comumente  
338 utilizado como marcador molecular em estudos filogenéticos de *Alternaria* pelo fato de  
339 apresentar número satisfatório de sítios informativos resultando em árvores  
340 filogenéticas com melhor resolução e suportes de *bootstrap* e probabilidade posterior  
341 elevados (Hong *et al.*, 2005).

342 Pesquisas tem revelado que espécies de *Alternaria* oriundas do mesmo  
343 hospedeiro tendem a pertencer ao mesmo grupo filogenético independente da região  
344 geográfica de origem (Brun *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2010). Relatos de  
345 agrupamentos filogenéticos de outros fitopatógenos de acordo com a planta hospedeira  
346 foram obtidos por Groenewald *et al.* (2013), Manamgoda *et al.*, (2014) e Bakhshi *et al.*,  
347 (2015), para *Cercospora* e *Bipolaris*. No entanto, esta forma de agrupamento não  
348 ocorreu para todos os isolados avaliados nos estudos realizados por estes autores. A  
349 formação de clados abrangendo espécies pertencentes à mesma planta hospedeira pode  
350 ocorrer devido à existência de sequências conservadas de DNA codificadoras de

351 determinadas proteínas que são específicas para a infecção de determinada planta  
352 hospedeira.

353 A partir desta primeira análise filogenética com todos os isolados de *Alternaria*  
354 da coleção foram selecionados 44 incluindo isolados pertencentes aos dois agupamentos  
355 principais mais aqueles distribuídos nos demais grupos levando em consideração as  
356 diferentes regiões geográficas de origem. Estes foram submetidos ao sequenciamento da  
357 região gênica GPD. A árvore filogenética concatenada dos genes Alt a 1 e GPD, tendo  
358 por base a inferência Bayesiana, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança,  
359 encontra-se representado na Figura 2 tendo *A. calendulae* como grupo externo. O  
360 alinhamento das sequências concatenadas obteve 928 pares de base sendo que 111  
361 destes foram informativos a nível de parcimônia.

362 Houve a formação grupos por hospedeiro de origem sendo que dois isolados  
363 originários de tomateiro (EH1836-SP e EH1823-CE) e um de lobeira (EH1642-BA)  
364 reuniram-se com *A. tomatophila* BA1523 e *A. tomatophila* BA1524 ambos da Austrália;  
365 *A. tomatophila* BA1443, *A. tomatophila* BA1528 e *A. subcylindrica* EGS45113 dos  
366 Estados Unidos; *A. tomatophila* BA1526 da Nova Zelândia e *A. tomatophila* BA1527  
367 da Venezuela, com 0,79 de probabilidade posterior e valor máximo de *bootstrap* para  
368 Máxima Verossimilhança, sendo que todos estes isolados de referência são provenientes  
369 de tomateiro. Estes três isolados pertenceram ao mesmo grupo na análise filogenética da  
370 região Alt a 1 (Figura 1) juntamente com isolados representativos de *A. tomatophila*, *A.*  
371 *solani*, *A. subcylindrica* e *A. cretica*. Um outro grupo incluiu 13 isolados provenientes  
372 de batateira juntamente com *A. solani* BA1946 de *Solanum aviculare* (solanácea  
373 ornamental conhecida como “Kangaroo Apple”) da Dinamarca, *A. solani* BA1546, *A.*  
374 *solani* BA1552, *A. solani* BA1937, *A. solani* BA1558 e *A. grandis* EGS44106 todos  
375 oriundos de batateira dos Estados Unidos Estes 13 isolados de batateira reuniram-se  
376 também no mesmo grupo na filogenia do gene Alt a 1 com isolados representativos de  
377 *A. solani* e *A. grandis*. Com a inclusão de novas referências formaram-se dois novos  
378 agrupamentos nos quais foi possível identificar dois isolados. O isolado EH1143  
379 oriundo de tomateiro do Rio Grande do Sul foi identificado como *A. dauci* com suporte  
380 de 1 para probabilidade posterior, 99% e 90% para os *bootstraps* da Máxima Parcimônia  
381 e Máxima Verossimilhança nessa ordem; enquanto que o isolado EH1377, também de  
382 tomateiro tendo como local de origem o Ceará, foi identificado como *A. mimicula* com

383 altos valores de suporte (0,97 para probabilidade posterior e 90% para Máxima  
384 Parcimônia). Na filogenia do gene Alt a 1 o isolado EH1143-RS formou um grupo com  
385 o EH1806-PE proveniente de berinjela, não se reunindo com nenhum daqueles  
386 utilizados como referência, com valores de probabilidade posterior e *bootstrap* para a  
387 Máxima Parcimônia de 0,86 e 83%, nesta ordem. Já o EH1377-CE não se agrupou com  
388 nenhum outro na filogenia do gene Alt a 1 formando um grupo composto apenas por ele  
389 com valores máximo de probabilidade posterior e *bootstrap* para a Máxima  
390 Verossimilhança e 99% de *bootstrap* para Máxima Parcimônia. Testes de  
391 patogenicidade revelaram que tanto o isolado EH1143-RS e quanto o EH1377-CE  
392 identificados como *A. dauci* e *A. mimicula* foram patogênicos apenas a tomateiro (dados  
393 não mostrados).

394 Em outros trabalhos de pesquisa detectou-se também a ocorrência de  
395 agrupamento por hospedeiro por meio de análise filogenética concatenada dos genes Alt  
396 a 1, GPD e ITS. Um grupo abrangeu 10 isolados de *Alternaria*, todos provenientes de  
397 tomateiro, os quais foram identificados como *A. tomatophila*, enquanto que o outro  
398 incluiu mais 10 isolados originários de cenoura (*Daucus carota*) que por sua vez foram  
399 identificados como *A. dauci* (Brun *et al.*, 2013). Na análise concatenada das regiões Alt  
400 a 1 e GPD realizada no presente estudo também ocorreu o agrupamento por hospedeiro  
401 mantendo os isolados provenientes de tomateiro e batateira separados em grupos  
402 distintos.

403 A inclusão de sequências de DNA de mais uma região gênica (GPD) nas  
404 análises filogenéticas foi satisfatória na separação das espécies *A. tomatophila* de *A.*  
405 *solani*, *A. cretica* e *A. grandis* sendo que dos 499 pares de base obtidos 51 foram  
406 informativos a nível de parcimônia. Porém esta filogenia concatenada não obteve êxito  
407 na distinção das espécies *A. tomatophila* de *A. subcylindrica*, e *A. solani* de *A. grandis*.  
408 Estudos tem justificado que esta dificuldade em separar algumas espécies  
409 provavelmente esta relacionada à baixa variabilidade de sequências que por sua vez é  
410 resultante da ocorrência de poucas mutações nas regiões gênicas submetidas ao  
411 sequenciamento e utilizadas nas análises filogenéticas (Rodrigues, 2009) (Figura 2).

412 A espécie *A. dauci* foi descrita pela primeira vez por Groves & Skolko (1944)  
413 sendo caracterizada como o agente causal da queima das folhas em cenoura (*Daucus*  
414 *carota* L). Posteriormente, Simmons (1995, 2007) caracterizaram a espécie, mediante

415 atributos morfológicos, atestando a patogenicidade da mesma a cenoura. Recentemente  
416 pesquisas com filogenia de *A. dauci* tem confirmado a caracterização morfológica desta  
417 espécie e sua capacidade de provocar queima das folhas em cenoura e coentro  
418 (*Coriandrum sativum* L.) (Brun *et al.*, 2013; Woudenberg *et al.*, 2014). No presente  
419 estudo, o isolado EH1143-RS proveniente de tomateiro foi identificado como *A. dauci* o  
420 qual teve sua capacidade de causar doença em tomateiro confirmada por meio de testes  
421 de patogenicidade (dados não mostrados). Na literatura não foram encontrados relatos  
422 de *A. dauci* provocando pinta-preta em tomateiro. A espécie *A. mimicula* foi  
423 caracterizada morfológicamente por Simmons (1995) sendo encontrada causando pinta-  
424 preta em tomateiro nos Estados Unidos e a caracterização molecular das regiões gênicas  
425 Alt a 1 e GPD do isolado representativo *A. mimicula* EGS01056 foi realizada por  
426 Rodrigues *et al.*, (2010) em estudos feitos no Brasil. Porém, nenhum isolado de *A.*  
427 *mimicula* propriamente do Brasil havia sido identificado. Desta forma, o relato do  
428 presente trabalho é o primeiro da espécie *A. mimicula* patogênica a tomateiro no país.

429 A análise filogenética do gene Alt a 1 foi similar a filogenia concatenada. Já a  
430 análise de região GPD obteve êxito na distinção das espécies *A. grandis*, *A. tomatophila*  
431 e *A. solani* (Figura 3). Neste caso 28 isolados agruparam com *A. grandis*, sendo 14  
432 provenientes de batateira, oito de tomateiro, três de berinjela, dois de *Datura* e um de  
433 batateira silvestre, com 0,76 de probabilidade posterior e 78% de *bootstrap* para  
434 Máxima Parcimônia. Três isolados de tomateiro (EH1823-CE, EH1435-SP e EH1836-  
435 SP) e o EH1642-CE de lobeira agruparam-se com seis isolados representativos de *A.*  
436 *tomatophila* e um de *A. subcylindrica* com 0,89 de probabilidade posterior e 80% de  
437 *bootstrap* para a Máxima Parcimônia. Todos os isolados oriundos de batateira reuniram-  
438 se no grupo de *A. grandis* constatando a ocorrência de agrupamento por hospedeiro.  
439 Para tomateiro houve especificidade por hospedeiro para três isolados (EH1823-CE,  
440 EH1435-SP e EH1836-SP). Foi confirmada a identificação dos isolados EH1143-RS e  
441 EH1377-CE, ambos de tomateiro, como *A. dauci* (*bootstraps* de 82% e 85% para a  
442 Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança respectivamente) e *A. mimicula* (1 de  
443 probabilidade posterior, 98% de *bootstrap* para Máxima Parcimônia e 94% para  
444 Máxima Verossimilhança) nesta ordem.

445 De acordo com estudos conduzidos por Felsenstein (2004), divergências no nível  
446 de homoplasia, na taxa de heterogeneidade entre os sítios de nucleotídeos e nas taxas



447 evolutivas podem contribuir para a ocorrência de diferenças nas análises filogenéticas  
448 das diferentes regiões gênicas. Lourenço-Júnior (2008) estimou diferentes modelos de  
449 substituição de DNA para Alt a 1, GPD, e sequências ITS e os resultados obtidos  
450 sugerem que estes loci são afetados de diferentes modos por mecanismos evolutivos  
451 estando sujeito a taxas desiguais de mudança (Posada & Crandall 2001) A ocorrência  
452 dessas mudanças possivelmente contribuiu ou mesmo pode ter sido responsável pela  
453 incongruência na análise das sequências conforme ocorreu no presente trabalho.

454 Após esta análise concatenada foram selecionados 12 isolados que não  
455 formaram grupos com nenhum daqueles representativos mais quatro pertencentes ao  
456 grupo do tomateiro e quatro provenientes do grupo da batateira os quais foram  
457 submetidos ao sequenciamento do gene Calmodulina. A Figura 4 mostra os resultados  
458 da análise concatenada das regiões Alt a 1, GPD e Calmodulina utilizando-se *A.*  
459 *calendulae* como outgroup. O alinhamento gerou 1498 pares de base dos quais 69 foram  
460 informativos. As análises filogenéticas realizadas com as regiões separadamente  
461 mostraram topologias semelhantes à análise concatenada (dados não mostrados).

462 Nesta nova análise foi possível a identificação de quatro isolados de *A. grandis*  
463 sendo três provenientes de batateira (EH1548-DF, EH1180-PR e EH809-GO) e um de  
464 berinjela (*S. melongena*) (EH679-MG) com máximo valor de probabilidade posterior e  
465 94% para os *bootstraps* da Máxima Parcimônia e 93% para Máxima Verossimilhança.  
466 O isolado EH1642 obtido de *S. lycocarpum* originário da Bahia foi identificado como *A.*  
467 *solani* com suporte de 1, 73% e 71% para probabilidade posterior, e *bootstraps* da  
468 Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, respectivamente. Este isolado pode ter  
469 vindo de batata, pois foi coletado em Ibicoara-BA, principal região produtora de batata  
470 do Nordeste do Brasil. Mais uma vez verificou-se o agrupamento por hospedeiro sendo  
471 que três isolados de tomateiro (EH1836-SP, EH1435-SP e EH1823-SP) reuniram-se  
472 com os de referência também de tomateiro *A. subcylindrica* ATCC58177 e *A.*  
473 *tomatophila* EGS42156 ambos dos Estados Unidos. O isolado EH1261 oriundo de  
474 tomateiro do Distrito Federal agrupou-se com um isolado representativo de *A. cretica*  
475 originário da Grécia de mesma hospedeira.

476 Em todas as análises filogenéticas deste estudo verificou-se a predominância de  
477 isolados de mesma hospedeira em grupos distintos independente do local de origem dos  
478 mesmos. As pesquisas mais atuais com identificação molecular de organismos

479 fitopatogênicos têm obtido resultados similares no que diz respeito ao agrupamento de  
480 isolados por planta hospedeira sem depender da região geográfica de origem. Treze  
481 espécies de *Alternaria* foram detectadas por Woudenberg *et al.* (2014) por meio de  
482 filogenia concatenada dos genes ITS, GPD, RPB2, TEF1 e Alt a 1 sendo estas *A.*  
483 *sesami*, *A. ricini*, *A. azadirachtae*, *A. cyamopsidis*, *A. obtecta*, *A. steviae*, *A. bataticola*,  
484 *A. tropica*, *A. anagallidis*, *A. echinaceae*, *A. grandis*, *A. multirostrata* e *A. silybi* as  
485 quais separaram-se em diferentes grupos de acordo com os respectivos hospedeiros:  
486 *Sesamum indicum*, *Ricinus communis*, *Azadirachta indica*, *Cyamopsisidis tetragonoloba*,  
487 *Euphorbia pulcherrima*, *Stevia rebaudiana*, *Ipomoea batatas*, *Passiflora edulis*,  
488 *Anagallis arvensis*, *Echinacea* sp., *Solanum tuberosum*, *Richardsia scabra* e *Silybum*  
489 *marianum*. Neste caso nem todos os isolados pertencentes ao mesmo local  
490 permaneceram no mesmo grupo. Em outros estudos também recentes os autores  
491 conseguiram separar isolados de tomateiro dos de batateira mediante análise  
492 filogenética de sequências concatenadas das regiões gênicas Alt a 1, GPD e  
493 Calmodulina com altos valores de suporte (Gannibal *et al.*, 2014).

