

CARINE REZENDE CARDOSO

***Agressividade de Alternaria tomatophila,*
*A. grandis e A. solani em Batateira e Tomateiro***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

T

C268a
2010

Cardoso, Carine Rezende, 1984-
Agressividade de *Alternaria tomatophila*, *A. grandis* e
A. solani em batateira e tomateiro / Carine Rezende
Cardoso - Viçosa, MG, 2010
xi, 43f. : il. ; 29cm.

Orientador: Eduardo Serti Gomide Mizubuti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 39-43

1. Batata - Doenças e pragas 2. Tomate - Doenças e
pragas. 3. Epidemiologia. 4. *Alternaria tomatophila*.
5. *Alternaria grandis*. 6. *Alternaria solani*. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22 ed. 632.4

CARINE REZENDE CARDOSO

Agressividade de *Alternaria tomatophila*,
A. grandis e *A. solani* em Batateira e Tomateiro

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

APROVADA: 12 de fevereiro de 2010.



Prof. Luiz Antonio Maffia
(Co-orientador)




Prof. Robert Weingart Barreto
(Co-orientador)



Prof. Sérgio H. Brommonschenkel



Prof. Paulo C. R. Fontes



Prof. Eduardo S. G. Mizubuti
(Orientador)

*"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".*

(Fernando Pessoa)

Aos meus pais Aloísio e Maria das Graças

Aos meus irmãos Luciana, Adriano, Rodrigo e Priscila

Aos meus sobrinhos Rafael e Lucas

Ao meu noivo Tales

Aos meus familiares e à “família BIOPOP”

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre está iluminando o meu caminho.

Aos meus pais Aloísio Cardoso e Maria das Graças Cardoso, pelo exemplo de vida, dedicação e pelo grande incentivo.

Aos meus irmãos Ná, Diano, Didigo e Pri, pelos momentos compartilhados, pelas madrugadas e dias ensolarados que passamos na casa de vegetação e por estarem sempre presente em cada novo desafio pelo qual passo.

Ao meu noivo Tales Moreira, pela presença, amor e compreensão. Obrigado por sempre estar ao meu lado me apoiando.

Aos meus tios, tias, primos e primas pelo apoio e incentivo.

As minhas amigas de longos anos, Tininha e Delma, pelo carinho e animação.

Ao professor Eduardo Mizubuti, pela orientação, paciência, dedicação, amizade, jamais esquecerei seus conselhos e puxões de orelha.

Ao professor Maffia, pela disponibilidade, sugestões e apoio nas análises estatísticas.

Ao professor Robert Barreto, por disponibilizar a casa de vegetação, a área experimental da Clínica de Doenças de Plantas para a realização de parte do experimento e pelas sugestões proferidas na defesa.

Ao professor Sérgio Brommonschenkel, por disponibilizar espaço para o plantio das minhas plantas de tomate e batata, pela atenção e sugestões proferidas na defesa,

Ao professor Paulo Fontes, pela atenção, zelo e sugestões para o trabalho.

As amigas da graduação, Aline e Adriana, pelo incentivo, animação, ajuda e companheirismo.

Aos amigos da turma do mestrado, pelo carinho, companhia e ajuda.

As minhas amigas especiais, Rafaela, Fumiko e Larissa, pelos momentos compartilhados, pela força, por transformar momentos tristes e de desesperos em momentos alegres, pelas noites de trabalho e estudos. O mestrado não teria sido o mesmo sem vocês.

Aos irmãos mais velhos da família BIOPOP, Valdir, Tatiana, Chris e André, pelo carinho e apoio. Vocês foram importantes para meu processo de amadurecimento profissional.

Aos irmãos mais novos do BIOPOP e pelos que aqui já passaram, Braz, Camila, Carlos, Edlene, Lahyre, Saulo, Robson, Sarah, Líllian, Claudiney, Áquila e Fabiana, pelo carinho e companheirismo.

Aos meus afilhados (estagiários), Leo e Ramirez, pela ajuda, disponibilidade, carinho, companheirismo e paciência.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Bruno, Camilo, Sara, Rita, Braz, pela disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários da casa de vegetação, Dagoberto, Delfim, “Fizim”, Célio e outros, pela atenção, carinho e ajuda.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos.

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia por contribuir com minha formação profissional e pela oportunidade.

À CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

CARINE REZENDE CARDOSO, filha de Aloísio de Castro Cardoso e Maria das Graças Pereira Cardoso, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 08 de junho de 1984.

Em março de 2003 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em 25 de Janeiro de 2008. Durante a graduação executou trabalhos na área de fitopatologia, no Departamento de Fitopatologia.

Em março de 2008 iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia, na mesma Instituição, submetendo-se à defesa de dissertação em 12 de Fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Agentes causais da pinta preta da batateira e do tomateiro: <i>Alternaria solani</i> , <i>A. grandis</i> e <i>A. tomatophila</i>	4
2.2. As culturas e a doença	6
2.3. Variabilidade patogênica de <i>A. solani</i> e componentes de agressividade	7
2.4. A influência de variáveis climáticas no desenvolvimento da pinta preta	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Isolados de <i>Alternaria</i> spp. e produção de inóculo	12
3.2. Área das lesões causadas por isolados de <i>Alternaria</i> spp. em batateira e tomateiro em diferentes temperaturas	13
3.3. Crescimento micelial de isolados de <i>Alternaria</i> spp. em diferentes temperaturas	14
3.4. Frequência de infecção e período de incubação em batateira e tomateiro em diferentes durações do período de molhamento foliar	15
3.5. Delineamento Experimental e Análises Estatísticas	16
4. RESULTADOS	18
4.1. Área das lesões causadas por isolados de <i>Alternaria</i> spp. em batateira e tomateiro em diferentes temperaturas	18
4.2. Crescimento micelial de isolados de <i>Alternaria</i> spp. em diferentes temperaturas	21
4.3. Efeito do período de molhamento foliar sobre a agressividade de isolados de <i>Alternaria</i> spp. em tomateiro e batateira	22
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES GERAIS	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

CARDOSO, Carine Rezende, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Agressividade de *Alternaria tomatophila*, *A. grandis* e *A. solani* em batateira e tomateiro.** Orientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Co-orientadores: Luiz Antonio Maffia e Robert Weingart Barreto.

A pinta preta é uma das principais doenças da batateira e do tomateiro. No Brasil, a doença foi reportada ser causada por *Alternaria solani*, no entanto, recentemente, constataram-se as espécies *A. grandis* e *A. tomatophila* associadas à pinta preta em batateira e em tomateiro, respectivamente. Por se tratarem de espécies recentemente relatadas no Brasil, estudos relativos à especificidade por hospedeiro e requerimentos ecológicos ainda não foram realizados. Em outros países, há evidência de especificidade em populações de *Alternaria* spp., principalmente de *A. solani*, possivelmente em decorrência de diferenças de agressividade de indivíduos. No presente estudo quantificaram-se os efeitos de variáveis climáticas nos componentes epidemiológicos: área da lesão (AL), área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM), frequência de infecção (FI) e período de incubação (PI) associadas aos isolados de *Alternaria* spp. Estudaram-se 11 isolados de *Alternaria* spp.: 6 isolados de *A. grandis*, 4 de *A. tomatophila* e 1 de *A. solani*, inoculados em batateira e tomateiro. Quantificaram-se os efeitos da temperatura sobre o crescimento micelial (15, 22, 25, 30 e 35 °C) e AL (18, 22, 25 e 30 °C) e os efeitos da duração do período de molhamento foliar (PMF) (2, 4, 8, 12, 24 h) sobre a FI e PI causados por *Alternaria* spp. Maiores valores de AL, FI e menores valores de PI foram observados em batateira, independentemente dos isolados inoculados. A alta suscetibilidade da cultivar de batata 'Opaline' e o estágio fenológico o qual as plantas foram inoculadas, interferiram no resultado. A temperatura influenciou a AL de forma diferenciada conforme a combinação espécie - hospedeiro. Os isolados de *A. grandis*, *A. solani* e *A. tomatophila*, causaram maior AL em seus hospedeiros de origem; *A. grandis* foi mais agressivo que *A. solani* em batateira. Em batateira, maior AL associada a *A. grandis* e *A. solani* ocorreu tanto em temperaturas baixas como a 30 °C, mas 25 °C foi a temperatura ótima para AL associada a todas as espécies. A temperatura afetou o crescimento micelial de *Alternaria* spp. Maior crescimento foi constatado para isolados de *A. grandis*. A temperatura ótima para crescimento micelial de *A. grandis*, *A. solani* e *A. tomatophila*

foi 24, 24 e 26 °C, respectivamente. A FI foi afetada pelo PMF, porém o efeito variou conforme a combinação espécie - hospedeiro. Os valores de FI foram semelhantes para todas as espécies, porém sob condições limitantes de 2 h de PMF, maiores valores de FI foram verificados para *A. grandis* em batateira. Em tomateiro, os valores de FI foram semelhantes para todos os isolados de *Alternaria* spp. No experimento realizado durante o inverno, não foram observados sintomas da doença em tomateiros inoculados com *A. solani* e houve desenvolvimento mais lento da pinta preta. Poucas diferenças foram verificadas em relação ao PI dos isolados de *Alternaria* spp., em ambos os hospedeiros, sob diferentes PMF. Há evidências de preferência ao hospedeiro em populações brasileiras de *Alternaria* spp. associadas à pinta preta em batateira e tomateiro apesar de *A. grandis* e *A. tomatophila* poderem causar doença em ambos hospedeiros.

ABSTRACT

CARDOSO, Carine Rezende, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2010. **Aggressiveness of *Alternaria tomatophila*, *A. grandis* and *A. solani* in potato and tomato.** Adviser: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Co-Adviser: Luiz Antonio Maffia and Robert Weingart Barreto.

Early Blight is an important disease of potato and tomato crops worldwide. In Brazil, *Alternaria solani* was considered the only causal agent of early blight. Recently, *A. grandis* and *A. tomatophila* were found to be the main species associated with early blight in potato and tomato, respectively. Due to the novelty of these findings no studies about host specificity and ecological requirements were conducted yet. In other countries, there is evidence of host specificity in populations of *Alternaria* spp., including of *A. solani*, caused or largely influenced by differences in aggressiveness. In the current study, we quantified the effects of the main climatic variables on the following epidemiological variables: lesion area (LA), area under the curve of mycelial growth (AUCMG), infection frequency (IF), and incubation period (IP). Eleven isolates of *Alternaria* spp were studied: 6 isolates of *A. grandis*, 4 of *A. tomatophila* and 1 of *A. solani* were inoculated in potato and tomato plants. The effects of temperature on mycelial growth (15, 22, 25, 30, and 35 °C) and LA (18, 22, 25, and 30 °C) and the effects of duration of leaf wetness period (DLW) (2, 4, 8, 12, and 24 h) on IF and IP of *Alternaria* spp were assessed. Higher values of LA, IF and lower values of IP were observed in potato, regardless of the isolates. The higher susceptibility of potato 'Opaline' and the phenological stage at which the plants were inoculated influenced this result. Temperature differentially affected LA depending on the species x host combination. *A. grandis*, *A. solani* and *A. tomatophila*, caused higher LA in the original hosts. *A. grandis* was more aggressive than *A. solani* in potato and caused higher LA at low temperature and at 30°C, but the optimum temperature for LA for all species was 25°C. Mycelial growth of *Alternaria* spp. was affected by temperature. The highest growth was found for *A. grandis*. The optimum temperature for *A. grandis*, *A. solani*, and *A. tomatophila* was 24, 24, and 26 °C, respectively. The IF was affected by the DLW, but the effect varied according to the species x host combination. The values of IF were similar for all species in most DLW. However, under limiting conditions of 2 h of DLW in potato, *A. grandis* had higher IF values than *A. solani* and *A. tomatophila*. In tomato, similar IF values were recorded for all isolate of *Alternaria* spp. In the fall

experiment no symptoms were observed in tomato plants inoculated with *A. solani* and the development of early blight was slower than in the summer experiment. There is evidence of host preference in the Brazilian populations of *Alternaria* spp. associated with early blight in potato and tomato, even though *A. grandis* and *A. tomatophila* can cause disease in both hosts.

1. INTRODUÇÃO

A pinta preta, uma das principais doenças foliares das culturas da batateira (*Solanum tuberosum* L.) e do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (Guenther *et al.*, 1999, Shuman & Christ, 2005, Mantecón, 2007), era atribuída ser causada pelo fungo mitosporico *Alternaria solani* Sorauer (Rotem, 1994). Entretanto, em 2000, Simmons descreveu uma nova espécie, *A. tomatophila* Simmons, cujos indivíduos eram comumente associados à pinta preta em tomateiro (Simmons, 2000). Nos Estados Unidos, epidemias de pinta preta em tomateiro e batateira são causadas por espécies distintas de *Alternaria*: *A. solani* em batateira e *A. tomatophila* em tomateiro (Simmons, 2000). Posteriormente, confirmou-se haver diferenças morfológicas e culturais entre as espécies causadoras de pinta preta em batateira e tomateiro e haver preferência por hospedeiros (Frazer & Zitter 2003).

No Brasil, nenhum estudo taxonômico detalhado havia sido realizado com as populações de *Alternaria* spp. associadas à pinta preta em seus principais hospedeiros, batateira e tomateiro. Contudo, semelhantemente ao realizado em outros países (Bonde, 1929, Henning & Alexander, 1959), constatou-se, baseado em evidências culturais, patogênicas e moleculares, haver diferenças entre as populações brasileiras de *A. solani* que afetam batateira e tomateiro (Fancelli, 1991, Castro *et al.*, 2000, Martínez *et al.*, 2004). Isolados de *A. solani* oriundos do tomateiro formaram um grupo distinto daqueles oriundos de batateira (Castro *et al.*, 2000, Martínez *et al.*, 2004).

Recentemente, demonstrou-se haver populações distintas de *Alternaria* spp. associadas à pinta preta em batateira e tomateiro (Lourenço Jr. *et al.*, 2009; Rodrigues, 2009). Empregaram-se vários marcadores moleculares e técnicas analíticas de genética de populações e constatou-se que a pinta preta em tomateiro é causada, predominantemente, pelas espécies *A. tomatophila* Simmons e *A. cretica* Simmons (Rodrigues, 2009), enquanto a espécie mais comumente associada à pinta preta em batateira é *A. grandis* Simmons (Rodrigues, 2009). Curiosamente, não se detectaram isolados de *A. solani* causando pinta preta nas culturas hospedeiras.

