

**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS, MORFOLÓGICAS E DE
PATOGENICIDADE DE *Alternaria brassicicola*, AGENTE DE
MACHAS FOLIARES EM BRASSICAS**

MÁRIO JOSÉ KOKAY BARRONCAS

Monografia apresentada a Faculdade de
Ciências Agrárias, da Fundação
Universidade do Amazonas, para
obtenção do grau de Engenheiro
Agrônomo

T
012/98

Manaus

Amazonas - Brasil

Agosto - 1998

MÁRIO JOSÉ KOKAY BARRONCAS

Orientador: ANANIAS ALVES CRUZ

Co-orientador: JOSÉ ODAIR PEREIRA

Monografia apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias, da Fundação Universidade do Amazonas, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Manaus

Amazonas - Brasil

Agosto - 1998

ÍNDICE

	Página
DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	17
3.1 OBTENÇÃO DO ISOLADO.....	17
3.2 ISOLAMENTO DO PATÓGENO.....	17
3.3 TESTE DE PATOGENICIDADE.....	19
3.3.1 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO DAS PLANTAS.....	19
3.3.2 CONFIRMAÇÃO DA PATOGENICIDADE.....	20
3.4 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS.....	21
3.5 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DO ISOLADO.....	23
3.5.1-EFEITOS DE MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS NO CRESCIMENTO, ESPORULAÇÃO E CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DO FUNGO.....	23
3.5.2-PLAQUEAMENTO E INOCULAÇÃO DOS MEIOS.....	24
3.6-CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO ISOLADO.....	29
3.6.1-INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA MORFOLOGIA DOS CONÍDIOS.....	29
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1-TESTE DE PATOGENICIDADE.....	31
4.2-CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DO ISOLADO.....	32
4.2.1- EFEITO DO MEIO DE CULTURA SÓLIDO NO CRESCIMENTO MICELIAL DO PATÓGENO.....	32
4.2.2-EFEITO DO MEIO DE CULTURA SÓLIDO NA ESPORULAÇÃO DO PATÓGENO.....	39
4.2.3-CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DE <i>A. brassicicola</i>	40
4.2.4-EFEITO DO MEIO DE CULTURA SÓLIDO NO TAMANHO E NÚMERO DE SÉPTOS DO CONÍDIO.....	41
5-CONCLUSÕES.....	47
6-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	49
7-ANEXO.....	55

A minha mãe Sônia e a meu pai Lucy, pelo incentivo e apoio que, em detrimento de seus próprios anseios, dedicaram-se ao êxito de minhas realizações, aos meus irmãos pelo entusiasmo e a minha Esposa Priscila pela paciência e compreensão que tem-se dedicado ao êxito de minhas realizações.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Ao Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental - CPAA.

Aos professores Ananias Cruz e José Odair, pelas orientações e sugestões no decorrer dos trabalhos.

Aos Drs. Antelmo Melo, Cláudio Izel e Gilvam Coimbra, pelo apoio e amizade.

Aos colegas laboratoristas Aldinea Correa e Ricardo Rebelo, pelo auxílio técnico.

Aos companheiros técnicos agrícolas do CPAA, em especial ao Nilo, Sabino, Ernane, Ednilson e Luis Andrade, pela boa convivência e amizade durante inúmeros finais de semana de trabalho.

Ao meu colega e compadre Raimundo Álvaro, pela sinceridade e boa amizade.

Ao meu sobrinho Ângelo Renê, pelo apoio dado através da informática.

Aos colegas Doralice (Dorinha) e Raimundinho, pela amizade.

Ao amigo “Tirico” pelas belas imagens das estruturas do fungo.

Finalmente a todos que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

TABELA

	Página
4.1-Crescimento radial em mm de <i>A. brassicicola</i>	32
4.2-Crescimento em área (mm ²) de <i>A. brassicicola</i>	33
4.3-Médias para efeito de crescimento (mm) de <i>A. brassicicola</i> em diferentes meios de cultura, aos 14 dias de incubação.....	35
4.4- Médias para efeito de crescimento (mm ²) de <i>A. brassicicola</i> em diferentes meios de cultura, aos 14 dias de incubação.....	36
4.5-Médias para efeito dos meios de cultura na esporulação de <i>A. brassicicola</i> , aos 14 dias de incubação.....	39
4.6-Médias para efeito dos meios de cultura no comprimento e largura dos conídios de <i>A. brassicicola</i> , aos 14 dias de incubação.....	42
4.7-Médias para efeito dos meios de cultura no número de septos dos conídios de <i>A. brassicicola</i> aos 14 dias de incubação.....	46
7.1-Características culturais de <i>A. brassicicola</i> , em diferentes meios de cultura.....	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