494 Os dados relatados neste estudo corroboram os resultados das pesquisas mais  
495 novas sendo que neste trabalho foram distinguidas molecularmente 4 espécies de  
496 *Alternaria*. (*A. grandis*, *A. solani*, *A. dauci* e *A. mimicula*) com altos valores de suporte.  
497 Os isolados EH1548-DF (*A. grandis*) e EH1642-BA (*A. solani*) causaram pinta-preta  
498 em tomateiro e batateira, enquanto que o EH1143-RS (*A. dauci*) e o EH1377-CE (*A.*  
499 *mimicula*) mostraram-se patogênicos apenas a tomateiro em testes de patogenicidade  
500 (dados não mostrados)

501

## 502 **Caracterização morfológica**

503

504 Nove isolados provenientes de tomateiro, quatro de batateira, um de berinjela e  
505 quatro de outras solanáceas invasoras silvestres foram selecionados, com base nos  
506 agrupamentos formados nas análises moleculares, para a avaliação das características  
507 morfológicas dos conídios. Os resultados encontram-se nas Tabelas 4 e 5.

508 A caracterização morfológica dos isolados EH809-GO, EH1180-PR, EH1548-  
509 DF provenientes de batateira foi condizente com a caracterização molecular sendo que  
510 estes foram identificados como *A. grandis*. Os isolados EH1261-DF, EH1377-CE e

511 EH1823-CE, todos de tomateiro, foram caracterizados morfolologicamente como *A.*  
512 *cretica*, *A. mimicula* e *A. tomatophila*, respectivamente, estando também de acordo com  
513 a caracterização molecular. No entanto os isolados EH1143-RS de tomateiro, EH679-  
514 MG de berinjela e EH1642-BA de lobeira, apesar de terem sido reconhecidos  
515 molecularmente como *A. dauci*, *A. grandis* e *A. solani* nessa ordem, esses isolados  
516 apresentaram morfologia de conídios diversa dos isolados utilizados como referência.  
517 Segundo Van Der Walls *et al.*, (2004), populações de *A. solani* apresentam alta  
518 variabilidade genética a qual proporciona variações nas características morfológicas  
519 (Rotem, 1994). Deste modo, a variabilidade genética possivelmente ocorreu não só para  
520 *A. solani*, mas também para os isolados de *A. dauci* e *A. grandis* identificados no  
521 presente estudo, sendo, portanto o fator responsável pela diferenciação morfológica dos  
522 isolados EH1143-RS (*A. dauci*), EH679-MG (*A. grandis*) de berinjela e EH1642-BA (*A.*  
523 *solani*) quando comparado aos isolados de referência.

524 As características morfológicas dos conídios dos isolados avaliados e  
525 identificados no presente estudo foram similares àquelas descritas por Simmons (2007).  
526 Em trabalhos de pesquisa realizados no Brasil com caracterização morfológica e  
527 molecular de *Alternaria*, Rodrigues *et al.* (2010) distinguiram as espécies *A.*  
528 *tomatophila*, *A. cretica* e *A. grandis* de um isolado representativo de *A. solani* por meio  
529 de características morfológicas. Já Gannibal *et al.* (2014), não detectaram a ocorrência  
530 de *A. cretica*, associada a tomateiro e *A. grandis* em batateira, mas conseguiram  
531 distinguir *A. tomatophila* de *A. solani*, por meio de atributos morfológicos de isolados  
532 de *Alternaria* oriundos da Rússia. No presente estudo foi possível distinguir  
533 morfolologicamente isolados pertencentes às espécies *A. cretica*, *A. mimicula* e *A.*  
534 *tomatophila* associadas ao tomateiro e *A. grandis* associada à batateira os quais se  
535 mostram patogênicos aos seus respectivos hospedeiros de origem em testes de  
536 patogenicidade (dados não mostrados).

537 Pesquisas combinando a caracterização molecular e morfológica na identificação  
538 de espécies de *Alternaria* de solanáceas ainda são relativamente escassas na literatura  
539 (Lourenço-Júnior *et al.*, 2009). Neste contexto, o presente trabalho representa uma  
540 adição de um conjunto amplo de informações acerca da diversidade fenotípica e  
541 genética de isolados de *Alternaria* nesse importante grupo de plantas hospedeiras. A  
542 identidade de espécies de *Alternaria* de hortaliças, plantas daninhas e solanáceas

543 silvestres e o papel desses patógenos como potenciais fontes de inóculo para culturas  
544 economicamente importantes apresentam vários impactos de ordem prática, fornecendo  
545 a base científica para o estabelecimento de sistemas mais eficientes de manejo da pinta-  
546 preta em condições naturais e nos diferentes sistemas de produção.

547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588

589 **Referências Bibliográficas**

590

591 ACHATZ G; OBERKOFER H; LECHENAUER E; SIMON B; UNGER A;  
592 KANDLER D; EBNER C; PRILLINGER H; KRAFT D; BREITENBACH M.  
593 1995. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and  
594 *Cladosporium herbarum*. *Molecular Immunology*, 32: 213–227.

595 BAKHSHI M. ARZANLOU M; BABAI-AHARI A.; GROENEWALD JZ; BRAUN U;  
596 CROUS PW. 2015. Application of the consolidated species concept to *Cercospora*  
597 spp. from Iran. *Persoonia* 34: 65–86.

598 BERBEE ML; PIRSEYEDI M; HUBBARD S 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and  
599 the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and  
600 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91: 964–  
601 977.

602 BOITEUX LS; REIFSCHNEIDER FJB. 1994. Potato early blight caused by *Alternaria*  
603 *alternata* in Brazil. *Plant Disease* 78: 101.

604 BOITEUX LS; FONSECA, MEN; SIMON PW. 1999. Effects of Plant Tissue and DNA  
605 Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-based Genetic  
606 Fingerprinting Analysis in Carrot. *Journal of the American Society for*  
607 *Horticultural Science* 124: 32–38.

608 BRUN S; MADRID H; GERRITS VAN DEN ENDE B; ANDERSEN B;  
609 MARINACH-PATRICE C; MAZIER D; DE HOOG GS. 2013. Multilocus  
610 phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria*  
611 *dauci* and relatives. *Fungal Biology* 117: 32–40.

612 CASTELLANI, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal*  
613 *of Tropical Medicine & Hygiene*, v.24, p.270–276.

614 CHOU HH.; WU WS. 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer  
615 regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia.  
616 *Mycological Research* 106:164–169.

617 GANNIBAL PB; ORINA AS; MIRONENKO NV; LEVITIN MM. 2014.  
618 Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*,  
619 by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of*  
620 *Plant Pathology* 139: 609–623.

621 GROENEWALD JZ; NAKASHIMA C; NISHIKAWA J; SHIN HD; PARK JH; JAMA  
622 AN; GROENEWALD M; BRAUN U; CROUS PW. 2013. Species concepts in  
623 *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 75: 115–170.

624 GROVES JW; SKOLKO AJ. 1944. Notes on seed-borne fungi: I. *Stemphylium*.  
625 *Canadian Journal of Research* 22: 190–199.

626 HARA MR; SNYDER SH. 2006. Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death  
627 cascade. *Cellular and Molecular Neurobiology* 26: 527–538.

628 HONG SG; CRAMER RA; LAWRENCE CB; PRYOR BM. 2005. Alt a 1 allergen  
629 homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and  
630 secondary structure. *Fungal Genetics and Biology* 42: 119–129.

631 FELSENSTEIN J. 2004. Inferring phylogenies. *American Journal of Human Genetics*  
632 74:1074.

633 KEMMITT G. 2002. Pinta-preta (Alternariose) da batata e tomate. *Portuguese*  
634 *translation by Breno Leite, 2007 The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-  
635 2007-0123-01. Disponível em:

636 <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/PotatoTomatoPort.aspx>. Acessado em 3 de julho de 2014.

637

638 LAWRENCE DP; GANNIBAL PB; PEEVER TL; PRYOR BM. 2013. The sections of

639 *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia* 105: 530–546.

640 LOPES CA; REIS A; BOITEUX, LS. 2005. Doenças fúngicas do tomateiro. p. 17–52.

641 In: LOPES CA; AVILA AC (Org.). Doenças do tomateiro. 1ed. Embrapa

642 Hortaliças, Brasília-DF, Brazil.

643 LOURENÇO JÚNIOR V. 2008. *Molecular population genetics of Alternaria solani in*

644 *Brazil*. Viçosa: UFV. 130p (Tese doutorado).

645 LOURENÇO JÚNIOR V; MOYA A; GONZÁLEZ-CANDELAS F; CARBONE I;

646 MAFFIA LA; MIZUBUTI ESG. 2009. Molecular diversity and evolutionary

647 processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent

648 approaches. *Phytopathology* 99:765–774.

649 MANAMGODA DS; ROSSMAN AY; CASTLEBURY LA; CROUS PW; MADRID

650 H; CHUKEATIROTE E. HYDE KD. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in*

651 *Mycology* 79: 221–288.

652 POSADA D; CRANDALL KA. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide

653 substitution. *Systematics Biology* 50: 580–601.

654 PRYOR BM; GILBERTSON RL. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst

655 *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU

656 rDNA sequences. *Mycological Research* 104: 1312–1321.

657 RODRIGUES TTMS. 2009. *Morphological, molecular characterization, and inference*

658 *about recombination, for species of Alternaria related to early blight of potato and*

659 *tomato*. Viçosa: UFV. 78p (Tese doutorado).

660 RODRIGUES TTMS; BERBEE ML; SIMMONS EG; CARDOSO CR; REIS A;

661 MAFFIA LA; MIZUBUTI ESG. 2010. First report of *Alternaria tomatophila* and

662 *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. *New Disease*

663 *Reports* 22: 28.

664 RODRIGUES T; MIZUBUTI ESG. 2009. Pinta-preta surge uma nova espécie.

665 Disponível em:

666 <http://www.anapa.com.br/principal/images/stories/hortalicas/Batata/pintapretabatata.pdf>. Acessado em 3 julho de 2014.

667

668 ROTEM J. 1994. *The genus Alternaria: Biology, epidemiology, and pathogenicity*. Saint

669 Paul: APS Press. 326p.

670 SILVA BV; CONRADO MM; COUTINHO WM; SUASSUNA ND. 2009. Proteínas

671 quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Química Nova* 32: 453–

672 462.

673 SIMMONS EG. 1995. *Alternaria* themes and variation (112-144). *Mycotaxon* 55: 55–

674 163.

675 SIMMONS EG. 2000. *Alternaria* themes and variation (244-286). Species on

676 Solanaceae. *Mycotaxon* 75: 1–115.

677 SIMMONS, EG. 2007. *Alternaria: An Identification Manual*. Utrecht, Netherlands:

678 CBS Fungal Biodiversity Centre. 775p.

679 SIMON-NOBBE, B; PROBST G; KAJAVA AV.; OBERKOFER H; SUSANI M;

680 CRAMERI R; FERREIRA F; EBNER C; BREITENBACH M. 2000. IgE-binding

681 epitopes of enolases, a class of highly conserved fungal allergens. *Journal of*

682 *Allergy and Clinical Immunology* 106: 887–895.

683 TÖFOLI JG; DOMINGUES RJ. 2006. Alternarioses em hortaliças: sintomas, etiologia  
684 e manejo integrado. *Artigo em Hypertexto*. Disponível em:  
685 [http://www.infobibos.com /Artigos/2006\\_3/alternarioses/Index.htm](http://www.infobibos.com /Artigos/2006_3/alternarioses/Index.htm) >. Acessado  
686 em 3 de julho de 2014.

687 VAN DER WAALS, JE; KORSTEN L; SLIPPERS B. 2004. Genetic diversity among  
688 *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease* 88: 959–  
689 964.

690 WEICHEL, M; SCHMID-GRENDELMEIER P; FLUCKIGER S; BREITENBACH M;  
691 BLASER K; CRAMERI R. 2003. Nuclear transport factor represents a novel cross-  
692 reactive fungal allergen. *Allergy* 58: 98–206.

693 WOUDEBERG JHC; TRUTER M.; GROENEWALD JZ; CROUS PW. 2014. Large-  
694 spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. *Studies in Mycology* 79:  
695 1–47.