Apesar de haver associação da população do patógeno com as espécies hospedeiras, a especificidade não é completa; isto é, isolados das espécies que afetam tomateiro podem infectar batateira e isolados de *A. grandis*, que afetam batateira, podem causar doença em tomateiro (Rodrigues, 2009). Isolados de *A. tomatophila*

foram mais agressivos que isolados de *A. solani* quando inoculados em folhas, pecíolos e caules de tomateiro (Frazer & Zitter, 2003). No Brasil, diferenças de agressividade em função da combinação espécie – hospedeiro ainda não foram quantificadas. Como a especificidade não é absoluta, acredita-se que diferenças de agressividade possam explicar a associação de espécies de *Alternaria* com o hospedeiro, pois como explicar a ocorrência de espécies distintas de *Alternaria* causando pinta preta em tomateiro e batateira se cultivos destas olerícolas são comumente implantados numa mesma microrregião? Uma hipótese seria: A preferência por hospedeiro ocorre por diferenças de agressividade das espécies.

Diferenças quanto à agressividade dos isolados são postuladas ser importantes para permitir a separação das populações. Por exemplo, no caso da requeima, outra doença da batateira e tomateiro, causada por *Phytophthora infestans*, determinou-se que a associação das linhagens clonais do patógeno com hospedeiros pode ser explicada, ao menos em parte, por diferenças de agressividade dos isolados quando inoculados nas plantas hospedeiras (Suassuna *et al.*, 2004). A não identificação de isolados de *A. solani* no Brasil pode ter como uma possível explicação o fato de as espécies prevalentes serem mais agressivas em plantas hospedeiras do que *A. solani*. Entretanto, até o momento, não se conduziram estudos para mensurar estas eventuais diferenças de agressividade entre isolados brasileiros de *Alternaria* spp. que causam pinta preta.

A agressividade é definida pela quantidade de doença produzida em uma dada interação patógeno - hospedeiro suscetível (Andrison, 1993). Para estimá-la muitas vezes se separam e se quantificam os elementos de características quantitativas do ciclo de vida do patógeno (Parioud *et al.*, 2009). Estas características são referidas como componentes de agressividade e são utilizados na quantificação da variabilidade patogênica das populações. Os componentes de agressividade correspondem aos componentes epidemiológicos, sendo os mais comumente quantificados, o período latente, período de incubação, área abaixo da curva, taxa de expansão da lesão, área da lesão e frequência de infecção (Carlisle *et al.*, 2002, Suassuna *et al.*, 2004, Chacón *et al.*, 2007).

Além de eventuais diferenças quanto aos componentes epidemiológicos associados à agressividade, é possível também que haja respostas diferenciadas das espécies de *Alternaria* a variáveis ambientais e que estas possam afetar a preferência por hospedeiros. No Brasil, tomateiros são cultivados em condições climáticas amplas

enquanto os cultivos de batateira estão concentrados em regiões de altitude, em geral, acima de 800 m. A presença de “ecótipos”, ou raça ecológica, ou seja, populações ecologicamente distintas e que estão estritamente sujeitas a eventos periódicos de seleção (Ward *et al.*, 2008), poderia explicar a distribuição das espécies e se as epidemias por elas causadas respondem de forma similar ao conhecido para *A. solani*. É importante avaliar se as *Alternaria* spp. diferem entre si em relação a requerimentos ecológicos.

A hipótese testada nesse trabalho é que não há especificidade de espécies de *Alternaria* à cultura do tomateiro e da batateira. A partir dessa hipótese, os objetivos do trabalho foram:

i- caracterizar a agressividade de isolados de *Alternaria* spp. em batateira e tomateiro por meio de componentes epidemiológicos,

ii- investigar a especificidade de isolados de *Alternaria* spp. à cultura do tomateiro e da batateira e

iii- quantificar o efeito das variáveis temperatura e duração do período de molhamento foliar sobre componentes epidemiológicos de *Alternaria* spp. oriundos da batateira e do tomateiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agentes causais da pinta preta da batateira e do tomateiro: *Alternaria solani*, *A. grandis* e *A. tomatophila*

Até recentemente, a pinta preta da batateira (*Solanum tuberosum* L.) e do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), principais hortaliças cultivadas no Brasil (AGRIANUAL, 2008), era atribuída ser causada pelo fungo mitospórico *Alternaria solani* Sorauer (Rotem, 1994). Entretanto, em 2000, o Dr. Emory G. Simmons, por meio de análise morfológica e cultural, descreveu uma nova espécie, *A. tomatophila* Simmons cujos indivíduos eram comumente associados à pinta preta em tomateiro (Simmons, 2000). No levantamento, por ele realizado foi verificado que as populações de *A. solani* estão predominantemente associadas à pinta preta em batateira (Simmons, 2000). Estudo posterior realizado por Frazer & Zitter (2003), confirmou as diferenças morfológicas e culturais relatadas por Simmons concluindo que a pinta preta é causada por ao menos duas espécies de *Alternaria*.

Estudos recentes realizados no Brasil demonstraram haver fortes evidências de ocorrência de populações distintas de *Alternaria* spp. associadas à pinta preta em batateira e tomateiro (Lourenço Jr. *et al.*, 2009). Mais de 100 isolados de diferentes regiões foram avaliados e empregaram-se vários marcadores moleculares e técnicas analíticas de genética de populações para estudar estas populações mais detalhadamente. Constatou-se que a pinta preta em tomateiro é predominantemente causada por indivíduos das espécies *A. tomatophila* Simmons e *A. cretica* Simmons (Rodrigues, 2009), enquanto a espécie mais prevalente em batateira é *A. grandis* Simmons (Rodrigues, 2009). Curiosamente, não se detectaram isolados de *A. solani* causando pinta preta em tomateiro ou em batateira.

O gênero *Alternaria*, pertence ao grupo dos fungos mitospóricos. A determinação taxonômica de espécies de *Alternaria* é baseada principalmente na morfologia dos conídios. As espécies são caracterizadas pela formação de conídios multicelulares, grandes, com septos longitudinais e transversais, ovóides ou obclavados, escuros e com bicos filamentosos (Simmons, 1997).

Conídios jovens de *A. solani* são hialinos, alongados ou ovóides e têm de 3 a 6 septos. Os conídios maduros são lisos e tipicamente marrons, a forma pode variar de

longos a curtos, de largos a estreitos, possuem de 10 a 11 septos transversais e de 1 a 2 septos longitudinais. Na população de *A. solani* predominam conídios com um bico, seguido por aqueles que têm dois e raramente ocorrem conídios com três bicos (Simmons, 2000).

Para *A. tomatophila*, o corpo dos conídios é ovóide, longo, podendo ser elipsóide. Quando maduros, os conídios possuem de 8 a 15 septos transversais e de 1 a 2 longitudinais (Simmons, 2000). Muitos apresentam três, quatro e até cinco bicos, o que é raro em *A. solani* (Frazer, 2002).

Na espécie *A. grandis*, os conídios são largos e diferem de *A. solani* pelo seu padrão de esporulação, forma conidial, tamanho e número de bico (Simmons, 2000). No trabalho de morfologia realizado recentemente no Brasil verificou-se que isolados de *A. grandis* produzem conídios solitários, multiseptados, de coloração marrom, elipsóide com uma dilatação no meio do corpo e possuem 1 bico (Rodrigues, 2009).

Apesar de já terem sido realizados estudos de caracterização morfológica, cultural e estudos moleculares das novas espécies de *Alternaria*, até 2000 somente *A. solani* era considerada como agente causal da pinta preta em tomateiro e em batateira. No Brasil, o primeiro relato de ocorrência das novas espécies ocorreu em 2009 (Rodrigues, 2009). Conseqüentemente, pouca são as informações sobre a biologia dessas espécies e sobre as epidemias de pinta preta que causam.

O gênero *Alternaria* é um táxon grande, diversificado e de grande importância econômica (Rotem, 1994). O fungo, mais especificamente, *A. solani*, pode sobreviver em restos de cultura, sobretudo devido à presença de clamidósporos (Patterson, 1991) e em outros hospedeiros, como a berinjela e o jiló (Fancelli, 1991). A penetração do patógeno no hospedeiro pode ser direta ou indireta através dos estômatos e ferimentos. Normalmente, os sintomas são manifestados, entre três a cinco dias após a penetração (Jones, 1991; Rotem, 1994).

Para entender o sucesso destes fungos como patógenos, é importante conhecer as características que favorecem a patogenicidade e sua distribuição (Strandberg, 1992). A utilização de características morfológicas, moleculares em estudos com *Alternaria* spp. que causam pinta preta já foram realizados, no entanto há necessidade de correlacionar essas características com as características epidemiológicas das espécies para que sejam diferenciadas quanto à agressividade.

2.2. As culturas e a doença

Entre as principais hortaliças cultivadas no Brasil destacam-se o tomateiro e a batateira (AGRIANUAL, 2008). Em 2008, foram produzidas aproximadamente três milhões de toneladas de tomate, em uma área de 57,6 mil ha, o que fez com que o Brasil fosse o sexto produtor mundial desta hortaliça (AGRIANUAL, 2008). A produção de batata foi de 3.671.116 toneladas numa área de 144.699 ha, alcançando produtividade média de 25.371 kg/ha (IBGE, 2008).

As culturas do tomateiro e da batateira são afetadas por várias doenças, que limitam a produtividade e cujos programas de manejo acarretam em aumentos dos custos de produção. Dentre as doenças foliares mais destrutivas, destaca-se a pinta preta (Van Der Walls *et al.*, 2004), causada por *Alternaria solani* Sorauer (Rotem, 1994) e, no caso do Brasil, também pelas espécies, *A. tomatophila* e *A. grandis* (Rodrigues, 2009), que causa perdas em praticamente todos os locais onde se cultivam tomateiro e batateira (Rotem 1994).

A doença pode ser observada em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, porém é mais severa em tecidos maduros e senescentes (Johnson & Teng, 1990; Dita Rodriguez *et al.*, 2006). Nestes, o patógeno causa lesões necróticas em folíolos, hastes, frutos ou tubérculos (Rotem, 1994). Independentemente da espécie causadora e do hospedeiro, os sintomas típicos observados são: no caule, lesões escuras levemente deprimidas, podendo apresentar-se de forma alongada e circulares, com anéis concêntricos bem evidentes; nos frutos, as lesões são deprimidas, escuras e concêntricas, podendo atingir grande extensão (Tokeshi & Carvalho, 1980; Jones, 1991). A alta severidade da doença causa a desfolha da planta, redução do rendimento e da qualidade dos frutos de tomateiro (Castro *et al.*, 2000).

A pinta preta é de difícil controle. O patógeno possui um ciclo de vida curto, apresentando vários ciclos de vida em apenas um ciclo da cultura, assim conídios secundários são produzidos nas plantas infectadas sendo rapidamente e facilmente disseminados, podendo chegar a longas distâncias (Strandberg, 1992).

Estudo realizado no Brasil demonstrou que as epidemias de pinta preta podem ocorrer em qualquer época do ano (Batista *et al.*, 2006). Porém, a doença é mais severa nas épocas de altas temperatura e umidade, condições em que é comum a destruição completa da lavoura caso não se implementem medidas de controle (Lopes & Santos, 1994; Salustiano, 2000). Para reduzir as perdas, o controle da pinta preta se baseia quase

que exclusivamente em aplicações intensivas de fungicidas (Guenther *et al.*, 1999, Töfoli *et al.*, 2003, Shuman & Christ, 2005, Mantecón, 2007), pois até o momento não existem cultivares comerciais de batateira ou tomateiro resistentes à doença e com boas características comerciais (Dita *et al.*, 2007) e, o controle biológico ainda não é aplicado em plantios comerciais. Estudos voltados à geração de conhecimentos para aumentar a eficácia do manejo da doença, como o uso racional de fungicida e o desenvolvimento de variedades resistentes são prementes. Dentre esses, destacam-se aqueles voltados à determinação da variabilidade patogênica e as possíveis diferenças epidemiológicas em população do patógeno.

2.3. Variabilidade patogênica de *A. solani* e componentes de agressividade

Do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética das populações é importante por determinar seu potencial de adaptação às condições adversas. Do ponto de vista epidemiológico, a variabilidade patogênica tem implicações diretas no manejo da doença. A maior agressividade dos isolados de um patógeno implica em maior consumo de fungicidas (Kato *et al.*, 1997) ou em revisão das estratégias de programas de melhoramento visando resistência à doença (McDonald & Linde, 2002).

Populações de *A. solani* possuem alta variabilidade genética (Van Der Walls *et al.*, 2004). Essa foi detectada em características morfológicas (Bonde, 1927; Bonde, 1929; Rotem, 1966; Rotem, 1994), fisiológicas (Bonde, 1927; Bonde, 1929; Rotem, 1966; Henning & Alexander, 1952; Henning & Alexander, 1959; Rotem, 1994), patogênicas (Higgins, 1952; Rotem, 1966; Henning & Alexander, 1952; Henning & Alexander, 1959; Rotem, 1994), moleculares (Martínez *et al.*, 2004, Lourenço Jr. *et al.*, 2009) e também nos grupos de compatibilidade vegetativa (Van Der Walls *et al.*, 2004).

Estudos anteriores, realizados em outros países, relataram variações quanto à agressividade de isolados de *A. solani* tanto oriundos de tomateiro (Bonde, 1929) quanto de batateira (Henning & Alexander, 1959). Pesquisas realizadas sobre populações brasileiras de *A. solani* também revelaram diferenças com relação à agressividade conforme o hospedeiro de origem do isolado (Fancelli, 1991; Castro *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2004). Fancelli (1991) observou diferença na agressividade de isolados de *A. solani* inoculados em tomateiros, entretanto foram utilizados isolados coletados de uma única região do país. Em trabalhos realizados por vários outros pesquisadores, não

necessariamente no Brasil, tais como: Weir *et al.*, (1998); Castro *et al.*, (2000); Martínez *et al.*, (2004) evidenciam a ocorrência de especialização a hospedeiros, uma vez que, isolados de *A. solani* oriundos de tomateiro formaram um grupo distinto daqueles oriundos de batateira.