	Página
1-Sintomas induzidos em folhas de couve (<i>Brassica oleracea</i> var <i>acephala</i>) com <i>A. brassicicola</i>	21
2-Aspecto cultural da colônia de <i>A. brassicicola</i> em BDA.....	26
3-Aspecto cultural da colônia de <i>A. brassicicola</i> em TDA.....	27
4-Aspecto cultural da Colônia de <i>A. brassicicola</i> em MDA.....	27
5-Aspecto cultural da colônia de <i>A. brassicicola</i> em V.4-Ágar.....	28
6-Aspecto cultural da colônia de <i>A. brassicicola</i> em LDA.....	28
7-Crescimento micelial em mm de <i>A. brassicicola</i> em diferentes meios de cultura.....	33
8-Crescimento micelial em mm ² de <i>A. brassicicola</i> em diferentes meios de cultura.....	34
9-Esporulação de <i>A. brassicicola</i> em diferentes meios de cultura.....	41
10-Conídios maduros e novos. Detalhe: germinação de conídios a partir de outro conídio.....	43
11-Hifas, conidióforos e conídios de <i>A. brassicicola</i> . Detalhe: apenas um conídio apresenta septo longitudinal.....	43
12-Conídios escuros com 2 e 3 septos transversais em cadeia.....	44
13-Conídios maduros e imaturos apresentando médias de 1 a 3 septos.....	.44

RESUMO

Neste trabalho, foram estudadas as características fisiológicas, morfológicas e de patogenicidade de *Alternaria brassicicola*, agente de manchas foliares em brássicas. Foram testados 05 meios de cultura diferentes: Batata-dextrose-ágar (BDA); Trigo-dextrose-ágar (TDA); Milho-dextrose-ágar (MDA); Suco V.4-ágar (V.4-Ágar) e Levedura-dextrose-ágar (LDA). As características fisiológicas do isolado foram determinadas em relação aos parâmetros de crescimento micelial, produção de conídios (esporulação) e características culturais, de acordo com o tipo de meio de cultura utilizado. As características morfológicas do fungo foram avaliadas através do tamanho e número de septos do conídio. O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado, constituído de 5 tratamentos, representados pelos meios de cultura, e 3 repetições para fisiologia e 50 para morfologia. O isolado de *A. brassicicola* mostrou-se altamente patogênico quando inoculado em plantas saudáveis de couve. Os meios de cultura sólidos BDA, V.4-Ágar e TDA proporcionaram as maiores taxas de crescimento do fungo. Os meios LDA, BDA, V.4-Ágar e TDA, nessa ordem, apresentaram os maiores comprimentos de conídios, porém, todos dentro do tamanho estabelecido para a espécie.

1. INTRODUÇÃO

Na família Cruciferae estão incluídas diversas plantas, destacando-se como mais importantes as do gênero *Brassicae*. Nesse gênero estão agrupadas algumas culturas que são amplamente cultivadas em todos os estados brasileiros, sobressaindo-se as couves (couve-comum, couve-manteiga e couve-flor), nabos, repolhos, mostardas. (FILGUEIRAS, 1972)

A importância dessas plantas, também chamadas folhosas, advém do seu inegável valor nutritivo, entre as hortaliças, além de apresentar características de alto rendimento por unidade de área, proporcionando grande quantidade de alimentos. Um exemplo é o repolho, que chega a produzir, em média, 60 t/ha (VENTURA & COSTA, 1995).

Entre os cuidados na exploração comercial de brássicas, são essenciais a observância de aspectos técnicos, como a escolha de sementes saudáveis, provenientes de cultivares produtivas e adaptadas a cada região, época de plantio, espaçamento, condições de solo adequadas, condições climáticas apropriadas e, principalmente, o controle de pragas e doenças. Isso porque os prejuízos diretos e indiretos delas decorrentes podem significar o fator limitante na produção da hortaliça (MATSUOKA, *et al.*, 1985).

As doenças em hortaliças são bastante comuns e respondem por enormes perdas de produção. Segundo VENTURA & COSTA (1995), apesar da diversidade das espécies agrupadas no gênero *Brassicae*, a maior parte das doenças é comum a todas as culturas, variando o grau de importância da doença de acordo com a região de cultivo.