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719 **Tabela 1.** Código do isolado, planta hospedeira original e local de coleta de 117  
 720 isolados de *Alternaria* obtidos de solanáceas  
 721

<b>Código do isolado</b>	<b>Hospedeiro de origem</b>	<b>Local de origem</b>	<b>Ano de coleta</b>
EH7	<i>Nicandra physaloides</i>	Gama-DF	2002
EH14	<i>Solanum lycopersicum</i>	Lago Azul-GO	2002
EH568	<i>S. lycopersicum</i>	Lavras-MG	2003
EH584	<i>S. lycopersicum</i>	Recanto das Emas-DF	2003
EH643	<i>S. tuberosum</i>	Mucugê-BA	2003
EH679	<i>S. melongena</i>	Teixeiras-MG	2003
EH680	<i>S. melongena</i>	Ibipeba-BA	2003
EH686	<i>Datura</i> sp.	Irecê-BA	2003
EH694	<i>S. tuberosum</i>	Ponte Alta-DF	2003
EH742	<i>S. lycopersicum</i>	Barbacena-MG	2004
EH768	<i>S. lycopersicum</i>	Cristópolis-BA	2003
EH809	<i>S. tuberosum</i>	Cristalina-GO	2003
EH862	<i>S. lycopersicum</i>	Cristalina-GO	2003
EH1120	<i>S. lycopersicum</i>	Alfredo Wagner-SC	2005
EH1122	<i>S. lycopersicum</i>	Lebon Régis-SC	2005
EH1143	<i>S. lycopersicum</i>	Pelotas-RS	2005
EH1168	<i>Capsicum annuum</i>	Camocim de São Félix-PE	2005
EH1174	<i>S. lycopersicum</i>	Araucária-PR	2005
EH1176	<i>S. tuberosum</i>	Contenda-PR	2005
EH1180	<i>S. tuberosum</i>	Contenda-PR	2005
EH1182	<i>S. tuberosum</i>	Contenda-PR	2005
EH1183	<i>S. tuberosum</i>	Contenda-PR	2005
EH1185	<i>S. tuberosum</i>	São Francisco de Paula-RS	2005
EH1186	<i>S. tuberosum</i>	São Francisco de Paula-RS	2005
EH1189	<i>S. tuberosum</i>	São Francisco de Paula-RS	2005
EH1208	<i>S. lycopersicum</i>	Colombo-PR	2005
EH1209	<i>S. lycopersicum</i>	Araucária-PR	2005



EH1210	<i>S. lycopersicum</i>	Araucária-PR	2005
EH1214	<i>S. lycopersicum</i>	Gama-DF	2005
EH1228	<i>S. lycopersicum</i>	Gama-DF	2005
EH1230	<i>S. tuberosum</i>	Major Vieira-SC	2005
EH1232	<i>S. tuberosum</i>	Major Vieira-SC	2005
EH1233	<i>S. tuberosum</i>	Major Vieira-SC	2005
EH1234	<i>S. tuberosum</i>	Papanduva-SC	2005
EH1235	<i>S. tuberosum</i>	Papanduva-SC	2005
EH1236	<i>S. tuberosum</i>	Papanduva-SC	2005
EH1237	<i>S. tuberosum</i>	Canoinhas-SC	2006
EH1238	<i>S. tuberosum</i>	Canoinhas-SC	2006
EH1239	<i>S. tuberosum</i>	Canoinhas-SC	2006
EH1249	<i>S. tuberosum</i>	Pelotas-RS	2005
EH1252	<i>S. lycopersicum</i>	Itobi-SP	2005
EH1255	<i>S. lycopersicum</i>	Planaltina-DF	2005
EH1256	<i>S. lycopersicum</i>	Planaltina-DF	2005
EH1257	<i>S. lycopersicum</i>	Planaltina-DF	2005
EH1261	<i>S. lycopersicum</i>	Águas Claras-DF	2005
EH1266	<i>S. tuberosum</i>	Gama-DF	2005
EH1330	<i>S. tuberosum</i>	Guaraciaba do Norte-CE	2005
EH1331	<i>S. tuberosum</i>	Guaraciaba do Norte-CE	2005
EH1332	<i>S. tuberosum</i>	Guaraciaba do Norte-CE	2005
EH1336	<i>S. tuberosum</i>	Guaraciaba do Norte-CE	2005
EH1339	<i>S. tuberosum</i>	Guaraciaba do Norte-CE	2005
EH1341	<i>S. tuberosum</i>	Guaraciaba do Norte-CE	2005
EH1374	<i>S. lycopersicum</i>	Guaraciaba do Norte-CE	2005
EH1376	<i>S. lycopersicum</i>	Guaraciaba do Norte-CE	2005
EH1377	<i>S. lycopersicum</i>	Guaraciaba do Norte-CE	2005
EH1381	<i>S. lycopersicum</i>	Capão Bonito-SP	2005
EH1406	<i>C. annuum</i>	Igarapé-MG	2006
EH1435	<i>S. lycopersicum</i>	Itapetininga-SP	2005
EH1436	<i>S. lycopersicum</i>	Itapetininga-SP	2005

EH1437	<i>S. lycopersicum</i>	Itapetininga-SP	2005
EH1440	<i>S. lycopersicum</i>	Itapetininga-SP	2005
EH1441	<i>S. lycopersicum</i>	Itapetininga-SP	2005
EH1467	<i>S. tuberosum</i>	Itapetininga-SP	2005
EH1469	<i>S. tuberosum</i>	Itapetininga-SP	2005
EH1489	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tijucas-SC	2006
EH1495	<i>N. tabacum</i>	Tijucas-SC	2006
EH1505	<i>S. melongena</i>	Brasília-DF	2006
EH1509	<i>S. melongena</i>	Gama-DF	2006
EH1511	<i>S. lycopersicum</i>	Gama-DF	2006
EH1534	<i>S. lycopersicum</i>	Marechal Floriano-ES	2006
EH1548	<i>S. tuberosum</i>	Gama-DF	2006
EH1549	<i>S. tuberosum</i>	Gama-DF	2006
EH1559	<i>S. tuberosum</i>	Ibicoara-BA	2007
EH1642	<i>S. lycocarpum</i>	Ibicoara-BA	2006
EH1643	<i>S. lycocarpum</i>	Ibicoara-BA	2006
EH1654	<i>N. physaloides</i>	Gama-DF	2006
EH1655	<i>N. physaloides</i>	Gama-DF	2006
EH1672	<i>S. lycopersicum</i>	Araguari-MG	2006
EH1674	<i>S. lycopersicum</i>	Taquara-RS	2006
EH1675	<i>S. lycopersicum</i>	Taquara-RS	2006
EH1687	<i>S. lycocarpum</i>	Gama-DF	2006
EH1707	<i>S. lycopersicum</i>	Matinha-TO	2007
EH1712	<i>S. tuberosum</i>	Niquelândia-GO	2007
EH1738	<i>Datura</i> sp.	Gama-DF	2008
EH1792	<i>S. lycopersicum</i>	Nova Friburgo-RJ	2008
EH1799	<i>S. lycopersicum</i>	Lago Sul-DF	2009
EH1800	<i>S. tuberosum</i>	Itapetininga-SP	2009
EH1801	<i>S. tuberosum</i>	Itapetininga-SP	2009
EH1802	<i>S. tuberosum</i>	Itapetininga-SP	2009
EH1806	<i>S. melongena</i>	Camocim de São Félix-PE	2009
EH1821	<i>S. lycopersicum</i>	Ubajara-CE	2009

EH1822	<i>S. lycopersicum</i>	Ubajara-CE	2009
EH1823	<i>S. lycopersicum</i>	Ubajara-CE	2009
EH1834	<i>S. lycopersicum</i>	Guaíra-SP	2009
EH1835	<i>S. lycopersicum</i>	Cafelândia-SP	2009
EH1836	<i>S. lycopersicum</i>	Cafelândia-SP	2009
EH1846	<i>S. lycopersicum</i>	Planaltina-DF	2009
EH1888	<i>S. lycopersicum</i>	Rio Verde-GO	2009
EH1892	<i>S. lycopersicum</i>	Piracanjuba-GO	2009
EH1903	<i>S. lycopersicum</i>	Gama-DF	2009
EH1904	<i>S. lycopersicum</i>	Gama-DF	2009
EH1911	<i>S. lycopersicum</i>	Planaltina-DF	2009
EH1912	<i>S. lycopersicum</i>	Planaltina-DF	2009
EH1952	<i>Solanum</i> sp.	Lebon Régis-SC	2010
EH1971	<i>S. tuberosum</i>	Bom Jesus-RS	2010
EH1975	<i>S. lycopersicum</i>	Planaltina-DF	2010
EH1976	<i>S. lycopersicum</i>	Planaltina-DF	2010
EH1996	<i>S. lycopersicum</i>	Morrinhos-GO	2010
EH2061	<i>S. lycopersicum</i>	Planaltina-GO	2011
EH2062	<i>S. lycopersicum</i>	Planaltina-GO	2011
EH2112	<i>S. lycopersicum</i>	Brasília de Minas-MG	2013
EH2113	<i>S. lycopersicum</i>	Gama-DF	2013
EH2116	<i>N. physaloides</i>	Gama-DF	2013
EH2117	<i>N. physaloides</i>	Gama-DF	2013
EH2119	<i>S. lycopersicum</i>	Gama-DF	2013
EH2120	<i>S. lycopersicum</i>	Capão Bonito-SP	2013
EH2121	<i>S. lycopersicum</i>	Gama-DF	2013

722 EH, Embrapa Hortaliças; BA, Bahia; CE, Ceará; DF, Distrito Federal; ES,  
723 Espírito Santo; GO, Goiás; MG, Minas Gerais; PE, Pernambuco; PR, Paraná;  
724 RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo;  
725 TO, Tocantins.  
726  
727

728 **Tabela 2.** Primers utilizados nas reações de PCR.

729

Lócus	Primer	Sequência do primer (5'-3')	Referência
Alt a 1	Alt-rev	ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC	Hong <i>et al.</i> , 2005
	Alt-for	ATGCAGTTCACCACCATCGC	
GPD	GPD-1	CAACGGCTTCGGTTCGCATTG	Berbee <i>et al.</i> , 1999
	GPD-2	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	
Calmodulina	CaldF1	AGCAAGTCTCCGAGTTCAAGG	Lawrence <i>et al.</i> , 2013
	CaldR1	CTTCTGCATCATCAYCTGGACG	

730

731

732 **Tabela 3.** Isolados de referência de espécies de *Alternaria* cujas sequências foram  
733 obtidas do GenBank e utilizadas na filogenia

734

Isolado	Código GenBank			Hospedeiro	Local
	<i>Alt a1</i>	<i>GPD</i>	<i>Calmodulina</i>		
<i>Alternaria. alternata</i> EGS 34016	AY563301.1	-	-	<i>Arachis hypogaea</i>	IN
<i>A. brassicae</i> BMP 0322	AY563309.1	AY562414.1	-	<i>Brassica</i> sp.	EU
<i>A. capsici</i> BMP0180	AY563298.1	AY562408.1	JQ646256.1	<i>Capsicum annuum</i>	EU
<b><i>A. capsici</i> EGS45075</b>	GQ180087.1	GQ180071.1	-	<i>C. annuum</i>	EU
<i>A. crassa</i> DDGAcr1	AY563293.1	-	-	<i>Datura stramonium/</i> <i>Nicandra physalodes</i>	EU
<b><i>A. crassa</i> EGS44071</b>	GQ180088.1	GQ180072.1	-	<i>Datura stramonium/</i> <i>Nicandra physaloides</i>	EU
<i>A. cretica</i> CBS109164	JQ646426.1	JQ646342.1	JQ646250.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	GR
<b><i>A. cretica</i> EGS46188</b>	GQ180090.1	GQ180074.1	-	<i>S. lycopersicum</i>	GR
<b><i>A. cyphomandrae</i> EGS40058</b>	GQ180075.1	GQ180091.1	-	<i>S. betacea</i>	NZ
<i>A. dauci</i> BA1491 (=EGS46152)	HE796726.1	HE796763.1	-	<i>Daucus carota</i>	NZ
<i>A. dauci</i> BMP167 (=ATCC36613)	HE796725.1	HE796762.1	-	<i>D. carota</i>	EU
<b><i>A. elegans</i> EGS45072</b>	GQ180092.1	GQ180076.1	-	<i>S. lycopersicum</i>	BF
<i>A. grandis</i> CBS109158	JQ646425.1	GQ180077.1	JQ646249.1	<i>S. tuberosum</i>	EU
<b><i>A. grandis</i> EGS44106</b>	GQ180093.1	GQ180077.1	-	<i>S. tuberosum</i>	EU
<b><i>A. mimicula</i> EGS01056</b>	GQ180094.1	GQ180078.1	-	<i>S. lycopersicum</i>	EU
<b><i>A. nitrimali</i> EGS46151</b>	GQ180095.1	GQ180079.1	-	<i>S. viarum</i>	EU

<i>A. porri</i> BA1451 (=EGS48147)	HE796715.1	HE796752.1	-	<i>Allium cepa</i>	EU
<i>A. porri</i> BA1553 (=EGS49065)	HE796717.1	HE796754.1	-	<i>A. cepa</i>	ME
<i>A. solani</i> ATCC58177	AY563299.1	AY278807.1	JQ646232.1	<i>S. tuberosum</i>	EU
<i>A. solani</i> BA1444 (=EGS44098)	HE796705.1	HE796742.1	-	<i>Solanum tuberosum</i>	EU
<i>A. solani</i> BA1546 (=EGS46125)	HE796708.1	HE796745.1	-	<i>S. tuberosum</i>	EU
<i>A. solani</i> BA1552 (=EGS45020)	HE796707.1	HE796744.1	-	<i>S. tuberosum</i>	EU
<i>A. solani</i> BA1558 (=EGS46133)	HE796709.1	HE796746.1	-	<i>S. tuberosum</i>	EU
<i>A. solani</i> BA1937 (=CBS 109157)	HE796713.1	HE796750.1	-	<i>S. tuberosum</i>	EU
<i>A. solani</i> BA1946 (=CBS 11041)	HE796714.1	HE796751.1	-	<i>S. tuberosum</i>	DI
<i>A. solani</i> BMP181	HE796710.1	-	-	<i>S. lycopersicum</i>	EU
<b><i>A. solani</i> EGS45020</b>	GQ180097.1	-	-	<i>S. tuberosum</i>	EU
<i>A. solani-nigri</i> CBS113403	JQ646417.1	JQ646333.1	JQ646233.1	<i>S. nigrum</i>	IN
<i>A. subcylindrica</i> CBS109161	JQ646429.1	JQ646345.1	JQ646254.1	<i>S. lycopersicum</i>	EU
<b><i>A. subcylindrica</i> EGS45113</b>	GQ180100.1	GQ180084.1	-	<i>S. lycopersicum</i>	EU
<i>A. tomatophila</i> BA1443 (=EGS44074)	HE796702.1	HE796739.1	-	<i>S. lycopersicum</i>	EU
<i>A. tomatophila</i> BA1523 (=EGS44024)	HE796694.1	HE796731.1	-	<i>S. lycopersicum</i>	AU
<i>A. tomatophila</i> BA1524 (=EGS44036)	HE796701.1	HE796738.1	-	<i>S. lycopersicum</i>	AU
<i>A. tomatophila</i> BA1526 (=EGS46161)	HE796703.1	HE796740.1	-	<i>S. lycopersicum</i>	NZ
<i>A. tomatophila</i> BA1527 (=EGS48026)	HE796700.1	HE796737.1	-	<i>S. lycopersicum</i>	VE
<i>A. tomatophila</i> BA1528 (=EGS50065)	HE796699.1	HE796736.1	-	<i>S. lycopersicum</i>	EU
<b><i>A. tomatophila</i> EGS42156</b>	GQ180101.1	GQ180085.1	JQ646257.1	<i>S. lycopersicum</i>	EU

735 ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; BA, Birgitte Andersen, Centre for Microbial Biotechnology,  
736 Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark; BMP, Barry M. Pryor, Department of Plant Pathology, University of Arizona,  
737 Tucson, USA; CBS, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; DGG, D. G. Gilchrist, Department of Plant Pathology,  
738 University of California, Davis, CA 95616; EGS, Emory G. Simmons, Crawfordsville, USA; AU, Austrália; BF, Burkina Faso; EU  
739 Estados Unidos; DI, Dinamarca; GR, Grécia; IN, Índia; ME México; NZ, Nova Zelândia; VE, Venezuela.