Em um trabalho mais recente, com a descrição das novas espécies, verificou que isolados das espécies que afetam tomateiro podem infectar batateira e isolados de *A. grandis*, que afetam batateira, podem causar doença em tomateiro (Rodrigues, 2009), assim apesar de haver associação da população do patógeno com as espécies hospedeiras, a especificidade não é completa. Entretanto, o fato de não haver especificidade completa, não impede de haver certo grau de preferência por hospedeiro, possivelmente ocasionada por diferenças de agressividade dos indivíduos. Contudo, até o presente, são poucas as informações quanto à biologia de espécies de *Alternaria* que afetam batateira e tomateiro, principalmente com relação aos fatores de patogenicidade e agressividade (Rodrigues, 2009).

A agressividade definida pela quantidade de doença produzida em uma dada interação patógeno - hospedeiro suscetível (Andrivon, 1993), muitas vezes é separada em elementos de características quantitativas do ciclo de vida do patógeno (Pariaud *et al.*, 2009). Estas características referidas como componentes de agressividade são comumente mensuradas para avaliar a variabilidade do patógeno. Os componentes de agressividade correspondem aos componentes epidemiológicos, sendo os mais comumente quantificados, o período latente (PL), período de incubação (PI), área abaixo da curva, taxa de expansão da lesão, área da lesão e frequência de infecção (FI) (Carlisle *et al.*, 2002, Suassuna *et al.*, 2004, Chacón *et al.*, 2007). Para alguns patógenos, a capacidade de produção de toxinas é também avaliada como um dos componentes (Pariaud *et al.*, 2009). O PL é determinado pelo intervalo, em dias, entre a inoculação e a produção de esporos (Griffiths & Jones, 1987); O PI é determinado pelo número de horas entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas (Parlevliet, 1979). O PI é componente informativo, pois é possível inferir sobre os níveis de resistência das plantas. Por exemplo, uma cultivar suscetível tende a ter PI mais curto que uma cultivar resistente. Os componentes PL e PI já foram utilizados para a caracterização da variabilidade em espécies de *Alternaria* (Michereff *et al.*, 2003).

Outra variável potencialmente informativa é a área abaixo da curva de progresso da doença (Shaner & Finney, 1977). A área abaixo da curva integra a intensidade da

doença entre dois períodos de tempo, sendo utilizada para sumarizar a curva de progresso (Campbell & Madden, 1990). O tamanho inicial da lesão e sua subsequente expansão podem ser utilizados por melhoristas de plantas e fitopatologistas para selecionar cultivares resistentes a vários patógenos, além de permitir inferir quanto à agressividade dos isolados, pois permite estimar a intensidade da interação planta-patógeno ao longo do tempo (Johnson & Taylor, 1976). Suassuna *et al.* (2004) utilizaram a taxa de expansão de lesão e a área da lesão para estudar a especificidade de duas linhagens clonais de *P. infestans* a batateira e tomateiro. Foram observadas diferenças significativas nos valores da taxa de expansão da lesão para diferentes isolados de *P. infestans* provenientes das culturas do tomate e da batata. Estas diferenças explicaram parcialmente a preferência por hospedeiro.

A frequência de infecção (FI) é determinada como a probabilidade de um esporo depositado na superfície do hospedeiro, produzir uma lesão na ausência de interações competitivas (Pariaud *et al.*, 2009), ou seja, representa o sucesso da infecção do patógeno. Esse componente algumas vezes não é quantificado devido à dificuldade de ser estimado precisamente, por depender do número de esporos depositados, bem como das condições climáticas, que são de difícil controle (Lehman & Shaner, 1997). No entanto, essa é também uma variável importante para quantificar agressividade (Parlevliet, 1979), pois está associada à taxa reprodutiva do patógeno (Higgins, 1952). Suassuna *et al.* (2004) e Chacón *et al.* (2007), utilizaram este componente no patossistema *P. infestans* batateira (ou tomateiro) com o propósito de determinar diferença de agressividade entre os isolados coletados por cada autor. No patossistema *A. solani* – batateira, essa variável foi usada em estudos de caracterização da resistência de cultivares à pinta preta (Pelletier & Fry, 1990; Dita Rodriguez *et al.*, 2006).

Em sua maioria, os componentes epidemiológicos foram quantificados em estudos de caracterização da resistência de cultivares à pinta preta (Castro, 1997; Paula & Oliveira, 2003; Dita Rodriguez *et al.*, 2006). Portanto, há poucos trabalhos conduzidos com isolados brasileiros de *Alternaria* spp. nos quais os componentes epidemiológicos foram quantificados a fim de avaliar a agressividade (Silva, 2006).

2.4. A influência de variáveis climáticas no desenvolvimento da pinta preta

Variáveis climáticas como temperatura, umidade relativa, luminosidade e molhamento foliar influenciam as etapas do ciclo de vida de *A. solani* (Stevenson & Pennypacker, 1998; Vloutoglou & Kalogerakis, 2000). Apesar da ocorrência generalizada da pinta preta, as condições climáticas durante o cultivo influenciam a intensidade da epidemia. A severidade da doença foi maior sob condições de precipitações pluviométricas frequentes e temperaturas entre 25 e 30°C (Andrade, 1997, Salustiano, 2000). Deste modo, ao conhecer as condições ambientais que favorecem a doença é possível interferir no ciclo de vida do patógeno impedindo que este seja completado. Além disso, fatores climáticos podem interferir na adaptação de patógenos. Milus *et al.* (2006) demonstraram que a melhor adaptação dos isolados de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* a temperaturas altas pode ter sido possibilitada pela variação dessa população na região estudada. Porém, são poucos os estudos conduzidos com o propósito de investigar as relações entre estrutura de população de patógeno e clima.

O tempo entre o início da infecção e o aparecimento de sintomas nas folhas é dependente das condições ambientais, idade da folha e a suscetibilidade do cultivar, daí a importância de se caracterizar a agressividade de isolados de *A. solani* em relação às variáveis climáticas: temperatura e período de molhamento foliar. Rotem (1994) relatou temperaturas mínima, ótima e máxima de 5, 27 e 35 °C, respectivamente para a germinação dos conídios de *A. solani*. Porém, as temperaturas mínimas para infecção podem ser reduzidas de 20 °C para 10 °C, as máximas podem aumentar de 30 para 35 °C e as temperaturas ótimas se estenderem de 25 °C para uma faixa de 20 a 30 °C se o inóculo estiver presente e se o período de molhamento foliar for favorável. Em outro trabalho sobre a influência da temperatura na infecção e na severidade da pinta preta em tomateiro, a 13°C o número de lesões foi menor do que a 17, 21 e 25 °C (Pound, 1951). Concluiu-se que, a frequência de infecção foi maior a 26°C.

Além da temperatura, conídios do patógeno dependem de água livre na superfície foliar e a germinação e infecção no hospedeiro são afetadas pelo período de molhamento foliar. Espécies de *Alternaria* têm habilidade, que difere de outros fungos, em utilizar o orvalho como fonte de umidade. Isto devido à sua resistência em suportar condições adversas entre o momento da dispersão e a formação de orvalho, além da

capacidade de esporular e infectar em regimes de orvalho interrompidos por períodos secos (Bashi & Rotem, 1974).

No estudo do manejo da pinta-preta do tomateiro em épocas de temperaturas baixas (Salustiano, 2006), foi observado que as temperaturas baixas ou escassez de chuva e/ou curtas durações dos períodos de molhamento foliar propiciaram baixa incidência da pinta-preta. Lesões causadas por *A. solani* não foram observadas em tomateiro na ausência de molhamento foliar ou quando sua duração foi inferior a 4 h (Vloutoglou & Kalogerakis, 2000). A ocorrência da pinta preta, em condições de temperaturas baixas, em alguns países, foi atribuída à presença de período de molhamento foliar prolongado (Rotem, 1994). Bashi & Rotem (1974) observaram que em alguns casos, os esporos podem germinar em período de molhamento foliar prolongado, mesmo quando sujeitos à temperatura de 2 °C.

Alguns trabalhos visando compreender as relações entre variáveis climáticas e desenvolvimento de epidemias de pinta preta já foram realizados no Brasil. Porém, nestes trabalhos, não foram estudados componentes epidemiológicos em condições controladas; apenas há relatos da possível associação entre variáveis climáticas e o progresso da doença (Andrade, 1997; Paul et al., 1998, Salustiano, 2000). Ainda não foram realizados estudos sobre requerimentos ecológicos de *A. grandis* e *A. tomatophila* que ocorrem no Brasil.

A ocorrência das novas espécies associadas à pinta preta no país requer a realização de estudos que quantifiquem eventuais diferenças na agressividade e nos requerimentos ecológicos. Apenas o estudo da agressividade não é suficiente para se propor medidas diferenciadas de controle, uma vez que tanto o hospedeiro como o ambiente influenciam a agressividade de um isolado (Andrison, 1993). Para tal objetivo é necessário avaliar se as espécies de *Alternaria* associadas à pinta preta diferem entre si em relação a requerimentos ecológicos. No estudo da requeima (*P. infestans*), os efeitos da temperatura nos eventos do ciclo de infecção das linhagens clonais do patógeno foram distintos a ponto de poderem afetar o controle da doença (Maziero et al., 2009).

A principal contribuição das informações geradas seria subsidiar estratégias de manejo, as quais, atualmente, estão baseadas nas características observadas para isolados de *A. solani*. Além disso, a predominância de populações adaptadas a determinadas condições ecológicas pode interferir com a especificidade de *Alternaria* spp. em plantas hospedeiras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados de *Alternaria* spp. e produção de inóculo

Foram utilizados 11 isolados de *Alternaria* spp., de diferentes regiões geográficas: 4 de *A. tomatophila* oriundos de tomateiro, 6 de *A. grandis* e 1 de *A. solani*, estes 7 oriundos de batateira (Tabela 1). Os isolados de *A. tomatophila* e *A. grandis* foram selecionados da coleção de culturas do laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa. As colônias estavam armazenadas em fragmentos de papel filtro, a -80 °C, mantidos em envelopes de papel esterilizados. As culturas-tipo e o isolado representante de *A. solani* foram fornecidos pelo Dr. Emory G. Simmons.

Para a produção de inóculo, os isolados foram cultivados em meio V8 CaCO₃ ágar (175 mL de suco V8, 3 g CaCO₃, 20 g ágar, 1L) a 25 ±2 °C, fotoperíodo de 12 h. No quinto dia de incubação, adicionou-se água destilada a cada placa e, com um pincel, retirou-se o micélio. As placas foram mantidas, sem tampa, a 22 ±2 °C, sob 6 lâmpadas de luz negra 40 W (Sylvania[®] - 1,20 m de comprimento, distanciadas de 3 cm entre si e posicionadas a 30 cm de altura das placas), em fotoperíodo de 16 h de escuro e 8 h de luz. Após 24 h, os conídios foram removidos com a adição de 10 mL de água destilada em cada placa seguida de raspagem superficial da colônia com escova de cerdas macias. Filtrou-se a suspensão em dupla camada de gaze esterilizada, a qual foi recolhida em um béquer. A concentração foi ajustada, de acordo com a necessidade de cada experimento, considerando a contagem do número de conídios presentes em uma gota de 10 µL da suspensão depositada sobre uma lâmina por meio de microscópio estereoscópico (10X) (Dita Rodriguez *et al.*, 2006).

Tabela 1. Isolados de *Alternaria* spp. utilizados neste estudo

Espécie	Hospedeiro de Origem	Código do Isolado	Local de Coleta	Data da Coleta
<i>Alternaria grandis</i>	Batateira	As 169	Bueno Brandão-MG	2006
		As 220	Camanducaia-MG	2006
		As 248	Conselheiro Lafaiete-MG	2005
		As 260	Cristalina-GO	2005
		As 263	Cristalina-GO	2005
		EGS 44-108	Pennsylvania-EUA	1996
<i>Alternaria tomatophila</i>	Tomateiro	As 109	Vassouras-RJ	2000
		As 422	Jaíba-MG	2005
		As 423	Jaíba-MG	2005
		EGS 42-156	Indiana-EUA	1995
<i>Alternaria solani</i>	Batateira	EGS 44-098	Washington-EUA	n.d

*n.d. informação não disponível

3.2. Área das lesões causadas por isolados de *Alternaria* spp. em batateira e tomateiro em diferentes temperaturas

Tomateiros da variedade Santa Clara e batateiras ‘Opaline’ foram cultivados em mistura de substrato comercial Plantmax, solo esterilizado e areia na proporção de 1:1:1, em vaso plástico de 4 L, em condições de campo. Os tratamentos culturais e o controle de pragas foram realizados conforme recomendações para cada cultura. Para evitar a ocorrência antecipada da pinta preta, pulverizou-se, semanalmente, o fungicida clorotalonil (150 g do i.a./L de água), interrompendo a pulverização 10 dias antes da inoculação.

As plantas, com idade entre 45 e 55 dias (Castro *et al.*, 2000), foram inoculadas pela deposição de duas gotas de 15 µL de suspensão 10^4 conídios/mL, dos isolados (Tabela 1), exceto o isolado EGS 44-108, adicionada de gelatina sem sabor, incolor (1%), com pipetador automático. Cinco folíolos dos terços inferior e médio, de cada

planta, foram escolhidos ao acaso e inoculados. As plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro a 25 °C. Após 16 h, foram transferidas e mantidas em câmaras de crescimento a 18, 22, 25 ou 30 °C. Como testemunha, uma planta, não inoculada, de cada hospedeira, foi colocada em cada uma das câmaras de crescimento.

Antes da inoculação, dois folíolos de cada planta foram retirados, lavados e o líquido obtido da lavagem do folíolo foi transferido para fragmento de papel filtro. Estes fragmentos foram examinados sob microscópio estereoscópico (45X), para verificar a eventual presença de conídios depositados nos folíolos, antes da inoculação.

Após 4 dias da inoculação, determinou-se a área da lesão (AL) da pinta preta. Para tal, mediram-se a largura e o comprimento das lesões com paquímetro digital e a AL (mm²) foi estimada considerando-se a área de um círculo ($\pi(D^2/4)$). A média das áreas das lesões formadas nos folíolos, em cada planta, em cada temperatura, foi considerada como uma observação. O experimento foi executado uma vez.