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751 **Tabela 4.** Caracterização morfológica de isolados de *Alternaria* oriundos de tomateiro  
 752 (*Solanum lycopersicum*) e batateira (*S. tuberosum*)

753

Isolado	Espécie	Rostros (%)	Corpo		Rostro	Septos	
		1/2/3	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comprimento 1/2/3 (µm)	Trans.	Long.
<b><i>S. lycopersicum</i></b>							
EGS 42-156	<i>A. tomatophila</i>	11/65/24	70 – 99	16 - 20	147-216/144-184/97-172	7 - 12	1 - 4
AS440	<i>A. cretica</i>	62/34/4	70 – 100	12 - 16	133-197/126-199/121-147	7 - 12	0 - 3
EH1143-RS			33,32 - 48,94	8,67 - 15,70	3,72 - 14,84	4 - 6	0 - 4
EH1210-PR		72/28	60,93 - 98,74	12,67 - 25,92	178,18 - 282,87	6 - 10	0 - 5
EH1214-DF			52,47 - 101,57	18,04 - 31,64	94,57 - 236,54	5 - 10	2 - 8
EH1252-SP			59,33 - 106,79	18,91 - 34,73	8,50 - 77,99	5 - 10	2 - 8
EH1261-DF		62/34/4	70,65 - 125,44	11,99 - 29,45	97,18 - 248,24/111,58 - 235,64/138,09 - 194,87	6 - 12	0 - 5
EH1377-CE			52,25 - 72,29	16,71 - 30,22	11,28 - 33,53	4 - 7	1 - 10
EH1435-SP		84/16	62,33 - 126,40	11,44 - 29,25	64,83 - 210,46/70,05 - 164,32	6 - 11	0 - 6
EH1823-CE		60/38/2	69,15 - 97,85	14,13 - 19,23	124,23 - 208,43/95,46 - 211,12/145,65 - 159,87	6 - 11	1 - 6
EH2113-DF			75,47 - 111,29	19,18 - 37,79	22,22 - 72,84	7 - 12	3 - 9
<b><i>S. tuberosum</i></b>							
EGS 44-098	<i>A. solani</i>		85 – 100	18 - 22	83 - 110	8 - 12	1 - 3
AS216	<i>A. grandis</i>		104 – 161	14 - 17	156 - 206	11 - 14	0 - 3
EH809-GO			91,66 - 140,87	13,03 - 20,68	81,35 - 200,98	8 - 12	0 - 4
EH1180-PR			116,38 - 247,63	15,95 - 24,18	95,91 - 221,49	9 - 18	0 - 5
EH1548-DF			110,54 - 163,38	18,63 - 29,63	87,99 - 182,55	9 - 16	0 - 4
EH1952-SC			68,87 - 103,40	11,46 - 18,53	69,44 - 260,09	7 - 11	0 - 4

754

755

756 **Tabela 5.** Caracterização morfológica de isolados de *Alternaria* oriundos de berinjela e  
 757 solanáceas invasoras silvestres

758

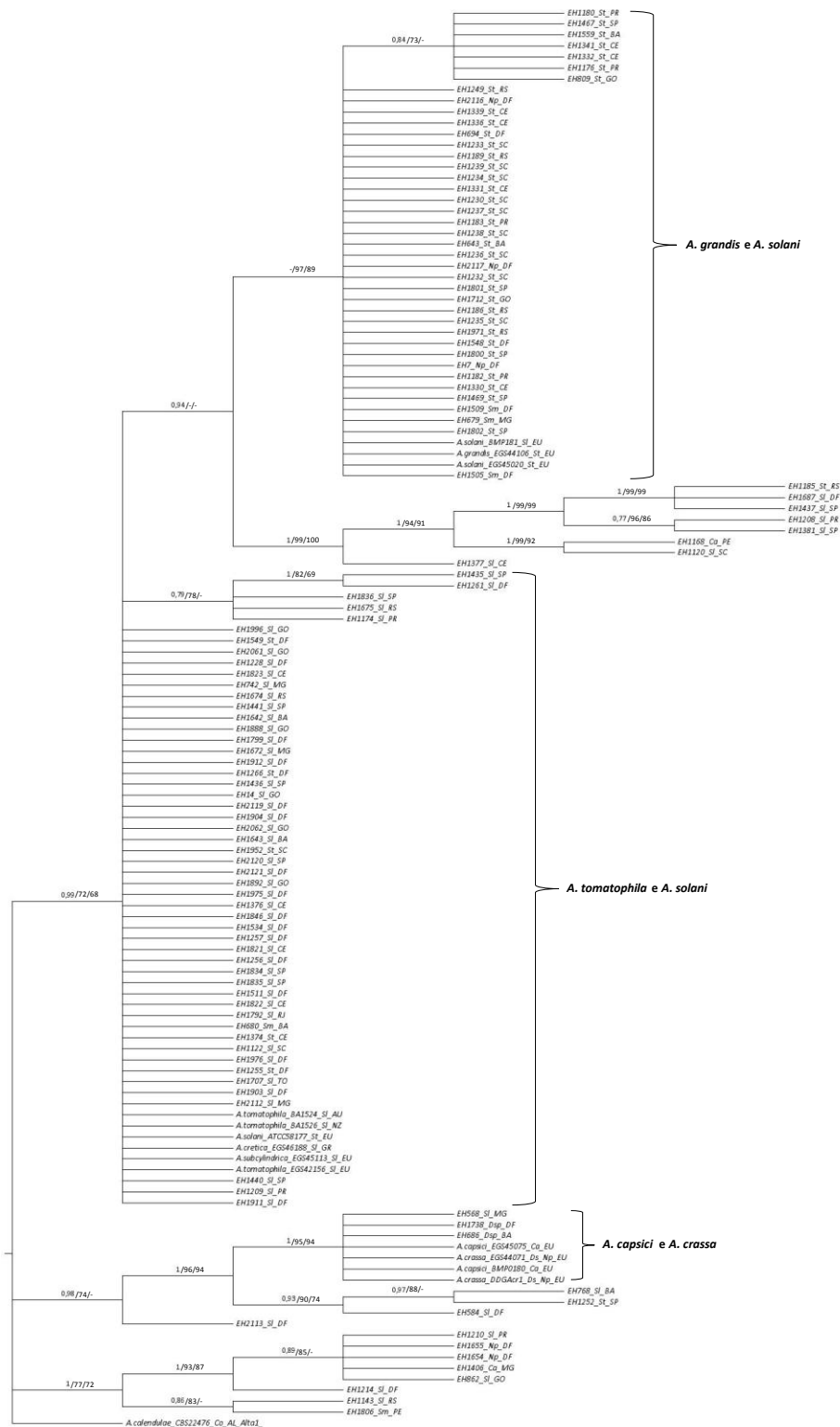
Isolado	Espécie	Rostros (%)	Corpo		Rostro	Septos	
		1/2/3/4	Comprimento(µm)	Largura (µm)	Comprimento 1/2/3/4 (µm)	Trans.	Long.
EGS 42-156	<i>A. tomatophila</i>	11/65/24	70 – 99	16 - 20	147-216/144-184/97-172	7 - 12	1 - 4
AS440	<i>A. cretica</i>	62/34/4	70 – 100	12 - 16	133-197/126-199/121-147	7 - 12	0 - 3
EGS 44-098	<i>A. solani</i>		85 – 100	18 - 22	83 - 110	8 - 12	1 - 3
AS216	<i>A. grandis</i>		104 – 161	14 - 17	156 - 206	11 - 14	0 - 3
EH679-Sm-MG		46/50/4	89,44 - 144,57	16,61 - 26,75	43,08-183,39/48,45-181,88	8 - 13	2 - 6
EH1642-Sly-BA		34/56/8/2	60,48 - 93,98	17,77 - 23,67	124,01-191,98/113,61-192,14/44,82-161,18/77,49-214,58	5 - 8	1 - 5
EH1654-Np-DF		98/2	55,53 - 80,05	14,38 - 21,82	23,97-154,97/51,46-110,50	6 - 11	2 - 7
EH1738-Ds-DF			82,09 - 121,93	16,28 - 28,94	67,61-188,77	7 - 11	0 - 4
EH2117-Np-DF		96/4	69,63 - 101,07	16,28 - 26,78	81,10-160,84	6 - 9	0 - 4

759 Ds: *D.stramonium*, Np: *Nicandra physaloides* (Joá de Capote), Sly: *Solanum lycocarpum* (Lobeira), Sm: *S.melongena* (Berinjela).

760

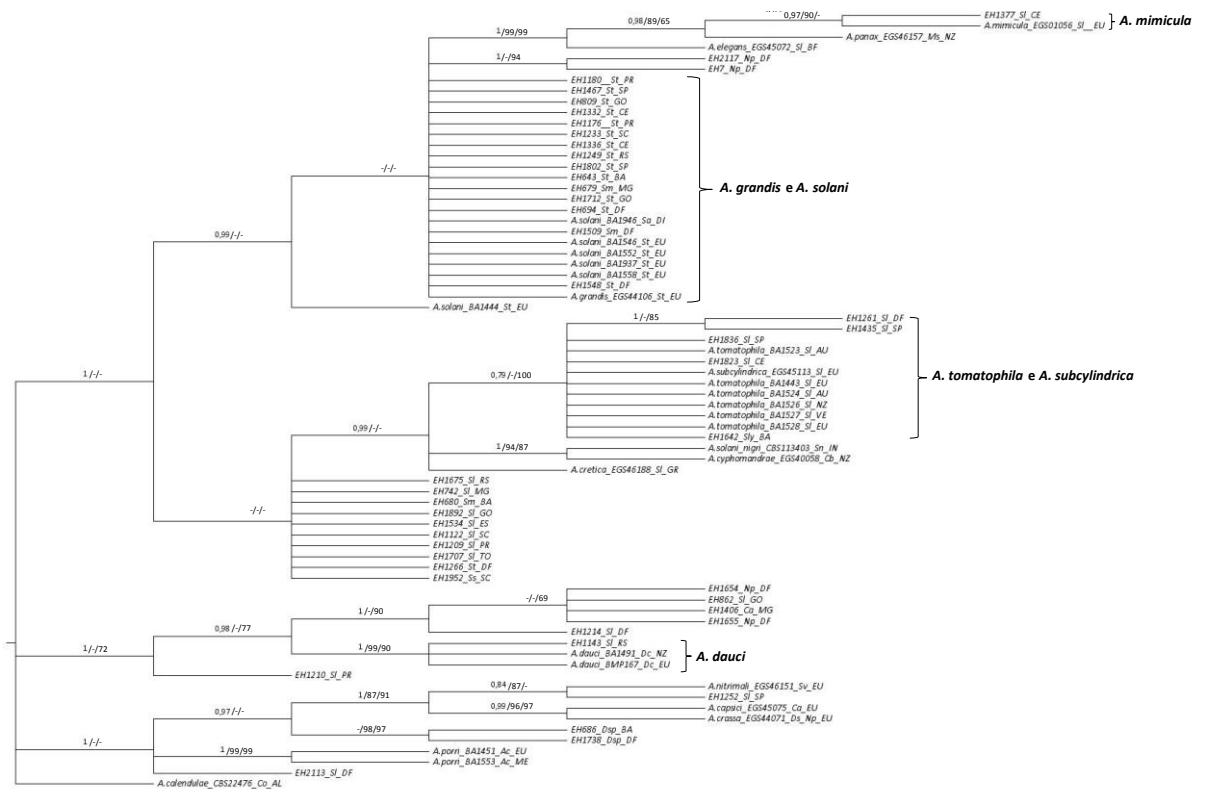
761

762



763

764 **Figura 1.** Análise filogenética por inferência Bayesiana, Máxima Parcimônia e Máxima  
 765 Verossimilhança da região Alt a 1. Valores representados por um traço foram menores  
 766 que 0,75 para probabilidade posterior e menores que 70% e 65% para os valores de  
 767 bootstrap da Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, respectivamente.



768

769 **Figura 2.** Análise filogenética por inferência Bayesiana, Máxima Parcimônia e Máxima  
 770 Verossimilhança das regiões Alt a 1 e GPD. Valores representados por um traço foram  
 771 menores que 0,75 para probabilidade posterior e menores que 70% e 65% para os  
 772 valores de *bootstrap* da Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança,  
 773 respectivamente.

774

775

776

777

778

779

780

781

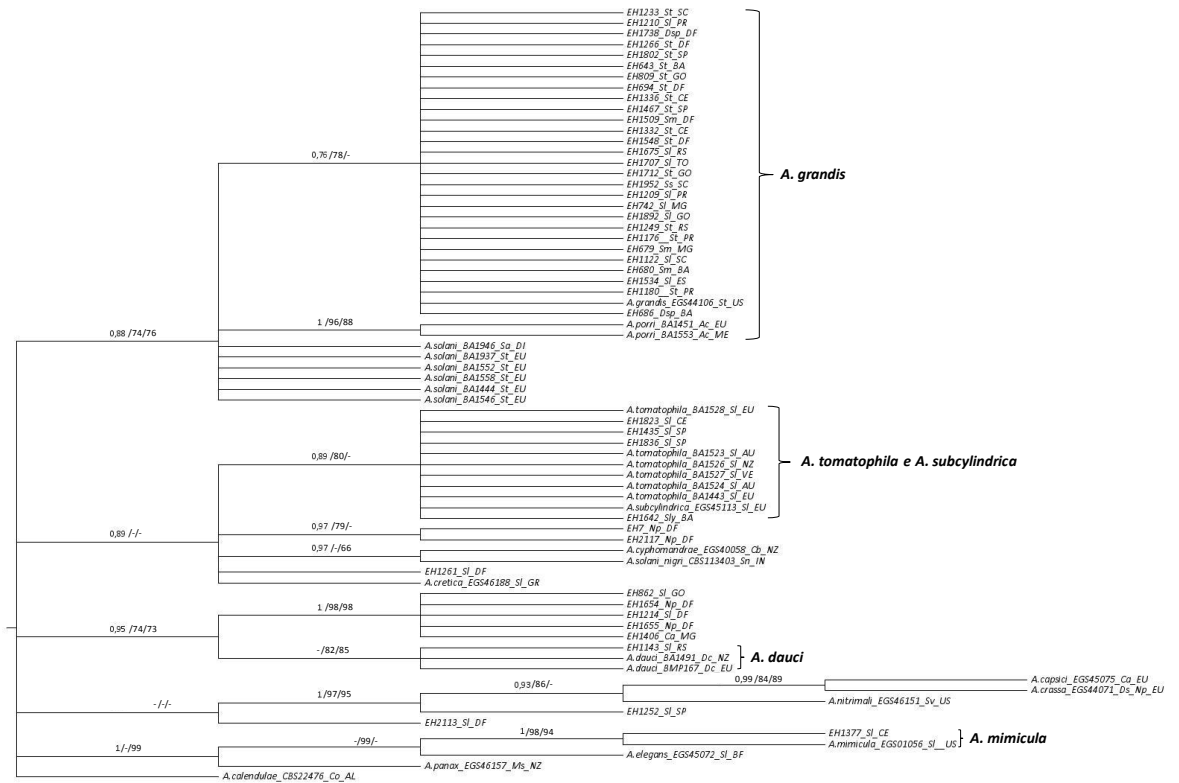
782

783

784

785





786

787 **Figura 3.** Análise filogenética por inferência Bayesiana da região GPD. Valores  
 788 representados por um traço foram menores que 0,75 para probabilidade posterior.

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

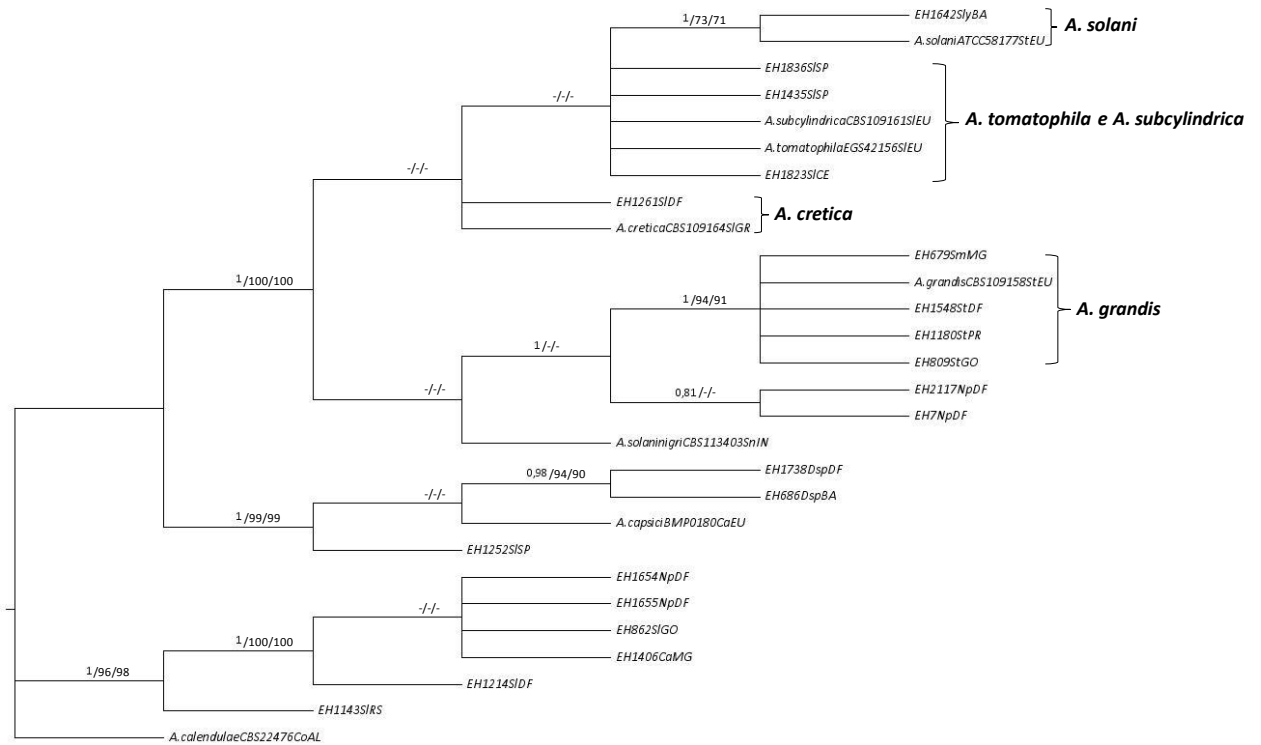
800

801

802

803

804



805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

**Figura 4.** Análise filogenética por inferência Bayesiana, Máxima Parcimônia e Máxima Verossim das regiões Alt a 1 e GPD e Calmodulina. Valores representados por um traço foram menores que 0,75 para probabilidade posterior e menores que 70% e 65% para os valores de *bootstrap* da Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, respectivamente.

### **CAPÍTULO III**

---

#### **Patogenicidade e sensibilidade ao fungicida tebuconazole em isolados de *Alternaria* spp. de solanáceas**

1 **Patogenicidade e sensibilidade ao fungicida tebuconazole em isolados de *Alternaria***  
2 **spp. de solanáceas**

3  
4 **Celma C Peixoto<sup>1</sup>; Ailton Reis<sup>2</sup>; Leonardo S Boiteux<sup>2</sup>**

5 <sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Área de Fitossanidade, Dpt<sup>o</sup> Agronomia,  
6 CEP 52171-900, Recife-PE; <sup>2</sup>Embrapa Hortaliças, C Postal 218, 70351-970 - Brasília -  
7 DF; celmapeixoto22@gmail.com; ailton.reis@embrapa.br;  
8 leonardo.boiteux@embrapa.br.

9  
10 **Resumo**

11  
12 Espécies do gênero *Alternaria* podem causar pinta-preta em várias solanáceas, incluindo  
13 espécies de importância econômica e invasoras, sendo que o controle da mesma é  
14 basicamente feito mediante uso de fungicidas protetores e sistêmicos. Neste sentido o  
15 presente trabalho teve como objetivos avaliar a gama de hospedeiras e a sensibilidade  
16 ao fungicida tebuconazole em isolados de *Alternaria* oriundos de solanáceas cultiváveis  
17 e invasoras silvestres. Para a avaliação da gama de hospedeiras foram utilizadas as  
18 espécies cultiváveis tomateiro, batateira, pimentão, berinjela e jiló e as invasoras *Datura*  
19 *stramonium* e *Physalis pubescens* as quais foram inoculadas com 12 isolados de  
20 *Alternaria*. Nos testes de sensibilidade foram utilizadas as concentrações 0; 0,5; 1; 5;  
21 10; 50; 100 e 200 ppm do tebuconazole e 39 isolados de *Alternaria*. Todos os isolados  
22 avaliados no teste de patogenicidade provocaram sintomas de pinta-preta em tomateiro.  
23 O isolado EH1642-BA de *A. solani* oriundo de lobeira provocou sintomas em todas as  
24 hospedeiras exceto o pimentão. O isolado EH1823-CE de *A. tomatophila* e o EH1548-  
25 DF de *A. grandis* provenientes de tomateiro e batateira, respectivamente, foram  
26 patogênicos a ambas hospedeiras. Já o EH1143-RS de *A. dauci* e o EH1377-CE de *A.*  
27 *mimicula* ambos de tomateiro apresentaram especificidade por sua hospedeira original.  
28 Os isolados EH1214-DF, EH1252-SP, EH2113-DF oriundos do tomateiro e o EH679-  
29 MG proveniente de berinjela causaram doença nas invasoras *D. stramonium* e *P.*  
30 *pubescens* enquanto que o EH1654-DF de *N. physaloides* causou pinta-preta em  
31 tomateiro e o EH1738-DF de *D. stramonium* provocou sintomas em tomateiro, batateira  
32 e jiló. A maioria dos isolados de *Alternaria* mostrou-se sensível ao tebuconazole nos

33 testes *in vitro*. Desta forma verifica-se que diferentes espécies de *Alternaria* são capazes  
34 de causar pinta-preta em diferentes solanáceas sendo que algumas invasoras silvestres  
35 podem atuar como fontes de inóculo do patógeno e o tebuconazole foi eficiente no  
36 controle *in vitro* de todos os isolados avaliados.

37

38 **Palavras chave:** pinta-preta, hospedeiros alternativos, controle químico.

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64 **Pathogenicity and sensitivity to fungicide tebuconazole on *Alternaria* spp. from**  
65 **Solanaceae**

66  
67 **Abstract**

68  
69 Species of *Alternaria* genus, can cause early blight in several solanaceous hosts,  
70 including economically important and wild species. The control of this disease is  
71 basically done through the use of protective and systemic fungicides. In this sense this  
72 work aimed to evaluate the host range and the sensitivity to fungicide tebuconazole of  
73 *Alternaria* isolates from cultivated and wild solanaceous. For the evaluation of the host  
74 range it was used the cultivable species tomato, potato, pepper, eggplant and jiló and the  
75 wild species *Datura stramonium* and *Physalis pubescens* which were inoculated with  
76 12 *Alternaria* isolates. For the tebuconazole sensitivity tests it was used the fungicide  
77 concentrations 0; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 and 200 ppm and 39 *Alternaria* isolates were  
78 evaluated. All isolates evaluated in the pathogenicity test caused early blight symptoms  
79 on tomato. The *A. solani* isolate EH1642-BA from lobeira caused symptoms in all host  
80 plants except sweet pepper. The isolate EH1823-CE of *A. tomatophila* and the isolate  
81 EH1548-DF of *A. grandis* from tomato and potato, respectively, caused disease on both  
82 hosts plants. EH1143-RS of *A. dauci* and the EH1377-CE of *A. mimicula*, both isolates  
83 from tomato, were specific for their host plant. The isolates EH1214-DF, EH1252-SP,  
84 EH2113-DF from tomato and the EH679-MG from eggplant caused disease symptoms  
85 on *D. stramonium* and *P. pubescens*, whereas the isolate EH1654-DF from *N.*  
86 *physaloides* caused early blight on tomato and the isolate EH1738-DF from *D.*  
87 *stramonium* induced symptoms on tomato, potato and jiló. Most *Alternaria* isolates  
88 were sensitive to tebuconazole on *in vitro* tests. The results of this work showed that  
89 *Alternaria* species are able to cause early blight on different solanaceous species, some  
90 wild solanaceous can act as pathogen inoculum sources and the tebuconazole was  
91 efficient in the *in vitro* control of the all *Alternaria* isolates evaluated in this study.

92  
93 **Keywords:** early blight, solanaceous wild, chemical control.

## 96 **Introdução**

97

98 Dentre as doenças que atingem as solanáceas destaca-se a pinta-preta,  
99 alternariose ou mancha de alternaria como uma daquelas de maior relevância em termos  
100 de danos econômicos. A pinta-preta, cujos agentes etiológicos são espécies de fungos  
101 pertencentes ao gênero *Alternaria*, é capaz de afetar diversas solanáceas importantes  
102 economicamente tais como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), batata (*S. tuberosum* L.),  
103 pimentão (*Capsicum annuum* L.), berinjela (*S. melogena* L.) e jiló (*S. jilo* L.) e ainda  
104 algumas solanáceas silvestres ou invasoras. A destruição severa da área foliar das  
105 plantas afetadas é característica desta doença, cujo controle é basicamente feito  
106 mediante aplicação de fungicidas protetores e sistêmicos (REIS *et al.*, 2002).

107 *Alternaria* spp. pode provocar a pinta-preta em várias hortaliças solanáceas  
108 causando sintomas em diferentes partes da planta. Em tomateiro os sintomas aparecem  
109 em folhas, pecíolos, caules e frutos enquanto que em batateira os mesmos ocorrem nas  
110 folhas, pecíolos, hastes e tubérculos. Já no caso do jiló, berinjela e pimentão os únicos  
111 órgãos afetados pela doença são as folhas (Tofoli & Domingues, 2004). As manchas  
112 foliares geralmente apresentam coloração marrom escura ou preta com a presença de  
113 anéis concêntricos e preferencialmente estes sintomas surgem num primeiro momento  
114 nas folhas mais velhas. Nos ramos, caules e tubérculos as lesões típicas da doença são  
115 escuras e deprimidas enquanto que em frutos as mesmas podem apresentar-se na forma  
116 de pequenas lesões escurecidas e profundas que posteriormente coalescem cobrindo  
117 grande parte da superfície do fruto (Agrios, 2005, Pereira *et al.*, 2013). A ocorrência de  
118 elevada severidade da doença em geral é caracterizada por uma grande redução da área  
119 foliar da hospedeira, queda do vigor das plantas, quebras das hastes, depreciação de  
120 frutos e tubérculos e morte de plantas tendo como consequência a diminuição e até  
121 mesmo perda da produção e qualidade dos produtos (Tofoli & Domingues, 2004).

122 A pinta-preta em solanáceas pode ser controlada pelo uso de fungicidas  
123 químicos. O controle é feito mediante aplicações realizadas preventivamente, no início  
124 do período vegetativo, de fungicidas protetores contendo ingredientes ativos tais como  
125 mancozeb, metiram, propineb e clorotalonil, ou cúpricos a exemplo do oxiclureto de  
126 cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso. Caso haja alta incidência da doença  
127 recomenda-se a aplicação de fungicidas sistêmicos, os quais caracterizam-se por

128 apresentar modo de ação específico sendo desta forma adotados no controle curativo,  
129 intercalados com fungicidas protetores. Os fungicidas sistêmicos contendo os princípios  
130 ativos boscalida, iprodiona, procimidona, tebuconazol, difenoconazol, tetraconazol,  
131 bromuconazol, imidazol, procloraz, pirimetanil, azoxistrobina e ciprodinil são  
132 comumente utilizados no controle da pinta-preta (Pereira *et al.*, 2013).