3.3. Crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp. em diferentes temperaturas

Cultivaram-se os 11 isolados de *Alternaria* spp. em meio batata-dextrose ágar (BDA) a 25 ±2 °C, sob fotoperíodo de 12 h, durante 7 dias. Dos bordos das colônias retiraram-se discos de cultura (4 mm de diâmetro) contendo estruturas do fungo e estes foram depositados no centro de placas de Petri contendo BDA. As placas foram dispostas aleatoriamente em incubadoras a 15, 22, 25, 30 ou 35 °C. Diariamente, mensurou-se com uma régua o diâmetro de cada colônia, nos dois sentidos perpendiculares, até que o micélio de qualquer das colônias atingisse a borda da placa. Determinou-se o diâmetro médio de cada colônia, em cada temperatura, e calculou-se a área abaixo da curva de crescimento micelial, $AACCM = \sum [(y_i + y_{i+1})/2] \cdot (t_{i+1} - t_i)$, onde y_i e y_{i+1} são os valores do diâmetro médio de cada colônia em duas avaliações consecutivas e $t_{i+1} - t_i$ o intervalo entre as avaliações (Shaner & Finney, 1977). O experimento foi conduzido duas vezes. Cada colônia em uma placa de Petri foi considerada uma unidade experimental.

3.4. Frequência de infecção e período de incubação em batateira e tomateiro em diferentes durações do período de molhamento foliar

Tomateiros e batateiras cultivados como descrito no item 3.2, foram inoculados por atomização de suspensão de 10^3 conídios/mL (item 3.1.1), com auxílio de atomizador De Vilbiss N°15. Após a inoculação, as plantas foram mantidas a diferentes intervalos de tempos a 100% de umidade relativa, para simular diferentes durações de períodos de molhamento foliar (PMF): 2, 4, 8, 12 e 24 h, e temperatura ambiente.

Para definir os PMF, utilizou-se de um sistema composto por bicos de pulverização acoplados a uma tubulação hidráulica e de estruturas compostas de madeira e de plástico, fechada nas suas laterais (dimensão 2 m de comprimento x 3 m de largura x 1,8 m de profundidade). Na parte superior da estrutura, construiu-se uma tampa para permitir a abertura e fechamento do compartimento.

Após cada PMF, as plantas foram retiradas da câmara úmida e deixadas em casa de vegetação para secagem das folhas. Decorrido o último PMF e após as folhas estarem secas, todas as plantas foram transferidas para condições de campo, onde haviam sido cultivadas, e aplicou-se o fungicida clorotalonil como em 3.2. para evitar novos eventos de infecção.

Os componentes epidemiológicos avaliados foram frequência de infecção (FI) e o período de incubação (PI). A FI foi determinada como a razão entre o número de lesões/cm² pelo número médio de conídios depositados/cm². Para quantificar a FI, seis folíolos foram marcados, aleatoriamente, em cada planta. Dois desses folíolos foram destacados imediatamente após a inoculação e utilizados na determinação do número de conídios depositados. Para tal, lavaram-se os 2 folíolos em 10 mL de água contida em um recipiente, sob agitação manual. A suspensão de conídios obtida foi transferida para fragmento de papel filtro, o qual foi examinado sob microscópio estereoscópico (45X) e o número de conídios foi determinado. A área dos 6 folíolos selecionados de cada planta foi estimada por um integrador de área foliar (LI-COR 3100, Area Meter). Quatro dias após a inoculação, o número de lesões foi contado nos outros 4 folíolos previamente marcados e calculou-se a razão entre o número de lesões/cm² pelo número médio de conídios depositados/ cm² (FI).

O PI, tempo decorrido entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas, foi determinado por observações diárias dos sintomas a intervalos de 12 h. As avaliações

iniciaram-se às 24 h após a inoculação e se estenderam até 168 h após a inoculação. O PI para cada isolado foi considerado completado quando 50% dos folíolos marcados apresentaram sintomas da pinta preta. Considerou-se como folíolo com sintoma aquele que apresentou pelo menos uma lesão de pinta preta.

Durante a condução do ensaio, os valores de temperatura e umidade relativa dentro da casa de vegetação foram registrados em coletor automático de dados (Hobo PRO RH/TEMP). Os dados de temperatura, umidade relativa e precipitação nas condições de campo foram obtidos da estação meteorológica principal da Universidade Federal de Viçosa, localizada a 1.155 m da área experimental.

O experimento foi conduzido duas vezes. A primeira execução ocorreu no mês de março e a segunda no mês de junho de 2009. Para o segundo experimento o PI não foi quantificado. Para as testemunhas procedeu-se como no item 3.2.

3.5. Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

O delineamento experimental para o experimento de AL, PI e FI foi o de blocos casualizado. Para o componente AL realizou-se um experimento com 3 repetições no tempo e 4 fatores: temperatura, espécies, isolados e hospedeiros. Para PI e FI, empregam-se 4 repetições no tempo e 4 fatores: período de molhamento foliar, espécies, isolados e hospedeiros. Para análise estatística, o fator isolado foi considerado como aleatório e aninhado dentro de espécie, seguindo o modelo linear aninhado-cruzado (Kuehl, 1994), o modelo ajustado para esses componentes epidemiológicos foi:

$$y_{(ijklm)} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + d_{l(i)} + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + e_{m(ijkl)},$$

No experimento para AACCM o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 3 repetições no tempo e 3 fatores: temperaturas, isolados e espécies. O fator isolado foi considerado como fator aleatório estando aninhado dentro de espécie, para esse componente o modelo ajustado foi:

$$y_{(ijlm)} = \mu + \alpha_i + \beta_j + d_{l(i)} + (\alpha\beta)_{ij} + e_{m(ijl)},$$

onde μ = média, α_i = efeito fixo para espécie, β_j = efeito fixo para temperatura ou PMF, γ_k = efeito fixo para hospedeiro, $d_{l(i)}$ = efeito aleatório de isolado aninhado dentro de espécie, $(\alpha\beta)_{ij}$ = interação espécie - temperatura ou espécie - PMF, $(\alpha\gamma)_{ik}$ = interação espécie - hospedeiro, $(\beta\gamma)_{jk}$ = interação temperatura - hospedeiro ou PMF - hospedeiro, $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ = interação espécie - hospedeiro - temperatura ou PMF e $e_{m(ijkl)}$ e $e_{m(ijl)}$ = erro experimental (Kuehl, 1994).

O modelo escolhido atende o objetivo do trabalho de avaliar as diferenças entre as espécies de *Alternaria* em estudo, os isolados por serem considerados fatores aleatórios do modelo, representam a população de *Alternaria* spp. e portanto as inferências são válidas para toda a população.

Para realizar a análise de variância e testes de hipóteses adequados para o modelo linear em uso, determinou-se, manualmente, o quadrado médio esperado (E(QM)) de cada uma das fontes de variação da análise de variância (ANOVA), conforme Kuehl (1994).

No caso de interações significativas envolvendo fatores quantitativos, os dados foram plotados e, por meio do ajuste de modelos, estimaram-se parâmetros (β s) e foi realizada a avaliação da equação do ajuste. Quando pertinente, as estimativas de parâmetro das diferentes curvas de interesse foram comparadas por meio do intervalo de confiança a 95% de probabilidade (IC95%) da diferença dos valores estimados (Campbell & Madden, 1990). Quando adequado, realizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Todas as análises foram realizadas com o programa R versão 2.9 (R Development Core Team, 2009).

4. RESULTADOS

4.1. Área das lesões causadas por isolados de *Alternaria* spp. em batateira e tomateiro em diferentes temperaturas

Houve interação hospedeiro - temperatura ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Maiores valores médios de AL foram registrados a 25 °C, tanto em batateira (98,5 mm²) quanto em tomateiro (13,8 mm²). Em batateira, a 30 °C a AL foi maior (67,8 mm²) do que a 22 °C (22,3 mm²). Em tomateiro, a AL a 30 °C (6,8 mm²) foi menor do que a 22 °C (8,5 mm²) (Figura 1).

As diferenças das estimativas do parâmetro β do termo quadrático do modelo, para os dois hospedeiros em relação à temperatura, foram testadas pelo intervalo de confiança (IC95%). As curvas geradas para batateira não diferiram das geradas para tomateiro [IC95% = (-0,341 - 1,425)].

A interação espécie x hospedeiro foi significativa ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Maiores valores de AL foram registrados em batateira, para todas as espécies. Isolados de *A. grandis* em batateira causaram maior AL (62,7 mm²), seguido de *A. solani* (53,3 mm²) e *A. tomatophila* (30,4 mm²). Em tomateiros, a média dos valores de AL para *A. tomatophila* foi 9,4 mm², para *A. solani*, 7,8 mm² e 7,6 mm² para *A. grandis* (Figura 2). Em batateira, houve diferenças entre as AL das espécies (Figura 2). Em tomateiro, a AL média para *A. grandis* diferiu da de *A. tomatophila* e a média de AL para *A. solani* não diferiu de *A. grandis* e *A. tomatophila* (Figura 2).

Tabela 2. Análises de variância após ajuste de modelo cruzado-aninhado para as variáveis, área da lesão, área abaixo da curva de crescimento micelial, frequência de infecção e período de incubação estimadas após inoculação de isolados (Isol) de diferentes espécies de *Alternaria* (Esp) em plantas dos dois hospedeiros (Hosp), que foram mantidos em diferentes temperaturas (Temp) ou períodos de molhamento foliar (PMF)

Fonte de variação	Área da Lesão (AL)				Área Abaixo da Curva do Crescimento Micelial (AACCM)				
	GL ^f	QM ^g	F	P		GL	QM	F	P
Esp	2	6261	1,3	0,3243	Esp	2	1338,3	7,3	0,0154
Hosp	1	98552	158,6	< 0,0001	Temp	4	4282,1	583,1	<0,0001
Temp	3	35943	57,8	< 0,0001	Isol(Esp)	8	182,2	24,8	<0,0001
Isol(Esp) ^a	7	4714	7,6	<0,0001	Esp x Temp	8	237,1	32,3	<0,0001
Esp x Hosp ^b	2	7801	12,6	<0,0001	Resíduo	307	7,3		
Esp x Temp ^c	6	982	1,6	0,154					
Hosp x Temp ^d	3	23839	38,4	< 0,0001					
Esp x Hosp x Temp ^e	6	988	1,6	0,152					
Resíduo	209	621							

Fonte de variação	Frequência de Infecção (FI-experimento 1)				Frequência de Infecção (FI-exp2)				Período de Incubação (PI)			
	GL	QM	F	P	GL	QM	F	P	GL	QM	F	P
Esp	2	0,049	0,3	0,7514	2	0,01	0,3	0,801	2	1319	0,3	0,731
Hosp	1	14,98	1973,7	<0,0001	1	1,2	428,9	<0,0001	1	136161	1358,8	<0,0001
PMF	4	1,13	149,2	<0,0001	4	0,17	60,4	<0,0001	4	8947	89,3	<0,0001
Isol(Esp)	7	0,16	21,6	<0,0001	7	0,03	11,6	0,0001	7	4028	40,2	<0,0001
Esp x Hosp	2	0,05	6,3	0,0021	2	0,04	17,6	0,0001	2	3193	31,9	0,0001
Esp x PMF ^c	8	0,02	2,4	0,0165	8	0,01	1,8	0,067	8	100	1	0,433
Hosp x PMF ^d	4	0,05	7	0,0001	4	0,05	16	0,0001	4	698	7	0,0001
Esp x Hosp x PMF ^e	8	0,01	1,4	0,205	8	0,001	0,51	0,851	8	231	2,3	0,02
Resíduo	363	0,01			363	0,003			363	100		

^aisolado aninhado dentro de espécie; ^binteração espécie-hospedeiro; ^cinteração espécie- temperatura /período de molhamento foliar; ^d interação hospedeiro-temperatura ou hospedeiro- período de molhamento foliar; ^einteração espécie-hospedeiro-temperatura ou hospedeiro-período de molhamento foliar; ^f graus de liberdade; ^g quadrado médio.

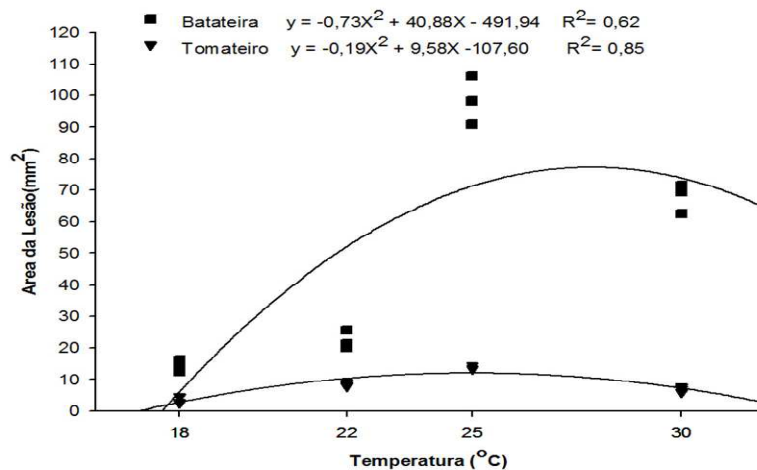


Figura 1. Áreas de lesões de pinta preta em batateira e tomateiro, após 4 dias de inoculação de isolados de três espécies de *Alternaria* e de manutenção em diferentes temperaturas.

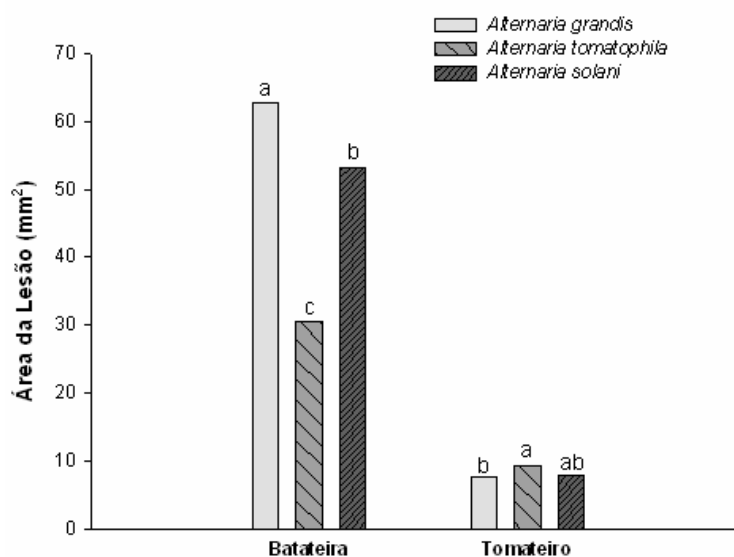


Figura 2. Área da lesão causada por isolados de *Alternaria grandis*, *A. tomatophila* e *A. solani* inoculados em batateira e tomateiro. Para cada hospedeiro, as médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

4.2. Crescimento micelial de isolados de *Alternaria* spp. em diferentes temperaturas

Houve similaridade de variância dos dois experimentos (QMR experimento 1= 6,7 e experimento 2= 6,4) e os dados foram analisados em conjunto. A interação espécie x temperatura foi significativa ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Maiores valores de AACCM foram verificados para isolados de *A. grandis* em relação aos isolados de *A. tomatophila* e *A. solani*, quando cultivadas a 18, 22, 25 e 30 °C. A 35 °C, os valores de AACCM para *A. grandis* foram inferiores aos estimados para *A. tomatophila*. Diferentemente do observado para *A. grandis* e *A. tomatophila*, para *A. solani* houve redução dos valores da AACCM a partir de 30 °C (Figura 3). Houve diferença entre as curvas de crescimento de *A. grandis* e *A. solani* [IC95%=(0,0076 - 0,0878)], em relação ao parâmetro β do termo quadrático do modelo. Não houve diferença entre as curvas de crescimento de *A. grandis* e *A. tomatophila* [IC95%= (-0,0009 - 0,0819)] e *A. tomatophila* e *A. solani* [IC95%=(-0,0264 - 0,0404)].

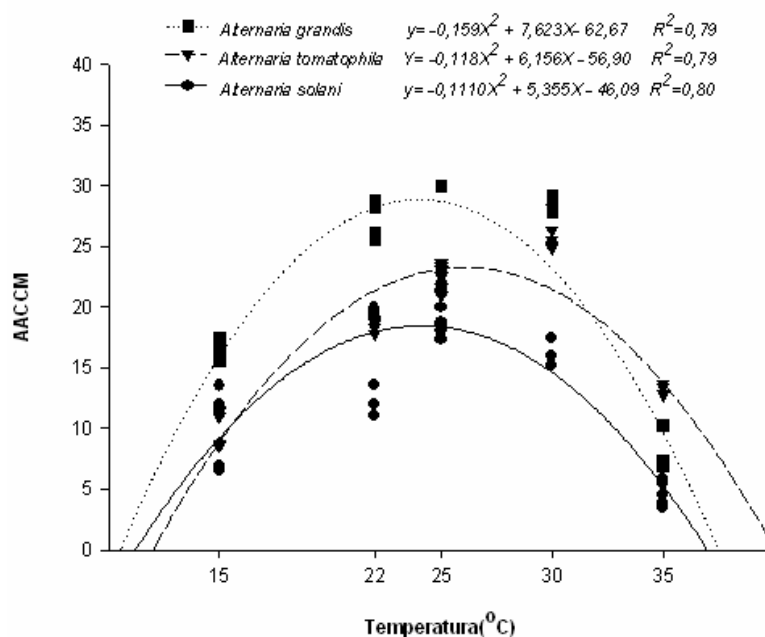


Figura 3. Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de isolados de três espécies de *Alternaria* cultivados em meio de cultura BDA em diferentes temperaturas.

4.3. Efeito do período de molhamento foliar sobre a agressividade de isolados de *Alternaria* spp. em tomateiro e batateira

Os experimentos para avaliar o efeito de PMF sobre FI foram conduzidos em épocas de condições climáticas distintas (Figura 4), portanto as análises dos dados para FI foram realizadas para cada experimento em separado (E1 e E2). No E1, conduzido em março, a temperatura e umidade relativa médias, no interior da casa de vegetação foram 25 °C e 91%, respectivamente. No ambiente externo, a UR média foi 82% e as médias das temperaturas mínima, média e máxima foram 19, 22,6 e 29,4 °C, respectivamente. No E2, conduzido entre maio e junho, a temperatura e a UR médias dentro da casa de vegetação foram 20 °C e 100%, respectivamente. No ambiente externo, onde as plantas permaneceram por 3 dias após a inoculação e antes de o componente ser quantificado, as temperaturas mínima, média e máxima foram 14, 18 e 25 °C, respectivamente, e a UR foi 81%.

Os valores de FI foram mais altos no E1 do que no E2. Em ambos os experimentos a interação hospedeiro x PMF foi significativa ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Maiores valores de FI (0,73 em E1 e 0,25 em E2) foram registrados quando o PMF foi de 24 h e em batateira. Em tomateiro, a FI foi estimada em 0,28 em E1 e 0,03 em E2. Em batateira, houve infecção e formação de lesões em todos os PMF. Em tomateiro, não foram observados sintomas com 2 h de PMF. Os valores foram baixos em ambos os hospedeiros no E2 (Figura 5).

Pela análise do IC95%, houve diferença entre as estimativas de β quando se compararam as curvas para batateira e tomateiro, nos dois experimentos, E1 [IC95% = (0,146 - 0,258)] e E2 [IC95% = (0,019 - 0,202)].

Houve interação espécie x PMF, em ambos os experimentos ($P = 0,016$ e $P = 0,067$, no E1 e E2, respectivamente) (Tabela 2). No primeiro experimento, maiores valores de FI foram registrados para os isolados de *A. grandis* nos PMF de 2, 4 e 24 h; para isolados de *A. tomatophila* com 8 h de PMF e para *A. solani* quando o PMF foi de 12 h. Nos PMF de 4, 8 e 12 h, os valores de FI para o isolado de *A. solani* foram maiores que os de *A. tomatophila* (Figura 6A).

No segundo experimento, foram observados valores maiores de FI para os isolados de *A. grandis* no PMF de 24 h. Nos demais PMF, maiores valores de FI foram registrados para o isolado de *A. solani*. No PMF de 8, 12 e 24 h, a FI para os isolados de *A. grandis* foi maior que os de *A. tomatophila* (Figura 6B).

No E1 não houve diferença entre as estimativas de parâmetros da curva gerada para, *A. grandis* e *A. tomatophila* [IC 95% =(-0,005 - 0,121)]; *A. grandis* e *A. solani* [IC 95%= (-0,082 - 0,089)]; e *A. tomatophila* e *A. solani* [IC 95%= (-0,124 - 0,013)]. No E2, houve diferença entre as estimativas de parâmetros de *A. grandis* e *A. solani* [IC 95%= (0,054 - 0,327)]; e *A. tomatophila* e *A. solani* [IC95% = (0,025 - 0,289)]. Não houve diferença entre as estimativas de parâmetros de *A. grandis* e *A. tomatophila* [IC95%= (-0,025 - 0,093)].

Em ambos os experimentos, a interação espécie x hospedeiro foi significativa (P= 0,002 e P=0,0001). No E1, maiores valores de FI foram observados em batateira, causados por isolados de *A. grandis* e *A. solani* (FI=0,58 e FI=0,58, respectivamente). Porém, as médias de *A. grandis* e *A. solani* não diferiram entre si, mas diferiram com da de *A. tomatophila*. No E2, maior FI foi registrada para *A. solani* (FI=0,20), que diferiu das demais espécies. Não houve diferença entre *A. grandis* e *A. tomatophila*. Em tomateiro, maiores valores de FI foram observados para os isolados de *A. grandis* e de *A. tomatophila*, tanto no E1 (FI=0,17), como no E2 (FI=0,023), para ambas as espécies (Figura 7). No E1, não houve diferença entre as espécies. No E2, houve diferença quando se compararam *A. grandis* e *A. tomatophila* com *A. solani*.

Para o componente PI, avaliado somente no E1, observou-se interação significativa entre espécie x hospedeira x PMF (P=0,0202). Em batateira, menores valores de PI foram observados associados aos isolados de *A. tomatophila* (PI= 28 h), *A. grandis* (PI=37 h) e *A. solani* (PI= 48 h), em todos os PMF avaliados. O PI associado aos isolados de *A. solani* foi menor do que para os de *A. grandis* no PMF de 24 h (Figura 8). Em tomateiro, o PI associado aos isolados de *A. grandis* foi menor que para os de *A. tomatophila* e *A. solani*, os quais por sua vez estavam associados ao menor PI, no PMF de 2 a 12 h, que os isolados de *A. tomatophila*.

Houve diferença entre as estimativas de β nas comparações entre *A. tomatophila* e *A. grandis* [IC95%= (0,015 – 0,047)] e entre *A. tomatophila* e *A. solani* [IC95%= (0,006 – 0,038)], quando inoculadas em batateira. Também houve diferenças significativas em comparações realizadas entre espécies quando inoculadas em hospedeiros distintos: *A. grandis* em batateira e *A. solani* em tomateiro [IC95%= (0,0006 – 0,021)]; *A. solani* em batateira e *A. tomatophila*, *A. grandis* e *A. solani* em tomateiro [IC95% (0,012 – 0,044); (0,009 – 0,041) e (0,016 – 0,050), respectivamente].

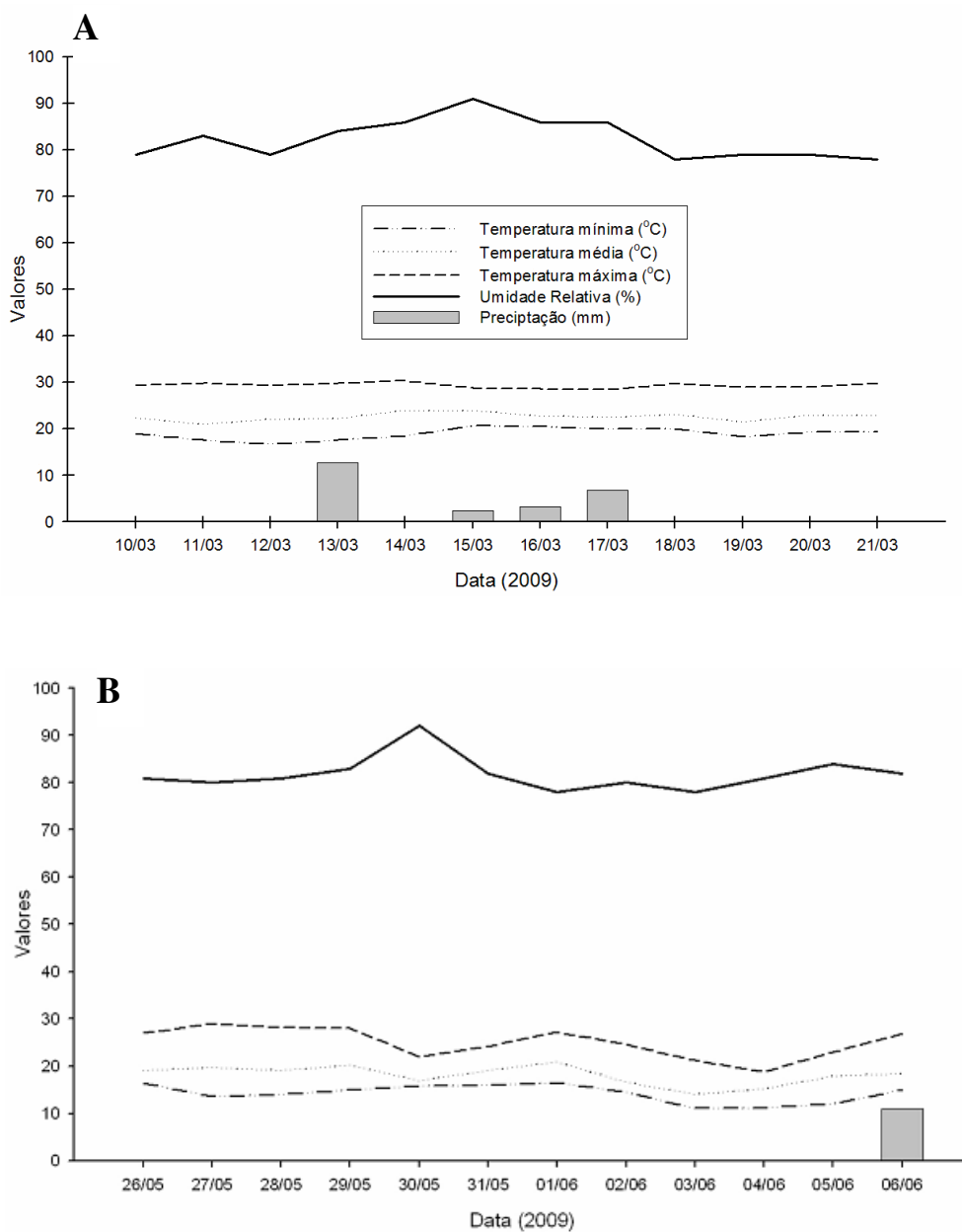


Figura 4. Umidade relativa, precipitação e temperatura máxima, média, e mínima durante o período de infecção de *Alternaria* spp. em batateira e tomateiro no mês de março, para o primeiro experimento (A) e nos meses de maio a junho, para o segundo experimento (B).