133 Diferentes espécies de *Alternaria* são capazes de causar a pinta-preta em  
134 diversas hortaliças solanáceas incluindo espécies cultivadas comercialmente ou  
135 silvestres existentes nos locais de plantio sendo que estas últimas podem atuar como  
136 fontes de inóculo do patógeno. Também há ainda a possibilidade destas espécies de  
137 *Alternaria* apresentarem sensibilidades distintas aos vários fungicidas, ou combinações  
138 destes, que são utilizados no controle químico da doença nos campos de cultivo. Assim,  
139 este trabalho foi realizado com o intuito de avaliar a gama de hospedeiras solanáceas e a  
140 sensibilidade ao fungicida sistêmico tebuconazole (Folicur®), de isolados de *Alternaria*  
141 obtidos de plantas cultiváveis e invasoras silvestres pertencentes a família Solanácea.

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159



## 160 **Material e Métodos**

161

### 162 **1. Avaliação da gama de hospedeiras**

163

164         Nesta avaliação foram utilizados 12 isolados previamente caracterizados por  
165 meio de análise de sequências de DNA das regiões Alt a1, GPD e Calmodulina, e  
166 morfológicamente por meio de mensurações das dimensões dos conídios e  
167 quantificação do número de rostros e septos (Tabela 1). Estes isolados foram obtidos de  
168 hortaliças solanáceas sendo 7 oriundos de tomateiro, 1 de batateira, 1 de berinjela, 1 de  
169 joá de capote (*Nicandra physaloides*), 1 de datura (*Datura stramonium*) e 1 de lobeira  
170 (*Solanum lycocarpum*) originários da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Minas Gerais, Rio  
171 Grande do Sul, Paraná e São Paulo.

172         Primeiramente, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo os  
173 meios V8 (Suco de Oito Vegetais, Campbel) com pH de 6,4 e PCA (Potato Carrot  
174 Ágar), as quais foram mantidas sem filme plástico, seguido de incubação em câmara de  
175 crescimento (B.O.D.) a 22°C por 7 dias (Simmons, 2007). Após este período os conídios  
176 foram removidos com a adição de 10 mL de água destilada, contendo espalhante  
177 adesivo (Tween 80®) a 0,1%, em cada placa, seguida de raspagem superficial da  
178 colônia com escova de cerdas macias. A suspensão foi filtrada em dupla camada de  
179 gaze esterilizada, sendo posteriormente recolhida em um béquer. A quantificação do  
180 número de conídios de cada suspensão correspondente a cada isolado foi feita com o  
181 auxílio de uma câmara de Neubauer (hemacitômetro) e as concentrações foram  
182 devidamente ajustadas para 10<sup>4</sup> conídios/mL.

183         Foram utilizadas 7 espécies de solanáceas hospedeiras sendo estas: tomateiro,  
184 batateira, pimentão, berinjela, jiló, datura e fisales (*Physalis pubescens* L.).  
185 Primeiramente foram feitas sementeiras em bandejas de 128 células contendo substrato  
186 Plantmax®, colocando-se duas sementes por célula, as quais foram mantidas sob  
187 condições de casa de vegetação. Após cerca de 15 dias as mudas foram transferidas para  
188 vasos de 1L com solo sendo mantidas nas mesmas condições anteriormente citadas.  
189 Depois de três meses as plantas tiveram suas partes aéreas inoculadas via pulverização  
190 com as suspensões fúngicas sendo em seguida colocadas em câmara úmida por 24  
191 horas. As avaliações da presença ou ausência das lesões que caracterizam os sintomas

192 da pinta-preta foram realizadas 7 dias após a inoculação. As folhas com sintomas foram  
193 coletadas e colocadas em câmara úmida com o propósito de se confirmar a presença do  
194 patógeno nas lesões. Só foram considerados patogênicos isolados que causaram lesões  
195 em folhas inoculadas e nestas foi observada esporulação do patógeno em câmara úmida.  
196 Adotou-se neste experimento o delineamento inteiramente casualizado com três  
197 repetições por tratamento sendo utilizadas duas plantas por cada vaso.

198

## 199 **2. Avaliação da sensibilidade ao tebuconazole**

200

201 Foram utilizados 39 isolados de *Alternaria*, selecionados a partir de análise de  
202 sequências de DNA da região Alt a 1, obtidos de diversas solanáceas e diferentes  
203 regiões do Brasil. Estes foram avaliados quanto a sensibilidade ao fungicida sistêmico  
204 tebuconazole (Folicur® 200 EC).

205 Inicialmente foi realizada a transferência de um disco de meio de cultura  
206 contendo estruturas do patógeno de 10 mm de diâmetro, obtidos das margens de  
207 colônias cultivadas por 7 dias em meio BDA (Batata Dextrose e Ágar), para placas de  
208 Petri contendo cerca de 15mL de meio BDA, sem antibiótico e suplementado com doses  
209 crescentes (0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200 ppm) de tebuconazole e uma testemunha sem  
210 fungicida. As placas foram incubadas fechadas em câmara de crescimento (B.O.D.) à  
211 22°C com fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 de escuro.

212 Foram realizadas três mensurações, registrando-se o diâmetro da colônia em  
213 duas direções perpendiculares, em intervalos de três dias contatos a partir da  
214 implantação do experimento. O diâmetro original do disco de micélio (10 mm) foi  
215 subtraído dessa mensuração e foi feito o cálculo da porcentagem de inibição do  
216 crescimento micelial ( $ICM_F$ ) por meio da fórmula  $ICM_F = [(T - F)/T] \times 100$ , onde T é o  
217 diâmetro da colônia da testemunha e F é o diâmetro da colônia do tratamento com o  
218 fungicida. Os experimentos foram realizados duas vezes. Realizou-se o cálculo da  
219 concentração efetiva ( $mg.mL^{-1}$ ) para inibir 50% do crescimento micelial ( $CE_{50}$ ) para  
220 cada um dos isolados mediante regressão linear das inibições do crescimento micelial  
221 versus a transformação  $\log_{10}$  para cada concentração do fungicida (Pereira *et al.*, 2012).  
222 Distribuição de frequência dos isolados entre valores de  $CE_{50}$  foram estabelecidos,  
223 assim os isolados foram agrupados de acordo com o grau de sensibilidade ao fungicida.

## 224 **Resultados e Discussão**

225

### 226 **1. Avaliação da gama de hospedeiras**

227

228 Os dados da avaliação da gama de hospedeiras podem ser visualizados na Tabela  
229 2. Todos os 12 isolados avaliados causaram os sintomas característicos da pinta-preta  
230 em tomate independente do hospedeiro de origem. Para batateira, 7 dos isolados  
231 testados foram capazes de causar a doença sendo 3 oriundos de tomateiro, 1 de  
232 batateira, 1 de berinjela, 1 de lobeira e 1 de datura. Foi verificada a esporulação do  
233 fungo nas lesões presentes nas folhas coletadas e submetidas à câmara úmida  
234 confirmando assim a ocorrência da pinta-preta.

235 Trabalhos de pesquisa com isolados de *A. solani* provenientes de tomateiro  
236 mostraram que estes isolados foram capazes de causar pinta-preta em diferentes  
237 espécies do gênero *Solanum* (Henning & Alexander, 1959), corroborando com os  
238 resultados encontrados anteriormente por Neergaard (1945) que verificou  
239 inespecificidade por planta hospedeira ao trabalhar com *A. solani*. Strandber (1992)  
240 verificaram que as espécies *A. alternata* e *A. solani* não apresentam preferência a uma  
241 única planta hospedeira. Segundo o autor *A. alternata* pode provocar pinta-preta em  
242 tomateiro, batateira, pimentão e berinjela, e *A. solani* causa doença em tomateiro,  
243 batateira e pimentão. A existência de uma possível ausência de especificidade por  
244 hospedeiro foi relatada por Reis & Boiteux (2008, 2010), em estudos mais recentes com  
245 espécies hospedeiras de *A. brassicae* e *A. brassicicola* na família Brassicaceae no  
246 Brasil. Os autores verificaram que isolados de *A. brassicae* e *A. brassicicola* obtidos de  
247 diferentes espécies de brássicas de várias regiões geográficas do país foram capazes de  
248 causar lesões foliares em todas as plantas pertencentes a família Brassicaceae utilizadas  
249 nos ensaios sob condições de casa de vegetação. Quando um patógeno apresenta  
250 inespecificidade por hospedeiro há consequências diretas na epidemiologia do mesmo  
251 pois neste caso a existência de uma ampla gama de plantas hospedeiras para um mesmo  
252 patógeno tem como resultado um incremento das chances de permanência e  
253 sobrevivência deste fitopatógeno em condições naturais.

254 O isolado EH1642-BA proveniente de lobeira identificado molecularmente  
255 como *A. solani* provocou sintomas da pinta-preta em todas as plantas hospedeiras

256 submetidas ao teste de patogenicidade com exceção do pimentão. De acordo com  
257 Fancelli (1991), *A. solani* pode causar doença em outras solanáceas além da batateira e  
258 do tomateiro tais como a berinjela e o jiló, corroborando com os resultados do presente  
259 trabalho uma vez que o isolado de *A. solani* EH1642-BA também ocasionou lesões de  
260 pinta-preta em berinjela e jiló. Estudo recente mostrou que a espécie *A. solani* é capaz  
261 de causar doença em pelo menos cinco espécies diferentes de *Solanum* em condições de  
262 campo estando em conformidade com testes de patogenicidade realizados em  
263 laboratório (Gannibal *et al.*, 2014). Verifica-se, portanto, que o resultado encontrado no  
264 presente estudo, em relação a ausência de especificidade por hospedeiro do isolado  
265 EH1642-BA reconhecido como *A. solani*, está de acordo com as informações relatadas  
266 em trabalhos de pesquisa antigos e atuais.

267         Dois dos isolados avaliados no teste de patogenicidade caracterizados como *A.*  
268 *tomatophila* (EH1823-CE) e *A. grandis* (EH1548-DF) provenientes de tomateiro e  
269 batateira, respectivamente, não apresentaram especificidade para as duas plantas  
270 hospedeiras originais. Neste caso o EH1823-CE causou lesões de pinta-preta em  
271 tomateiro e batateira enquanto que o EH1548-DF provocou doença em tomateiro,  
272 batateira e ainda em jiló. Segundo Gilbert & Webb (2007), as espécies *A. tomatophila* e  
273 *A. grandis* são filogeneticamente próximas e seus hospedeiros também são intimamente  
274 relacionados entre si pelo fato de pertencerem à mesma família botânica. Isso explicaria  
275 o fato de alguns isolados das duas espécies serem patogênicos a ambos os hospedeiros  
276 principalmente quando em condições de grande quantidade de inóculo associada à  
277 temperatura e umidade favoráveis a infecção, estando em concordância com os  
278 resultados descritos por Rodrigues (2009). Estes autores relataram em seus estudos uma  
279 especificidade incompleta de isolados de *Alternaria* de tomateiro e batateira, ou seja,  
280 espécies que causam doença em tomateiro podem infectar batateira e isolados de *A.*  
281 *grandis* provenientes de batateira são capazes de provocar a pinta-preta em tomateiro,  
282 sendo que *A. tomatophila* mostrou-se mais agressiva a ambos os hospedeiros quando  
283 comparada com *A. grandis*, estando de acordo também com os resultados obtidos na  
284 presente pesquisa em que *A. tomatophila* (EH1823-CE) e *A. grandis* (EH1548-DF)  
285 provocaram lesões de pinta-preta tanto em tomateiro quanto em batateira  
286 indistintamente.

287 Já os isolados EH1143-RS e EH1377-CE, ambos provenientes de tomateiro e  
288 identificados molecularmente como *A. dauci* e *A. mimicula*, respectivamente,  
289 mostraram especificidade por hospedeiro ocasionando sintomas típicos da pinta-preta  
290 apenas em tomateiro. A espécie *A. dauci* é comumente encontrada causando queima das  
291 folhas em cenoura e coentro enquanto que *A. mimicula* está associada à pinta-preta em  
292 tomateiro (Simmos, 2007). Na literatura não foram encontrados casos de *A. dauci*  
293 causando pinta-preta em tomateiro. A ocorrência de especificidade por hospedeira já foi  
294 relatada em estudos com outras espécies de fungos fitopatogênicos. Peruch *et al.* (2006)  
295 em trabalhos de pesquisas com isolados de *A. brassicae* detectaram uma aparente  
296 especificidade por hospedeira por parte desta espécie a qual foi encontrada causando  
297 doença em couve chinesa e brócolos. Em estudos mais recentes, Nishikawa &  
298 Nakashima (2013) trabalhando com caracterização taxonômica e avaliação de gama de  
299 hospedeiras de novas espécies de *Alternaria* verificaram que um isolado identificado  
300 como *A. alstroemeriae* foi patogênico apenas a *Alstroemeria* spp. (astromélia), seu  
301 hospedeiro de origem, indicando também a preferência do fitopatógeno por determinada  
302 planta.

303 Os isolados EH1214-DF, EH1252-SP, EH2113-DF oriundos de tomateiro e o  
304 EH679-MG de berinjela foram capazes de causar lesões da pinta-preta em *Datura*  
305 *stramonium* e *P. pubescens*, duas solanáceas invasoras. Alguns autores já haviam  
306 relatado a ocorrência de *A. cucumerina* sobrevivendo em cucurbitáceas selvagens  
307 (Kucharek, 2000; Viana *et al.*, 2001). Estes resultados foram confirmados por Batista *et*  
308 *al.* (2009) em estudos com hospedeiros alternativos de *A. cucumerina* agente causal da  
309 mancha ou queima de alternaria em cucurbitáceas. Estes autores verificaram que *A.*  
310 *cucumerina* foi capaz de causar sintomas da queima em melancia (*Citrullus lanatus*  
311 Thunb) e caxixe (*Lagenaria* sp.) comprovando assim o papel deste último como  
312 hospedeiro alternativo do referido patógeno. Os resultados do presente estudo  
313 demonstraram, portanto, que *D. stramonium* e *P. pubescens* podem atuar como  
314 hospedeiros alternativos de espécies de *Alternaria* patogênicas a tomateiro e batateira. O  
315 isolado EH1654-DF obtido de *N. physaloides* provocou sintomas da pinta-preta em  
316 tomateiro e o EH1738-DF obtido de *D. stramonium* provocou doença em tomateiro,  
317 batateira e jiló demonstrando mais uma vez que algumas solanáceas invasoras podem

318 atuar como fonte de inóculo de espécies de *Alternaria* patogênicas à solanáceas de  
319 importância econômica.

320

## 321 **2. Avaliação da sensibilidade ao tebuconazole**

322

323 As Tabelas 3 e 4 e 5 mostram os valores da concentração do tebuconazole em  
324 mg.L<sup>-1</sup> necessária para inibir em 50% (CE<sub>50</sub>) o crescimento micelial *in vitro* de espécies  
325 de *Alternaria* de solanáceas. À medida que se aumentou a concentração do ingrediente  
326 ativo foi constatada uma diminuição do crescimento micelial do patógeno tendo como  
327 resultado geral a necessidade de baixas quantidades do produto para proporcionar  
328 inibição do crescimento micelial do fungo.

329 Comparando-se todos os valores da CE<sub>50</sub> notou-se que as maiores concentrações  
330 do tebuconazole capazes de proporcionar redução do crescimento do fungo foram  
331 detectadas para alguns isolados provenientes de tomateiro (EH1261-DF, EH1672-MG,  
332 EH1903-DF, EH1911-DF) (Tabela 3), os quais mostraram-se desta forma menos  
333 sensíveis ao produto em condições *in vitro*. No entanto, Tofoli *et al.* (2003) trabalhando  
334 com os fungicidas tebuconazole, difenoconazole, fluazinam, iprodione, prochloraz,  
335 procymidone, pyrimethanil, e metconazole, todos sistêmicos, detectaram a ocorrência  
336 de elevadas reduções do crescimento micelial com valores de 70 a 80% a partir de 1  
337 µg.mL<sup>-1</sup> e inibição total a 100 µg.mL<sup>-1</sup> para todos os isolados de *Alternaria* avaliados,  
338 sendo estes também originários de tomateiro. É possível que um mesmo fungicida  
339 promova fungitoxicidade divergente sobre o crescimento micelial *in vitro* de isolados  
340 diferentes conforme relatou Parisi *et al.* (1999) em suas pesquisas para quatro isolados  
341 de *Phomopsis sojae* Lehman e *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* Morgan-Jones.  
342 Ainda segundo estes autores a ocorrência dessas diferenças podem estar associadas a  
343 vários fatores como a variabilidade genética existente entre estes organismos  
344 fitopatogênicos. Uma outra possível explicação para a ocorrência de alguns isolados de  
345 *Alternaria* de tomateiro, menos sensíveis ao fungicida seria um uso mais intenso deste  
346 fungicida em lavouras de tomateiro do que em lavouras de batateira. Assim, a pressão  
347 de seleção seria maior sobre os isolados de tomate, acelerando o processo de seleção de  
348 isolados pouco sensíveis ao produto. Outro fator que pode estar influenciando neste  
349 resultado é o fato que as espécies de *Alternaria* prevalentes em batata (*A. grandis*) e

350 tomate (*A. tomatophila*) são diferentes. Espécies fúngicas distintas podem se comportar  
351 de maneira desigual diante de um determinado fungicida químico.

352 Os demais isolados avaliados, tanto aqueles originários de batateira quanto os  
353 oriundos de outras solanáceas, assim como também os demais isolados de tomateiro,  
354 mostraram-se bastante sensíveis ao tebuconazole sendo necessário muitas das vezes  
355 doses mínimas do princípio ativo para proporcionar inibição do crescimento micelial,  
356 mesmo em pequenas concentrações do fungicida, o que por sua vez implicou nos baixos  
357 valores da CE<sub>50</sub> detectados no presente estudo (Tabelas 3, 4 e 5). Desta forma verificou-  
358 se uma alta frequência de isolados sensíveis ao fungicida sendo que mais da metade dos  
359 isolados de *Alternaria* avaliados apresentaram sensibilidade a valores de CE<sub>50</sub> de 0,0001  
360 a 0,30 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 1).

361 O tebuconazole é um fungicida sistêmico de ação preventiva e curativa  
362 pertencente ao grupo químico triazol caracterizado pelo mecanismo de ação  
363 denominado de IBE (inibidor da biossíntese do ergosterol). Todos os fungicidas  
364 inibidores da biossíntese de ergosterol (IBE) incluindo o tebuconazole avaliados por  
365 Ferreira *et al.* (2006) foram capazes de inibir o crescimento micelial de  
366 *Cylindrocladium candelabrum*, agente causal de doenças em viveiros de *Eucalyptus* nos  
367 testes *in vitro* cuja sensibilidade, determinada por meio da CE<sub>50</sub>, variou de alta a  
368 moderada. Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose do  
369 mamoeiro demonstraram alta sensibilidade ao imazalil, prochloraz, propiconazol e  
370 tebuconazole, com valor de CE<sub>50</sub> calculado inferior a 1 ppm (Tavares & Souza, 2005).  
371 Em trabalhos de pesquisas também com fungicidas inibidores da biossíntese de  
372 ergosterol realizadas por Paredes & Munoz, (2002) e van den Berg *et al.* (2002) foi  
373 verificada a ocorrência de inibição de crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum*  
374 *acutatum* e *A. cassiae* patogênicos a morangueiro (*Fragaria* L.) e feijão-caupi (*Vigna*  
375 *unguiculata* L.), respectivamente, em baixas concentrações dos fungicidas.

376 Uma possível justificativa para os dados obtidos no presente estudo assim como  
377 para os resultados das pesquisas citadas anteriormente reside no fato da eficiência na  
378 inibição do crescimento micelial estar diretamente ligada ao modo de ação desses  
379 fungicidas que operam sobre a biossíntese do ergosterol o qual por sua vez faz parte da  
380 composição da membrana de fungos, sendo um componente essencial da mesma. O  
381 composto triazol, grupo químico a que pertence o tebuconazole, atua de forma direta

382 sobre a 14 $\alpha$ -demetilase do citocromo P450, responsável pela demetilação do carbono  
383 14 $\alpha$  e evita que a enzima dê continuidade ao processo de demetilação do lanosterol, um  
384 precursor do ergosterol, impedindo assim o desenvolvimento e crescimento do fungo  
385 (Ghini & Kimati, 2000).

386 Verificou-se a ocorrência de variações nos valores da CE<sub>50</sub> de um mesmo  
387 isolado nas duas avaliações realizadas neste trabalho para isolados originários de  
388 tomateiro, batateira e outras solanáceas. O meio de cultura BDA utilizado nos  
389 experimentos de avaliação da sensibilidade dos isolados de *Alternaria* ao Tebuconazole  
390 caracteriza-se por apresentar composição química complexa devido ao fato de ter em  
391 sua formulação amido de tubérculos de batata cuja constituição química não é definida,  
392 sendo que esta constituição está sujeita a variações decorrentes de uma série de fatores  
393 como por exemplo a cultivar da batateira fornecedora dos tubérculos e as condições de  
394 cultivo em que os tubérculos foram produzidos. Neste caso a variação na composição  
395 química do meio de cultura, decorrente do uso de amido de tubérculos de batata de  
396 diferentes procedências, pode ter influenciado no efeito do princípio ativo do fungicida  
397 sobre o crescimento micelial do fungo o que justificaria a ocorrência dessas  
398 diferenciações nos valores da CE<sub>50</sub> de um mesmo isolado. O uso de BDA sintético, o  
399 qual tem uma composição química mais uniforme, diminuiria este problema.

400 Os resultados obtidos no presente estudo são importantes em termos de  
401 epidemiologia e manejo de doença uma vez que espécies de solanáceas invasoras são  
402 comumente encontradas nos campos de cultivo do Brasil e podem manter e multiplicar  
403 inóculo de espécies de *Alternaria* capazes de afetar as culturas de importância  
404 econômica. O estudo da sensibilidade *in vitro* dos isolados ao tebuconazole ganha  
405 relevância pelo fato de abrir caminhos para a adequação de medidas de controle  
406 químico nos locais de cultivo de hortaliças solanáceas.

407

408

409

410

411

412

413



414 **Referências Bibliográficas**

415

- 416 AGRIOS GN. 2005. *Plant Pathology*. Flórida: Elsevier Academic Press. 922 p.
- 417 APARECIDO CC.; FINATTI D. 2012. *Variabilidade patogênica de isolados de*  
418 *Verticillium obtidos de diferentes hospedeiros*. São Paulo: Instituto Biológico -  
419 Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, 6p (Documento Técnico, 014).
- 420 BATISTA PF.; PEIXOTO, AR; SILVA, MA; NETO, ISL; PAZ, CD. 2009.  
421 Hospedeiros alternativos de *Alternaria cucumerina*. *Revista Verde* 4: 162-167.
- 422 COCHRAN, WG; COX, GM. 1957. *Experimental designs*. London: John Wiley, 611p.
- 423 FANCELLI MI. 1991. *Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética*  
424 *entre isolados de Alternaria solani do tomate e da batata e variabilidade patogênica*  
425 *de A. solani f. sp. lycopersici N. F.* Piracicaba: USP-ESALQ. 80p (Tese doutorado).
- 426 FERREIRA EM; ALFENAS AC; MAFFIA LA; MAFIA RG. 2006. Eficiência de  
427 fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto.  
428 *Fitopatologia Brasileira* 31: 468-475.
- 429 GANNIBAL PB; ORINA AS; MIRONENKO NV; LEVITIN MM. 2014.  
430 Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*,  
431 by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of*  
432 *Plant Pathology* 139: 609-623.
- 433 GHINI R; KIMATI H. 2000. *Resistência de fungos a fungicidas*. Jaguariúna: Embrapa  
434 Meio Ambiente. 78p.
- 435 GILBERT GS; WEBBS CO. 2007. Phylogenetic signal in plant pathogen–host range.  
436 *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 4979-4983.
- 437 HENNING RG; ALEXANDRE LJ. 1959. Evidence of existence of physiologic races of  
438 *Alternaria solani*. *Plant Disease Reporter* 43: 298-380.
- 439 KUCHAREK ,T. 2000. *Alternaria leaf blight of cucurbits. Plant Pathology Fact Sheet*.  
440 Disponível em: <http://plantpath.ifas.ufl.edu/extension/fact-sheets/pdfs/pp0032.pdf>.  
441 Acessado em 20 de dezembro de 2014.
- 442 NEERGAARD, P. 1945. *Danish species of Alternaria and Stemphylium taxonomy,*  
443 *parasitism, economical significance*. London: Munksgaard. 560p.
- 444 NISHIKAWA J; NAKASHIMA, C. 2013. Taxonomic characterization and  
445 experimental host ranges of four newly recorded species of *Alternaria* from Japan.  
446 *Journal of Phytopathology* 161: 604-616.
- 447 PAREDES BSG; MUNOZ FR. 2002. Effect of different fungicides in the control of  
448 *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants.  
449 *Crop Protection* 21:11-15.
- 450 PERUCH LAM; MICHEREFF SJ; ARAÚJO IB. 2006. Levantamento da intensidade da  
451 alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e  
452 Santa Catarina. *Horticultura Brasileira* 24: 464-469.
- 453 PARISI JJD; MENTEN JOM; MARTINS MC. 1999. *Sensibilidade in vitro e in vivo de*  
454 *Phomopsis sojae e Phomopsis phaseoli f.sp. meridionalis a fungicidas*. *Fitopatologia*  
455 *Brasileira* 24: 25-30.
- 456 PEREIRA RB; CARVALHO ADF; PINHEIRO JB. 2013. Manejo da pinta preta: uma  
457 ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto. Brasília: Embrapa Hortaliças. 5p  
458 (Comunicado Técnico, 95).
- 459 PEREIRA AVS; MARTINS RB; MICHEREFF SJ; SILVA MB; CÂMARA, MPS.  
460 2012. Sensitivity of *Lasiodyplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to  
461 MBC and DMI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 132: 489-498.

- 462 R: A Language and Environment for Statistical Computing R Core Team, R Foundation  
463 for Statistical Computing. 2013. Vienna, Austria. Disponível em: [http://www.R-](http://www.R-project.org/)  
464 [project.org/](http://www.R-project.org/). Acessado em: 4 de fevereiro de 2015.
- 465 REIS A.; BOITEUX, LS. 2008. Novas Espécies Hospedeiras de *Alternaria brassicae* na  
466 Família Brassicaceae no Brasil. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças, 8p (Boletim de  
467 Pesquisa e Desenvolvimento, 46).
- 468 REIS A.; BOITEUX, LS. 2010. *Alternaria* especies infecting Brassicaceae in the  
469 Brazilian neotropics: geographical distribution, and host range specificity. *Journal of*  
470 *Plant Pathology* 92: 661-668.
- 471 REIS A.; BRUNE, S.; MIZUBUTI ESG. 2002. Pinta-preta da batata. *Batata Show -*  
472 *Associação Brasileira da Batata*. Disponível em:  
473 [http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista04\\_022.htm](http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista04_022.htm). Acessado em: 26 de  
474 setembro de 2014.
- 475 RODRIGUES TTMS. 2009. *Morphological, molecular characterization, and inference*  
476 *about recombination, for species of Alternaria related to early blight of potato and*  
477 *tomato*. Viçosa: UFV. 78p (Tese doutorado).
- 478 SAS INSTITUTE. 2008. *SAS/STAT software: changes and enhancements through*  
479 *release 9.2*. Cary: Statistical Analysis System Institute.
- 480 SIMMONS, E. G. 2007. *Alternaria: An Identification Manual*. Netherlands: CBS  
481 Fungal Biodiversity Centre, 775p.
- 482 STRANDBERG JO. 1992. *Alternaria* Species that Attack Vegetable Crops: Biology  
483 and Options for Disease Management. In: CHELKOWSKI J; VISCONTI A (eds).  
484 *Alternaria Biology, Plant Disease and Metabolites*. London: Elsevier, p.175-208.
- 485 TAVARES GM; SOUZA PE. 2005. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de  
486 *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro  
487 (*Carica papaya l.*). *Ciência e Agrotecnologia* 29: 52-59.
- 488 TOFOLI, JG; DOMINGUES, RJ; GARCIA-JUNIOR O; KUROZAWA, C. 2003.  
489 Controle da pinta preta por fungicidas e seus impactos na produção. *Summa*  
490 *Phytopathologica* 29: 225-233.
- 491 TOFOLI, JG; DOMINGUES, RJ. 2004. *Alternarioses em hortaliças: sintomatologia,*  
492 *etiologia e manejo integrado*. São Paulo: Instituto Biológico 23-33 (Divulgação  
493 Técnica, 66).
- 494 VAN DEN BERG N; AVELING TAS; VENTER SL. 2002. The evaluation of six  
495 fungicides for reducing *Alternaria cassiae* on cowpea seed. *Crop Protection* 21: 501-  
496 50.
- 497 VIANA FMP; SANTOS, AA.; FREIRE, FCO; CARDOSO, JE; VIDAL, JC. 2001.  
498 Recomendações para o Controle das Principais Doenças que Afetam a Cultura do  
499 Melão na Região Nordeste. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical 47-55  
500 (Circular técnica 12).