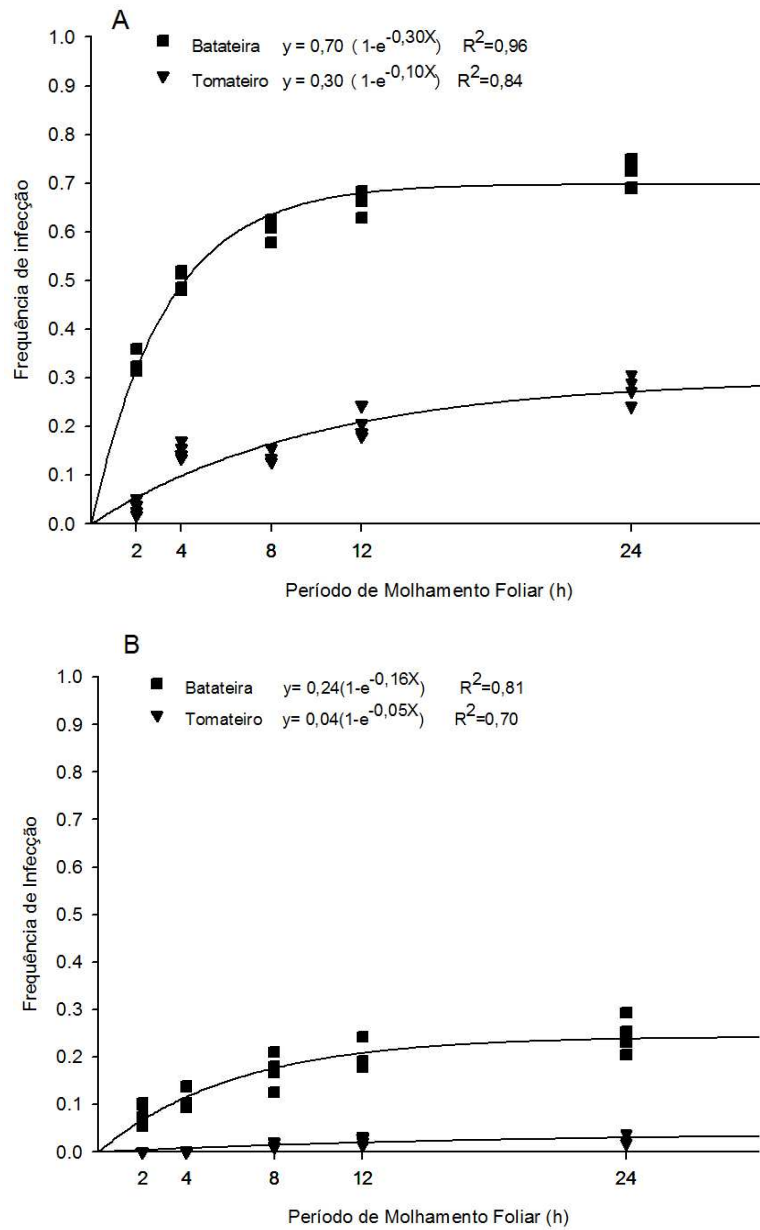


Figura 5. Efeito da duração do período de molhamento foliar (PMF) na frequência de infecção (FI) de *Alternaria* spp. em batateira e tomateiro, em dois experimentos (A) e (B).

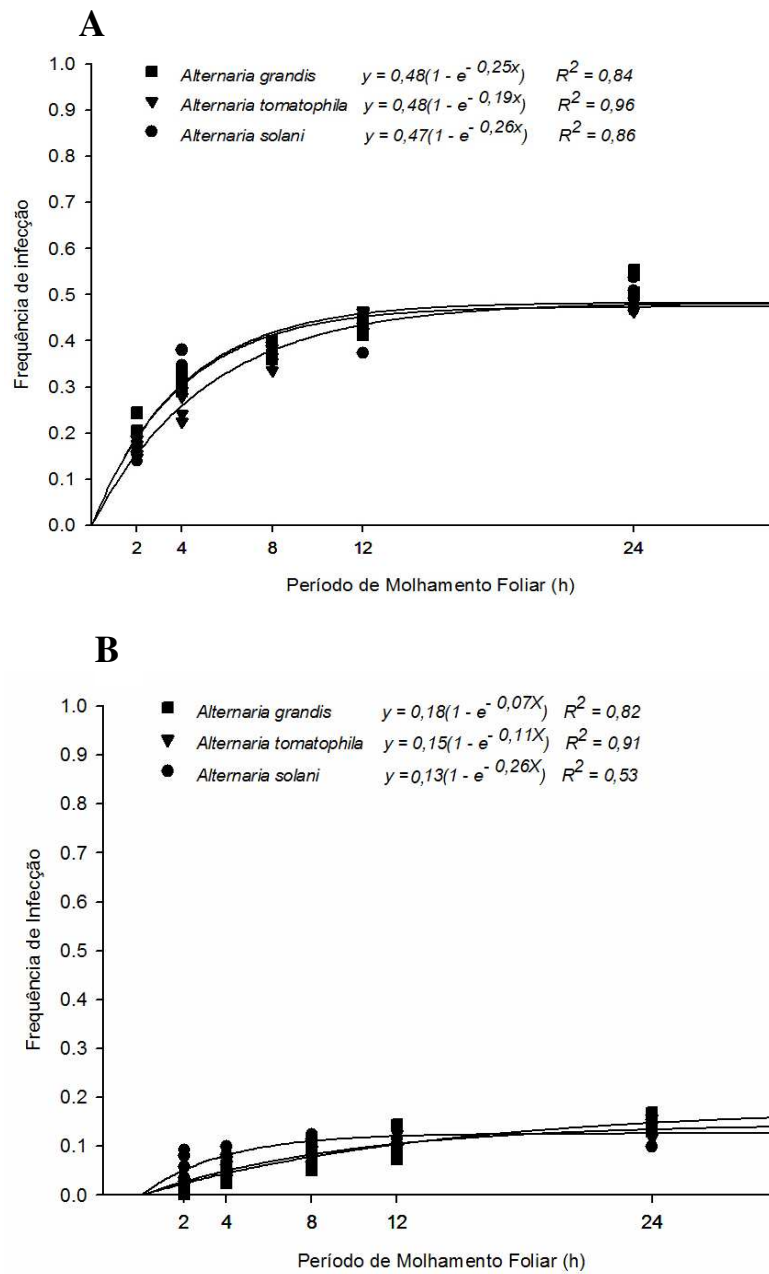


Figura 6. Efeito do período de molhamento foliar (PMF) na frequência de infecção (FI) de *Alternaria grandis*, *A. tomatophila* e *A. solani*, em dois experimentos (A) e (B).

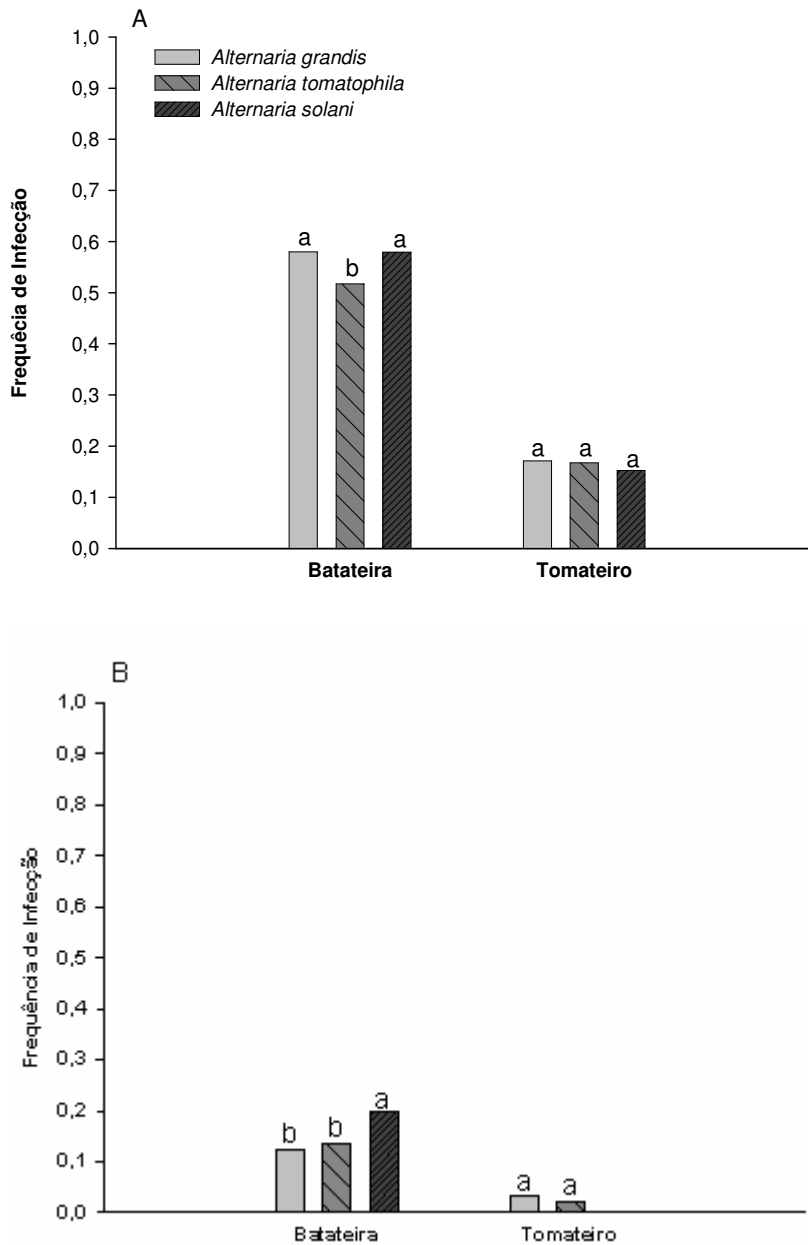


Figura 7. Valores médios de frequência de infecção causada por isolados de *Alternaria grandis*, *A. tomatophila* e *A. solani* inoculados em batateira e tomateiro, em dois experimentos (A) e (B). Para cada hospedeiro, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

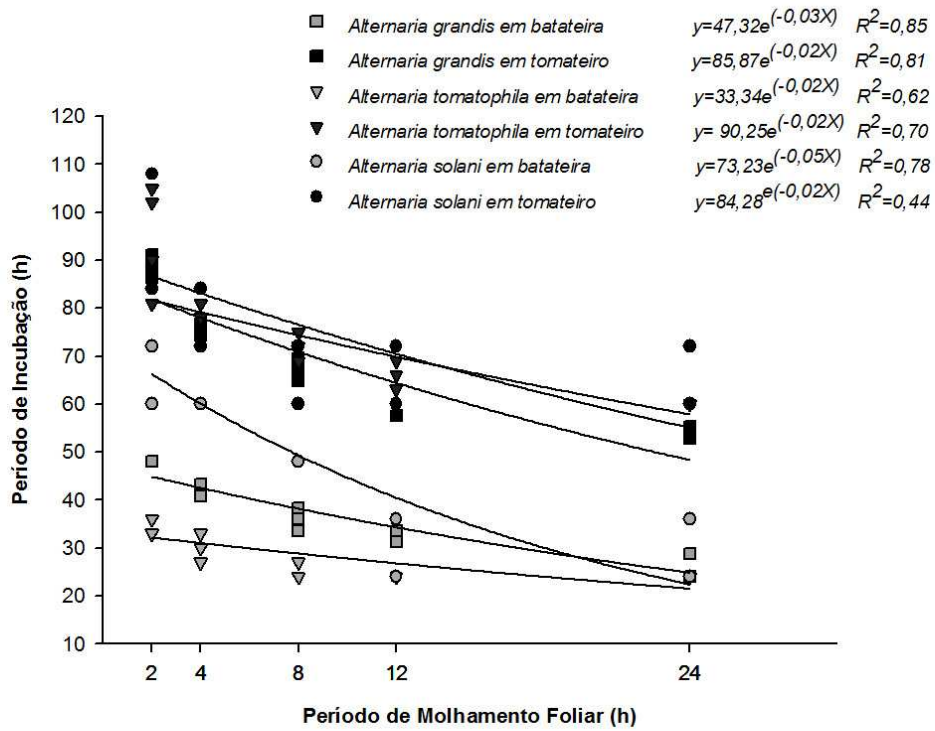


Figura 8. Efeito do período de molhamento foliar (PMF) no período de incubação de *Alternaria grandis*, *A. tomatophila* e *A. solani*, inoculadas em batateira e tomateiro.

5. DISCUSSÃO

A pinta preta, uma das doenças mais destrutivas da batateira e do tomateiro, sempre foi bastante estudada. O Dr. Emory G. Simmons, um dos maiores estudiosos do gênero *Alternaria*, relatou a existência de mais de uma espécie de *Alternaria* causando pinta preta em solanáceas. Recentemente tal fato foi constatado no Brasil (Dra. Tatiana T. M. S. Rodrigues, comunicação pessoal), e este é o estudo pioneiro de quantificação e compreensão da agressividade das novas espécies causadoras da pinta preta: *A. grandis* e *A. tomatophila*, em conjunto com avaliação de requerimentos ecológicos destas espécies. Para outras espécies, inclusive *A. solani*, há relatos de populações com preferência para o hospedeiro (Fancelli, 1991, Weir *et al.*, 1998, Castro *et al.*, 2000, Martínez *et al.*, 2004). Contudo, nenhum estudo foi conduzido para as populações brasileiras de *A. grandis* e *A. tomatophila* quanto à preferência por hospedeiro e tampouco se diferenças quanto aos requerimentos ecológicos podem afetar este processo. A elucidação destas questões poderá contribuir para entender aspectos básicos como os de evolução destas populações e os práticos como a determinação de como variáveis climáticas afetam o desenvolvimento da doença.

Os efeitos de temperatura sobre a área da lesão e do período de molhamento foliar sobre a frequência de infecção variaram conforme a espécie hospedeira. Maiores valores de AL e FI foram registrados em batateira e dois fatores podem ter contribuído para este efeito diferencial: a suscetibilidade das variedades utilizadas e o efeito da idade da cultura no dia de inoculação. A variedade ‘Opaline’ é suscetível à requeima (*Phytophthora infestans*) (Duarte, 2009) e, no presente trabalho, foi altamente suscetível à pinta preta. A variedade de tomate Santa Clara é considerada padrão de suscetibilidade à pinta preta (Töfoli & Kurozawa, 1993). Porém, a intensidade da doença foi menor em tomateiro quando comparada à batateira. Além do componente genético, o ciclo de vida de cada cultura é diferente e a idade fisiológica em que se realizou a inoculação pode ter contribuído para maior suscetibilidade da batateira do que do tomateiro.

A batateira possui quatro estádios fenológicos, que vai deste do plantio da batata–semente (Estádio I) até a senescência natural da planta (estádio IV). Com 45 dias, idade na qual as plantas foram inoculadas, as plantas encontravam-se no estágio III, que estende do início da tuberização até a planta atingir o máximo desenvolvimento vegetativo, sendo caracterizado pelo desenvolvimento acelerado da parte aérea. Nessa

fase, é máxima a exigência de água e é quando os problemas fitossanitários iniciam-se (Filgueira, 2007). Por outro lado, o tomateiro, com 45 a 55 dias de idade, encontra-se na fase de desenvolvimento vegetativo e início do florescimento (passagem do estado vegetativo para o reprodutivo). Fenologicamente, o tomateiro com essa idade é mais novo que a batateira apesar de terem a mesma idade cronológica. Como a pinta preta é mais severa em tecidos mais velhos, a idade fenológica em que cada hospedeiro foi inoculado pode ter favorecido o melhor desenvolvimento da doença em batateira.

No caso do experimento de temperatura, o estresse causado por altas temperaturas pode ter contribuído para maior suscetibilidade de batateira. A batateira é adaptada a clima ameno e requer temperaturas noturnas baixas para desenvolvimento adequado (Simmonds, 1971). A temperatura ótima para a fotossíntese está em torno de 20 °C e a cada incremento de 5 °C na temperatura da folha, há redução de aproximadamente 25% na taxa de fotossíntese. Aumentos de 10 °C na temperatura podem dobrar a taxa de respiração foliar. Portanto, o estresse térmico pode diminuir os fotoassimilados disponíveis ao desenvolvimento da planta (Burton, 1981). O estresse causado pela manutenção de batateiras acima de 22 °C (sem alternância com temperaturas amenas) pode ter predisposto à maior severidade da pinta preta. A 30 °C, observou-se alteração no aspecto das batateiras: folhas amareladas e pouco túrgidas; indícios de estresse por calor. Nestas condições, registraram-se altos valores de AL. Por outro lado, o tomateiro é espécie adaptada a condições climáticas mais amplas e desenvolve bem em temperaturas mais altas (Naika, 2006). É possível que menores valores de AL em tomateiro possam ter sido influenciados pela menor intensidade do estresse causado pela temperatura.

Houve variação da AL em função da combinação da espécie de *Alternaria* e hospedeiro e apesar de as espécies de *Alternaria* terem infectado tanto a batateira quanto o tomateiro, há evidência de possível especificidade a nível de hospedeiro. Os isolados de *A. grandis*, *A. solani* e *A. tomatophila*, causaram maior AL em seus hospedeiros de origem, *A. grandis* foi mais agressivo que *A. solani* em batateira. Em trabalho realizado nos Estados Unidos para avaliar a resposta à infecção por isolados de *Alternaria* spp. em batateira e tomateiro, verificou-se que, isolados de *A. tomatophila*, produziram mais lesões em tomateiro e isolados de *A. solani* em batateira (Frazer, 2002).

No Brasil, Rodrigues (2009), não verificou nenhuma diferença com relação à agressividade dos isolados de *Alternaria* spp. no teste de patogenicidade realizado. No

seu trabalho, isolados de *A. grandis* e *A. tomatophila* não foram mais agressivos em seus respectivos hospedeiros de origem. No entanto, o seu experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, onde as plantas, não apresentam as mesmas características fisiológicas comparadas às plantas cultivadas em condições de campo, o que pode ter influenciado os resultados. Além disso, a alta concentração de inóculo aliada à temperatura e umidade favoráveis pode ter contribuído para a igual agressividade das espécies em ambos hospedeiros.

Diferentemente de *A. tomatophila*, os isolados de *A. grandis* e *A. solani* causaram maior AL em batateira mantidas a temperaturas baixas e a 30 °C. O fato de isolados de *A. grandis* causarem lesões maiores em temperaturas mais baixas pode ser explicado pela adaptação do patógeno às condições climáticas onde o hospedeiro é cultivado; isto é, em regiões de temperaturas mais amenas. É possível que isolados de *A. grandis* podem causar doença em locais onde a temperatura média é inferior à adequada para os isolados de *A. tomatophila*, isso poderia contribuir para maior favorecimento de *A. grandis* na área, uma vez que esses encontrariam melhores condições que *A. tomatophila* para causar epidemia. Lesões maiores, sob alta temperatura, 30 °C, podem estar associadas ao estresse causado as plantas de batateira, conforme mencionado anteriormente.

Em condições de campo, no Brasil, *A. grandis* não têm sido encontrado em tomateiros e nem *A. tomatophila* em batateira. Seriam as diferenças com relação à resposta das espécies de *Alternaria* influenciadas pela temperatura em que as plantas são cultivadas? No patossistema *Phytophthora infestans* em batateira e tomateiro, a especificidade ao hospedeiro foi observada e pode ser explicada devido ao efeito diferencial da temperatura sobre as linhagens em relação ao hospedeiro de origem: em épocas de alta temperatura, se tem maior intensidade de requeima no tomateiro, e menor em batateira (Maziero *et al.*, 2009). Processo semelhante pode ocorrer com populações de *Alternaria* spp., uma vez que diferenças em relação aos requerimentos ecológicos foram verificadas, apesar de não terem sido tão evidentes.

Esse fato pode ter implicações importantes para o manejo da doença? A seleção de variedades resistentes à pinta preta e o uso de sistemas de previsão da doença baseados na informação de que a pinta preta é severa a 25-28 °C podem não representar acuradamente a realidade. Atualmente, percebe-se que a pinta preta pode ocorrer em maiores intensidades em diversas épocas do ano, no entanto as diferenças aqui

encontradas entre as espécies, em relação às diferentes temperaturas, não demandam um controle diferente do que já tem sido proposto para *A. solani*.

No experimento *in vitro*, isolados de *Alternaria* spp. foram afetados pela temperatura, sendo possível observar o efeito diferencial da temperatura. Isolados de *A. grandis* tiveram maiores valores de AACCM e temperatura ótima de crescimento a 24°C, semelhante a *A. solani*, já os isolados de *A. tomatophila* apresentaram crescimento intermediário em relação às duas espécies e crescimento ótimo a 26°C. A temperatura ótima para o crescimento micelial foi semelhante entre as espécies, no entanto, em temperaturas baixas, isolados de *A. grandis* tiveram valores altos de AACCM.

Fancelli (1991) verificou que isolados de *A. solani* oriundo do tomateiro crescem mais rapidamente que os de batateira. Porém, a avaliação foi realizada considerando apenas um dia de crescimento, não havendo acompanhamento do crescimento diametral no tempo. A variabilidade entre isolados quanto a essa variável pode ter levado a divergência de resultados. Na tese da referida autora, relata-se a ocorrência de variabilidade, onde isolados oriundos do tomateiro cresceram menos que alguns oriundos da batateira (Fancelli, 1991). Além disso, os isolados utilizados no seu experimento pertencem a uma única região geográfica, não sendo assim representativos. Isolados de uma mesma região tendem a se comportarem de forma semelhante devido ao processo de adaptação pelo qual esses passaram. No experimento realizado no presente estudo, utilizaram-se isolados de diferentes regiões, sendo esses representativos para cada espécie.

Além da temperatura, a umidade é necessária para o estabelecimento de epidemias. Maiores valores de frequência de infecção para *A. grandis* e *A. tomatophila* ocorreram nos maiores PMF. Porém, constatou-se haver, também, influência da temperatura pós-inoculação no componente FI. Devido às diferenças de condições climáticas no E1 e E2, o processo de infecção de *Alternaria* spp. variou com a época e com o hospedeiro nas quais foram inoculadas. O desenvolvimento da pinta preta no E2 foi mais lento, mesmo quando o PMF foi 24 h. Fato semelhante foi observado na análise do progresso da pinta preta em condições de campo na região de Viçosa (Salustiano *et al.*, 2006). Considerando o binômio temperatura-umidade, a temperatura foi a variável mais limitante para o desenvolvimento de *Alternaria* spp., a temperatura pode ter influenciado na germinação dos conídios, uma vez que mesmo na presença de umidade, em baixas temperaturas, os conídios precisam de um intervalo de tempo maior para

germinar e estando esses expostos ao ambiente, muitos podem morrer. Essa informação deve ser levada em consideração no manejo da doença, por exemplo, para o uso de sistemas de previsão desenvolvidos com base no efeito da temperatura sobre a germinação, além disso, nessa época, a aplicação de fungicida pode ser realizada com menor frequência.

Os efeitos da duração dos PMF sobre a FI das três espécies estudadas foram semelhantes no E1 e E2. Percebe-se que a partir do PMF de 12h há uma tendência de estabilização de FI, o que indica que 12h de molhamento foliar são suficientes para o desenvolvimento da pinta preta independentemente da espécie de *Alternaria*.

Alternaria solani é considerado como menos exigente quanto à duração do PMF que outros fungos fitopatogênicos, pois o patógeno pode infectar o hospedeiro e esporular em regimes de orvalho interrompido por períodos secos (Bashi & Rotem, 1974). Espera-se que efeito similar ocorra com *A. grandis* e *A. tomatophila*. Por essa razão, o experimento foi planejado para detectar eventuais diferenças entre espécies sob condições limitantes, com períodos de curta duração de molhamento foliar. Tal propósito foi alcançado, uma vez que houve interação entre espécies de *Alternaria* x hospedeiro. Quando o PMF foi de 2 h, o valor médio de FI de *A. grandis* em batateira foi maior que o das demais espécies. Não foram observadas diferenças entre isolados de *Alternaria* spp. quando inoculados em tomateiro e mantidos nos mesmos PMF imediatamente após a inoculação. Vloutoglou & Kalogerakis (2000) verificaram que não houve o desenvolvimento de *A. solani* em tomateiro na ausência de molhamento foliar ou quando o PMF foi inferior a 4 h. Dessa forma, se as condições para infecção forem limitantes, principalmente quanto à duração de PMF, acredita-se que os conídios de *A. grandis* germinem e infectem mais rapidamente que os de outras espécies; o que contribuiria para a maior prevalência dessa espécie na área. Assim, a pinta preta pode ocorrer mesmo em épocas mais secas.

Em batateira, observa-se que há uma nítida diferença entre as espécies, o mesmo é factível para o tomateiro. Talvez a diferença entre as espécies em tomateiro poderia ter sido verificada se tivesse utilizado plantas em estágio fenológico mais avançado, como foi para a batateira.

No E2, em tomateiros inoculados com o isolado de *A. solani* não foi observado sintomas da doença. Dois fatores podem ter contribuído para este resultado: a menor suscetibilidade da variedade e o efeito das temperaturas baixas durante a infecção. A temperatura parece ter sido o fator mais limitante. Épocas do ano com temperaturas e

umidade relativa baixas seriam menos favoráveis à ocorrência de pinta preta. Porém, esta resposta é dependente da suscetibilidade da variedade. Em condições climáticas desfavoráveis, *A. solani* infectou batateira, seu hospedeiro de origem, mesmo com PMF de apenas 2h. Haveria, portanto, diferenças de *A. grandis* quanto aos requerimentos ecológicos comparados àqueles estabelecidos para a pinta preta causada por *A. solani*, considerada doença tipicamente de verão chuvoso. De fato, produtores de batata vêm observando aumento na intensidade da pinta preta em qualquer época do ano.

Neste experimento, valores de FI encontrados foram muito altos, diferente do já relatado em estudos com *A. solani* (Silva, 2006). Dois fatos associados à metodologia podem ter contribuído para essa diferença. No trabalho de Silva (2006), utilizaram-se colônias com 8 dias de idade, para esporulação em condições de fotoperíodo de 12 h. Sob tais condições, não há tempo suficiente para maturação dos conídios, o que pode ter comprometido a capacidade de infectar as plantas. O estado fisiológico do patógeno pode afetar a agressividade, principalmente, os efeitos das condições de armazenamento e multiplicação (Pariaud *et al.*, 2009). Outro fator a ser considerado é a quantificação do número de conídios depositados nos folíolos. No presente trabalho, o processo de lavagem dos folíolos pode ter contribuído para obtenção de número baixo de conídios depositados, aumentando assim o valor de FI. No entanto, em outro experimento realizado, constataram-se altos valores de germinação, de conídios de *Alternaria*, com apenas 2 h de incubação (55 % de conídios germinados), sendo que após 8 h de incubação, 75 % dos conídios estavam germinados (dados não publicados). Dentre os conídios germinados, a percentagem dos com 1, 2, 3 ou mais tubos germinativos após 2 h de incubação foi 48,3; 26,0; 16,4 e 9,3%, respectivamente. Após 8 h de incubação, a percentagem de conídios nas classes descritas foi 36; 25,4; 18,3 e 20,41%, respectivamente (dados não publicados). No estudo histopatológico do processo de infecção de *A. solani* em diferentes cultivares de batata verificou-se haver, em média, 3,2 tubos germinativos por conídio (Dita *et al.*, 2007). A inoculação de conídios maduros, bem formados, com vários tubos germinativos pode ter contribuído para maior eficiência de FI encontrados neste trabalho.

Dada a importância do PMF no desenvolvimento da doença, a implementação de práticas capazes de reduzir o tempo de molhamento foliar podem contribuir para minimizar a intensidade da pinta preta, ou favorecer o atraso da epidemia, uma vez que o PMF interfere no PI. Para as três espécies estudadas, menores valores de PI foram verificados em batateira e para o PMF de 24 h independente do hospedeiro; e os

maiores em tomateiro e para o PMF de 2 h independente do hospedeiro. O PI para *A. tomatophila* em batateira foi mais curto que o de *A. grandis*. No geral, praticamente não houve diferença de PI em um hospedeiro quando inoculado com as diferentes espécies. Para o patossistema *A. brassicicola* x brássicas observou-se baixa variabilidade entre os isolados do patógeno quando inoculados num mesmo hospedeiro (Michereff *et al.*, 2003). Os autores ressaltam que a escolha do intervalo de avaliação afetou a quantificação do PI e que intervalos mais frequentes permitiriam detectar melhor as variações existentes. No caso de *A. grandis* e *A. tomatophila* o desenvolvimento de sintomas é rápido. Necrose de células no sítio de inoculação podem ser visualizadas após 12 h de incubação. Se há diferenças entre espécies quanto ao PI, por se tratar de patógenos de ciclo curto, a detecção de variações requererá quantificação mais acurada deste componente com mensuração a intervalos mais frequentes, preferencialmente, a cada 2 h.