501

502

503

504

505

506

507 Tabela 1. Isolados de *Alternaria* utilizados na avaliação da gama de hospedeiras

<b>Código do isolado</b>	<b>Hospedeiro de origem</b>	<b>Identificação baseada em caracterização molecular e morfológica</b>
EH679-MG	<i>Solanum melongena</i>	<i>Alternaria grandis</i>
EH1143-RS	<i>S. lycopersicum</i>	<i>A. dauci</i>
EH1210-PR	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Alternaria</i> sp.
EH1214-DF	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Alternaria</i> sp.
EH1252-SP	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Alternaria</i> sp.
EH1377-CE	<i>S. lycopersicum</i>	<i>A. mimicula</i>
EH1548-DF	<i>S. tuberosum</i>	<i>A. grandis</i>
EH1642-BA	<i>S. lycocarpum</i>	<i>A. solani</i>
EH1654-DF	<i>N. physaloides</i>	<i>Alternaria</i> sp.
EH1738-DF	<i>Datura</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
EH1823-CE	<i>S. lycopersicum</i>	<i>A. tomatophila</i>
EH2113-DF	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Alternaria</i> sp.

508 EH, Embrapa Hortaliças; BA, Bahia; CE, Ceará; DF, Distrito Federal; MG, Minas Gerais; PR, Paraná; RS, Rio  
509 Grande do Sul; SP, São Paulo.

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526 Tabela 2. Patogenicidade de isolados de *Alternaria* a diferentes espécies cultivadas e  
 527 não cultivadas de solanáceas

Hospedeiras								
Isolados	Hospedeiro de origem	Tomateiro ( <i>S. lycopersicum</i> )	Batateira ( <i>S. tuberosum</i> )	Pimentão ( <i>C. annuum</i> )	Berinjela ( <i>S. melongena</i> )	Jiló ( <i>S. jilo</i> )	<i>D. stramonium</i>	<i>Physales sp.</i>
EH1143-RS	<i>S. lycopersicum</i>	+	-	-	-	-	-	-
EH1210-PR	<i>S. lycopersicum</i>	+	-	NA	NA	NA	NA	NA
EH1214-DF	<i>S. lycopersicum</i>	+	-	-	-	-	-	+
EH1252-SP	<i>S. lycopersicum</i>	+	+	-	-	-	-	+
EH1377-CE	<i>S. lycopersicum</i>	+	-	-	-	-	-	-
EH2113-DF	<i>S. lycopersicum</i>	+	+	-	-	-	+	+
EH1548-DF	<i>S. tuberosum</i>	+	+	-	-	+	-	-
EH679-MG	<i>S. melongena</i>	+	+	-	-	+	+	-
EH1642-BA	<i>S. lycocarpum</i>	+	+	-	+	+	+	+
EH1654-DF	<i>N. physalodes</i>	+	-	-	-	-	-	-
EH1738-DF	<i>Datura sp.</i>	+	+	-	-	+	+	-
EH1823-CE	<i>S. lycopersicum</i>	+	+	NA	NA	NA	NA	NA

528 EH, Embrapa Hortaliças; BA, Bahia; CE, Ceará; DF, Distrito Federal; MG, Minas Gerais; RS, Rio Grande do Sul; SP, São  
 529 Paulo. (+) presença de sintomas; (-) ausência de sintomas, NA não avaliado.

530

531

532

533 Tabela 3. Concentração (mg.L<sup>-1</sup>) de tebuconazole para inibir em 50% (CE<sub>50</sub>) o  
 534 crescimento micelial *in vitro* de espécies de *Alternaria* oriundas de tomateiro

Isolado	Clado a que o isolado pertence de acordo com a filogenia da região Alt a 1	CE <sub>50</sub>	
		Experimento 1	Experimento 2
EH742- MG	<i>A. tomatophila</i>	0,0382	0,0410
EH1122- SC	<i>A. tomatophila</i>	1,7664	0,0133
EH1209- PR	<i>A. tomatophila</i>	0,8346	0,1576
EH1261- DF	<i>A. tomatophila</i>	1,9224	7,4331
EH1435- SP	<i>A. tomatophila</i>	0,1713	0,8509
EH1534- DF	<i>A. tomatophila</i>	0,0025	0,0002
EH1672- MG	<i>A. tomatophila</i>	3,6503	6,7855
EH1674- RS	<i>A. tomatophila</i>	0,0110	1,6011
EH1707- TO	<i>A. tomatophila</i>	0,1120	1,7133
EH1792- RJ	<i>A. tomatophila</i>	0,0604	0,0006
EH1799- DF	<i>A. tomatophila</i>	0,0333	2,1332
EH1823- CE	<i>A. tomatophila</i>	0,9494	0,1113
EH1835- SP	<i>A. tomatophila</i>	1,9706	1,3514
EH1892- GO	<i>A. tomatophila</i>	0,0391	0,0464
EH1903- DF	<i>A. tomatophila</i>	2,3688	4,5656
EH1911- DF	<i>A. tomatophila</i>	2,1495	5,1676
EH1912- DF	<i>A. tomatophila</i>	2,0387	1,4035

535 EH, Embrapa Hortaliças; DF, Distrito Federal; GO, Goiás; MG, Minas Gerais; PR, Paraná; RJ, Rio de Janeiro; RS,  
 536 Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SP, São Paulo; TO, Tocantins.

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546 Tabela 4. Concentração (mg.L<sup>-1</sup>) de tebuconazole para inibir em 50% (CE<sub>50</sub>) o  
 547 crescimento micelial *in vitro* de espécies de *Alternaria* oriundas de batateira.

Isolados	Clado a que o isolado pertence de acordo com a filogenia da região Alt a 1	CE <sub>50</sub>	
		Experimento 1	Experimento 2
EH643- BA	<i>A. grandis</i>	0,0747	0,0451
EH694- DF	<i>A. grandis</i>	1,2844	0,8937
EH1180- PR	<i>A. grandis</i>	0,0304	0,0771
EH1182- PR	<i>A. grandis</i>	1,1482	0,0328
EH1183- PR	<i>A. grandis</i>	0,0625	0,0039
EH1233- PR	<i>A. grandis</i>	0,0241	0,0308
EH1249- RS	<i>A. grandis</i>	0,0819	0,0087
EH1266- DF	<i>A. tomatophila</i>	0,0152	0,0013
EH1336- DF	<i>A. grandis</i>	0,0026	0,0040
EH1548- DF	<i>A. grandis</i>	0,1770	0,0359
EH1549- DF	<i>A. tomatophila</i>	2,1627	1,5448
EH1712- GO	<i>A. grandis</i>	0,0310	0,1123
EH1802- SP	<i>A. grandis</i>	0,4387	1,5494

548 EH, Embrapa Hortaliças; BA, Bahia; DF, Distrito Federal; GO, Goiás; PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; SP, São  
 549 Paulo.

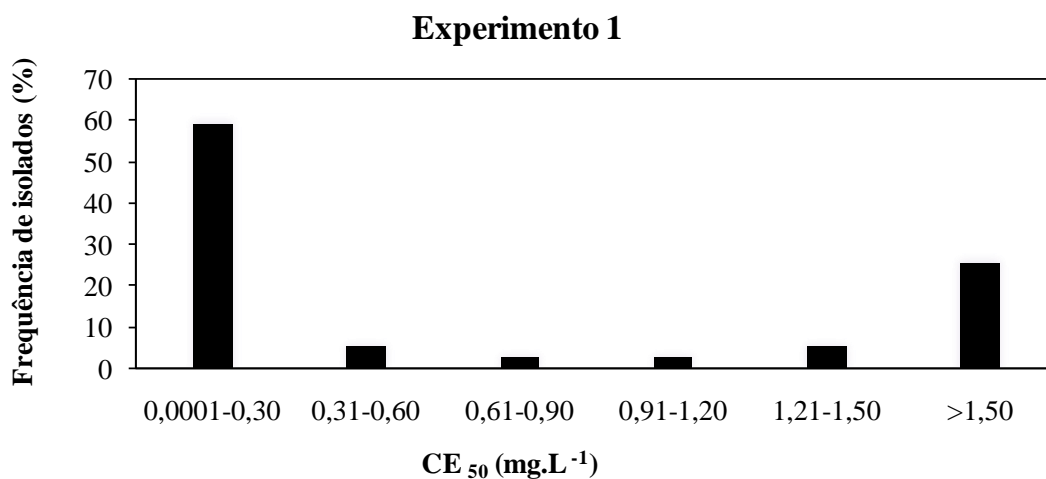
550  
 551  
 552  
 553  
 554  
 555  
 556  
 557  
 558  
 559  
 560  
 561  
 562

563 Tabela 5. Concentração (mg.L<sup>-1</sup>) de tebuconazole para inibir em 50% (CE<sub>50</sub>) o  
 564 crescimento micelial *in vitro* de espécies de *Alternaria* oriundas de solanáceas.

Isolado	Hospedeiro de origem	Clado a que o isolado pertence de acordo com a filogenia da região Alt a 1	CE <sub>50</sub>	
			Experimento 1	Experimento 2
EH7-DF	<i>Nicandra physalodes</i>	<i>A. grandis</i>	0,4459	0,5555
EH679-DF	<i>Solanum melongena</i>	<i>A. grandis</i>	0,0060	0,0116
EH680-BA	<i>S. melongena</i>	<i>A. tomatophila</i>	0,0015	0,0027
EH1509-DF	<i>S. melongena</i>	<i>A. grandis</i>	0,0476	0,0630
EH1642-BA	<i>S. lycocarpum</i>	<i>A. tomatophila</i>	3,6885	0,4575
EH1643-BA	<i>S. lycocarpum</i>	<i>A. tomatophila</i>	0,1419	0,6608
EH1952- SC	<i>Solanum</i> sp.	<i>A. tomatophila</i>	0,0033	0,0412
EH2116-DF	<i>N. physalodes</i>	<i>A. grandis</i>	0,0095	0,0431
EH2117-DF	<i>N. physalodes</i>	<i>A. grandis</i>	1,3434	3,2308

565 EH, Embrapa Hortaliças; BA, Bahia; DF, Distrito Federal; SC, Santa Catarina.

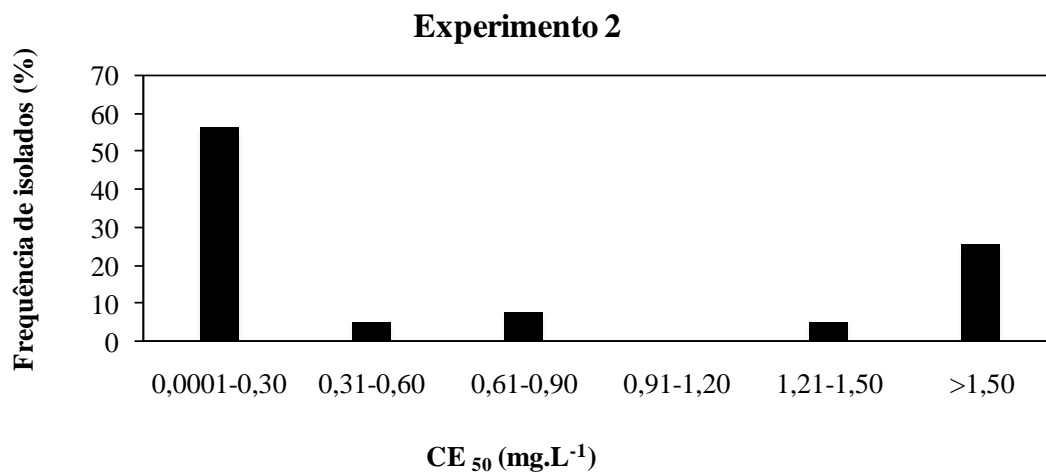
566  
 567  
 568  
 569  
 570  
 571  
 572  
 573  
 574  
 575  
 576  
 577  
 578  
 579  
 580  
 581  
 582  
 583  
 584



585

586

587



588

589

590 Figura 1. Distribuição de frequência de isolados em faixas de concentrações efetivas de  
 591 tebuconazole para inibir em 50% (CE<sub>50</sub>) o crescimento micelial *in vitro* de espécies de  
 592 *Alternaria* oriundas de solanáceas.



## CONCLUSÕES GERAIS

- As espécies *A. tomatophila* e *A. grandis* continuam prevalecendo como os principais agentes etiológicos da pinta-preta em tomateiro e batateira, respectivamente, no Brasil;
- As espécies fúngicas *A. dauci* e *A. mimicula* foram reportadas pela primeira vez causando pinta-preta em tomateiro no Brasil, indicando que, nesta hortaliça, a doença apresenta uma etiologia mais complexa;
- No presente estudo, tanto pimentão (*Capsicum annuum*) quanto berinjela se mostraram como não-hospedeiras de isolados advindos de tomateiro e batateira;
- Um isolado de berinjela (classificado como *A. grandis*) foi capaz de infectar (unidirecionalmente) tomate e batata, mas não o acesso de berinjela empregado;
- As solanáceas invasoras *Nicandra physaloides*, *Datura stramonium* e *Physalis* spp. constituem-se em potenciais fontes de inóculo de espécies de *Alternaria* patogênicas para solanáceas cultivadas;
- Um isolado classificado como *Alternaria solani* foi encontrado causando pinta-preta em lobeira (*S. lycocarpum*) em Ibicoara-BA, na Chapada Diamantina, importante região produtora de batata;
- O isolado de *A. solani*, coletado de lobeira (planta nativa do Cerrado brasileiro), apresentou o mais amplo círculo de plantas hospedeiras, infectado todas as espécies avaliadas exceto o pimentão;
- Não foram detectados isolados insensíveis ou com baixa sensibilidade ao Tebuconazole, sendo que o mesmo continua apresentando alto potencial de uso para o controle de *Alternaria* em solanáceas.