Possíveis diferenças de agressividade entre *A. grandis* e *A. tomatophila* que potencialmente estariam associadas à preferência por hospedeiro foram constatadas entre os isolados brasileiros destas espécies. Em diversos trabalhos já foi relatado que *A. solani* causa pinta preta em batateira e tomateiro e que ha associação de populações desse patógeno a hospedeiro (Weir *et al.*, 1998, Martínez *et al.*, 2004). Até o momento, nenhum estudo sobre agressividade foi conduzido com isolados de *A. grandis*, mas com base nos componentes avaliados no presente trabalho, essa espécie foi mais agressiva no seu hospedeiro de origem, apesar de também causar doença em tomateiro.

Para *P. infestans* além da especificidade ao hospedeiro ter sido comprovada devido a diferenças na agressividade (Suassuna *et al.*, 2004), diferenças quanto aos requerimentos ecológicos foram claramente observadas (Maziero *et al.*, 2009). Isolados da linhagem clonal que causa requeima em tomateiro apresentaram temperatura ótima, para o desenvolvimento de lesão, diferente da linhagem clonal que causa requeima em batateira (Maziero *et al.*, 2009). Tais diferenças não foram observadas para *Alternaria* spp. no entanto em condições limitantes foi observado a maior agressividade de cada espécie no seu hospedeiro de origem. Sistemas de manejo da pinta preta baseados em efeitos das variáveis temperatura e umidade relativa podem ser empregados em programas de controle das epidemias.

Diferenças quanto aos requerimentos ecológicos exibidos pelas espécies podem contribuir para a especificidade ao hospedeiro. Apesar de detectada diferenças quanto às características morfológicas e moleculares (Rodrigues, 2009) nenhum estudo sobre

agressividade havia sido realizado com *A. grandis* e *A. tomatophila*. No presente estudo sobre agressividade, verificou-se que há evidências de preferência ao hospedeiro e informações importantes sobre a agressividade de *Alternaria* spp. e condições climáticas no desenvolvimento da doença foram identificadas. Isolados de *Alternaria* spp. foram mais agressivos em batateira, contudo apesar de a variedade utilizada ser muito suscetível, esse resultado parece representar e explicar o que atualmente está ocorrendo nas áreas de produção. A maior agressividade dos isolados e/ou a seleção de populações do patógeno resistentes a fungicidas podem estar relacionados com este aumento. Contudo são necessários estudos com componentes de agressividade, sob condições de campo para testar esta hipótese.

6. CONCLUSÕES GERAIS

1. Isolados de *Alternaria* spp. foram mais agressivos em batateira do que em tomateiro.
2. Há evidência de preferência por hospedeiro para as populações brasileiras de *Alternaria* spp. associadas à pinta preta em batateira e tomateiro.
3. A temperatura e o período de molhamento foliar influenciaram a área da lesão e a frequência de infecção, respectivamente, porém o efeito variou conforme a combinação espécie – hospedeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrianual, 2008. FNP. Consultoria e comércio. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2007.
- Andrison, D., 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence: The need for precision. *Phytopathology* 83: 889-890.
- Andrade D. F. A. A., 1997. Previsão e controle químico da pinta preta (*Alternaria solani* Sorauer), sob dois sistemas de condução do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, tese de mestrado.
- Batista, D. C., Lima, M. A., Haddad, F., Maffia, L. A. & Mizubuti, E. S. G., 2006. Validation of decision support systems for tomato early blight and potato late blight, under Brazilian conditions. *Crop Protection* 25: 664-670.
- Bashi, E. & Rotem, J., 1974. Adaptation of four pathogens to semi-arid habitats as conditioned by penetration rate and germinating spore survival. *Phytopathology* 64: 1035-1039.
- Bonde, R., 1927. Variation of strains of *Alternaria solani* isolated from lesions on potato tubers. *Phytopathology* 17:56.
- Bonde, R., 1929. Physiological strains of *Alternaria solani*. *Phytopathology* 19: 533-548.
- Burton, W.G., 1981. Challenges for stress physiology in potato. *American Potato Journal* 58: 3-14.
- Campbell, C. L. & Madden, L. V., 1990. Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley & Sons, 532-195.
- Carlisle, D. J., Cooke, L. R., Watson, S. & Brown, A. E., 2002. Foliar aggressiveness of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans* on detached leaflets of three potato cultivars. *Plant Pathology* 51: 424-434.
- Castro, M. E. A., 1997. Resistência do tomateiro (*Lycopersicon* spp.) à “pinta-preta” (*Alternaria solani* (Ellis & Martins) Jones & Grout). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, tese de Doutorado.
- Castro, M. E. A., Zambolim, L., Chaves, G. M., Cruz, C. D. & Matsuoka, K., 2000. Variabilidade patogênica de *Alternaria solani*, agente causal da pinta-preta do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 8: 24-28.
- Chacón, M. G., Andrade-Piedra, J. L., Gessler, C. & Forbes, G. A., 2007. Aggressiveness of *Phytophthora infestans* and phenotypic analysis of resistance in wild *Petota* accessions in Ecuador. *Plant Pathology* 56: 549-561.
- Dita-Rodríguez, M. A., Brommonschenkel, S. H., Matsuoka K. & Mizubuti, E. S. G., 2006. Components of resistance to early blight in four potato cultivars: effect of leaf position. *Journal of Phytopathology* 154: 230-235.
- Dita, M. A., Brommonschenkel, S. H., Matsuoka K. & Mizubuti, E. S. G., 2007. Histopathological study of the *Alternaria solani* infection process in potato cultivars with different levels of early blight resistance. *Journal of Phytopathology* 155: 462-469.

- Duarte, H. S. S., 2009. Resistência de cultivares de batata a queima. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, tese de mestrado.
- Fancelli, M. I., 1991. Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *A. solani* f. sp. *lycopersici* N. F. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, tese de doutorado.
- Filgueira, F. A. R., 2007. Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ª edição, editora UFV, Viçosa. 421-162.
- Frazer, J. T., 2002. Two species of *Alternaria* cause early blight of potato, (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). Ithaca: Cornell University, tese de mestrado.
- Frazer, J. T. & Zitter, T. A., 2003. Two species of *Alternaria* cause early blight of potato, (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Phytopathology* (suppl. 3), 93.
- Griffiths, H. M. & Jones, D. G., 1987. Components of partial resistance as criteria for identifying resistance. *Annals of Applied Biology* 110: 603-610.
- Guenther, J. F., Wiese, M. V., Pavlista, A. D., Sieczka, J. B. & Wyman, J., 1999. Assessment of pesticide use in the US potato industry. *American Journal of Potato Research* 76: 25-29.
- Henning, R. G. & Alexander, L. J., 1952. Evidence of existence of physiologic races of *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout. *Phytopathology* 42: 467.
- Henning, R. G. & Alexander, L. J., 1959. Evidence of existence of physiologic races of *Alternaria solani*. *Plant Disease Reporter* 43: 298-308.
- Higgins, D. J., 1952. Effect of medium on sporulation and pathogenicity of pathogenically different single conidial isolates of *Alternaria solani*. *Phytopathology* 42: 11.
- IBGE, 2008. Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Johnson, R. & Taylor, A. J., 1976. Spore yield of pathogens in investigations of the race-specificity of host resistance. *Annual Review of Phytopathology* 17:97-119.
- Johnson, K. B. & Teng, P. S., 1990. Coupling a disease progress model for early blight to a model of potato growth. *Phytopathology* 80: 416-425.
- Jones, J. B. 1991., Jones, J. P., Stall, R. E. & Zitter, T. A. *Compendium of tomato disease*. St. Paul. APS Press.
- Kato, M., Mizubuti, E.S., Goodwin, S.B. & Fry, W.E., 1997. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology* 87:973-978.
- Kuehl, R. O., 1994. *Statistical principles of research design and analysis*. Duxbury Press, Belmont, CA. 686-240.
- Lehman, J. S. & Shaner, G., 1997. Selection of populations of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* for shortened latent period on a partially resistant wheat cultivar. *Phytopathology* 87: 170-176.
- Lopes, C. A. & Santos, J. R. M., 1994. *Doenças do tomateiro*. Brasília: EMBRAPA – CNPH.

- Lourenço Jr., V., Moya, A., González-Candelas, F., Carbone, I., Maffia, L. A. & Mizubuti, E. S. G., 2009. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. *Phytopathology* 99: 765-774.
- Mantecón, J. D., 2007. Potato yield increases due to fungicide treatment in Argentinian early blight (*Alternaria solani*) and late blight (*Phytophthora infestans*) field trials during the 1996-2005 Seasons. *Plant Health Progress* online, doi:10.1094/PHP-2007-0202-01-RS.
- Martínez, S. P., Snowdon, R. & Pons-Kuhnemann, J., 2004. Variability of Cuban and international populations of *Alternaria solani* from different hosts and localities: AFLP genetic analysis. *European Journal Plant Pathology* 110: 399-409.
- McDonald, B. A. & Linde, C., 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124: 163-180.
- Maziero, M. J., Maffia, L. A. & Mizubuti, E. S. G., 2009. Effects of temperature on events in the infection cycle of two clonal lineages of *Phytophthora infestans* causing late blight on tomato and potato in Brazil. *Plant Disease* 93: 459-466.
- Mello, S. C. M., Ribeiro, Z. M. A., Souza, G. R., Tigano, M., Nachtigal, G. F. N. & Fontes, E. M., 2001. Padrões isoenzimáticos e morfológicos de isolados de *Alternaria* spp. patogênicos a *Senna obtusifolia*. *Fitopatologia Brasileira*, 26: 667-669.
- Michereff, S. J., Noronha, M. A., Rocha Jr, O. M., Silva, J. A. & Mizubuti, E. S. G., 2003. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira* 28: 656-663.
- Milus, E. A., Seyran, E. & McNew, R., 2006. Aggressiveness of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* isolates in the south-central States. *Plant Disease* 90: 847-852.
- Naika, S., Jeude, J. V., Goffau, M., Hilmi, M. & van Dam, B., 2006. A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. *Agrodok 17*. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 104.
- Nascimento, A. R. P., 2005. Cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) da videira (*Vitis* spp.): métodos de preservação e crescimento de isolados; escala diagramática e reação de variedades de videira à doença. Recife: Universidade federal Rural de Pernambuco, tese mestrado.
- Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J. & Iannou, C., 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* 58: 409-424.
- Parlevliet, J. E., 1979. Components of resistance that reduce of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* 17:203-222.
- Paul, P. A., Vale, F. X. R., Coelho, R. R., Zambolim, L., Fontes, P. C. R. & Macabeu, A. J., 1998. Epidemiologia comparativa da pinta preta do tomateiro (*Alternaria solani*) sob quatro regimes de pulverização. *Fitopatologia Brasileira* 23: 267.
- Paula, R. S. & Oliveira, W. F. 2003. Resistência de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) ao patógeno *Alternaria solani*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 33 : 89-95.
- Pound, G. S., 1951. Effect of air temperature on incidence and development on the early blight disease of tomato. *Phytopathology* 41: 127-135.

- Rodrigues, T. T. M. S., 2009. Morphological, molecular characterization, and inference about recombination, for species of *Alternaria* related to early blight of potato and tomato. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, tese de doutorado.
- Rotem, J., 1966. Variability in *Alternaria porri* f. *solani*. Israel Journal of Botany 15: 48-57.
- Rotem, J., 1994. The genus *Alternaria* biology, epidemiology, and pathogenicity. APS Press, St. Paul. 326.
- Salustiano, M. E., 2000. Progresso da pinta-preta do tomateiro em cultivares de tomate em diferentes épocas de plantio. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, tese de doutorado.
- Salustiano, M. E., Vale, F. X. R. V., Zambolim, L. & Fontes, P. C. R., 2006. Tomato blight management in low temperature periods. Summa Phytopathologica 32: 353-359.
- Shaner, G. & Finney, R. E., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67: 1051-1056.
- Shuman, J. L. & Christ, B. J., 2005. Integrating a host-resistance factor into the Fast system to forecast early blight of potato. American Journal of Potato Research 82: 9-19.
- Silva, C. F. B., 2006. Características culturais e agressividade de isolados de *Alternaria solani* de batateira e tomateiro. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, tese de mestrado.
- Simmonds, N.W., 1971. The potential of potatoes in the tropics. Tropical Agriculture, 48: 291-299.
- Simmons, E. G., 1997. *Alternaria* themes and variations (151-223). Mycotaxon 65: 1-91.
- Simmons, E. G., 2000. *Alternaria* themes and variations (244-286) species on *Solanaceae*. Mycotaxon 75: 1-115.
- Stevenson, R. F. & Pennypacker, S. P., 1998. Effect of radiation, temperature and moisture on conidial germination of *Alternaria solani*. Phytopathology, St. Paul, 78: 926-930.
- Strandberg, J. O., 1992. *Alternaria* species that attack vegetable crops: biology and options for disease management. In: Chelkowski, J. & Visconti, A. *Alternaria* biology, plant disease and metabolites. Amsterdam: Elsevier, 175-208.
- Suassuna, N. D., Maffia, L. A. & Mizubuti, E. S. G., 2004. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. Plant Pathology 53: 405-413.
- Töfoli, J. G. & Kurozawa, C., 1993. Avaliação da resistência de cultivares e híbridos de tomateiro à pinta preta (*Alternaria solani*). Summa Phytopathologica, 19: 39-40.
- Töfoli, J. G., Domingues, R. J., Garcia Junior, O. & Kurozawa, C., 2003. Controle da pinta preta do tomateiro por fungicidas e seus impactos na produção. Summa Phytopathologica 29: 225-233.
- Tokeshi, H. & Carvalho, P. L. T., 1980. Doenças do tomateiro. In: Manual de fitopatologia, Ed. Agronômica. Ceres Ltda., São Paulo, p.511-52.
- Ward, D. M., Cohan, F. M., Bhaya, D., Heidelberg, J. F., Kuhl, M. & Grossman, A., 2008. Genomics, environmental genomics and the issue of microbial species. Short Review, Heredity 100: 207-219.

Weir, T. L., Huff, D. R., Christ, B. J. & Romaine, C. P., 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia* 90: 813-821.

Van Der Walls, J. E., Korsten, L. & Slippers, B., 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from Potatoes in South Africa. *Plant Disease* 88: 959-964.

Vloutoglou, I., Kalogerakis, S. N., 2000. Effectes of inoculum concentration, wetness duration and plant age on development of early blight (*Alternaria solani*) and on shedding of leaves in tomato plants. *Plant Pathology* 49: 339-345.