No estado do Amazonas não são encontrados dados quantitativos sobre prejuízos causados por doenças que afetam as culturas de brássicas. O Anuário Estatístico do IBGE, ano 1993, na seção Produção Agrícola, não traz nenhum dado ou informação sobre a área plantada e quantidade produzida de brássicas nos estados brasileiros. Sabe-se, no entanto, que tanto em ecossistema de várzea como em terra firme, onde o cultivo dessas folhosas é feito de maneira intensivo, em hortas comerciais situadas na periferia de Manaus, as doenças, têm ocupado lugar de destaque na composição dos custos de produção.

Os prejuízos diretos e indiretos à cultura de brássicas são representados pela queda de produção e produtividade nas áreas de cultivo, e na falta de adoção de medidas de controle. As medidas de controle incluem quase sempre a pulverização sistemática com fungicidas cúpricos, durante quase todo o ciclo da cultura, o que onera bastante a produção, limitando a expansão da cultura no estado do Amazonas (Levantamento preliminar realizado entre pequenos produtores do município do Careiro da Várzea, CRUZ, 1996, informação pessoal).

Entre as doenças que mais limitam a produção de brássicas estão as manchas provocadas por duas espécies fúngicas do gênero *Alternaria*: *A. brassicae* e *A. brassicicola* (TOKESHI & SALGADO, 1980).

Nas condições do Sudeste brasileiro, e no estado de Minas Gerais, em particular, prevalecem manchas induzidas por *A. brassicae*. A doença se reveste de grande importância nas regiões de cultivo, devido aos altos índices de severidade, proporcionados pela transmissão do patógeno por sementes e, conseqüentemente pelos danos causados na sementeira (TOKESHI & SALGADO, 1980).

Os sintomas induzidos por *A. brassicae* diferem bastante daqueles produzidos por *A. brassicicola*. Em *A. brassicae* os sintomas apresentam-se sob forma de manchas foliares de coloração marrom-oliváceas arredondadas, apresentando zonas ou anéis concêntricos. Em infecções severas, as manchas coalescem e a folha amarelece e seca. Os sintomas causados por *A. brassicicola* são caracterizados por manchas menores e mais escuras. Na sementeira pode ocorrer tombamento, nanismo de mudas e necrose dos cotilédones e do hipocótilo (MATSUOKA, *et al.*, 1985; TOKESHI & SALGADO, 1980).

Segundo KOIKE (1994), as duas espécies de *Alternaria* afetando brássicas produzem sintomas idênticos. Tanto *A. brassicae* quanto *A. brassicicola* produzem manchas pequenas, escuras a princípio, sobre as folhas, evoluindo para manchas maiores, circulares, de mais ou menos 0,25-0,5 mμ de diâmetro. Se as condições forem favoráveis, os esporos verde-escuros do patógeno crescerão sobre as manchas de tecido central necrosado, na forma de anéis concêntricos.

A. brassicicola encontra-se largamente distribuída em todas as regiões onde são cultivadas brássicas. *A. brassicae*, porém, é de ocorrência mais restrita (ROTEM, 1994).

No sul do país, *A. brassicicola* parece ser mais severa em couve-flor, causando numerosas manchas negras que inutilizam o produto para o comércio. Esta mesma espécie é citada como limitante da produção de sementes de repolho, embora que, segundo TOKESHI & SALGADO (1980), os sintomas não sejam tão severos nessa cultura.

Nas condições amazônicas, *A. brassicicola* é de ocorrência generalizada e se dissemina pelo vento, sendo a doença favorecida pela

combinação de altas temperaturas e alta umidade relativa, condições predominantes na região (CRUZ, informação pessoal).

O estudo das características culturais, morfológicas e de patogenicidade de um determinado fungo fitopatogênico é de importância fundamental. Isso porque propicia medidas de controle adequadas e provê informações básicas para reconhecimento e identificação de espécies ou raças fitopatogênicas, predominantes numa região e produção de inóculo visando a obtenção de variedades resistentes aos patógenos (VIANA, 1988).

O presente trabalho tem por objetivo a identificação e caracterização morfológica e fisiológica do agente causal da mancha de *Alternaria*, predominante nas condições amazônicas. Também objetiva a seleção de um meio de cultura para crescimento e esporulação do patógeno. Estes estudos formarão a base de conhecimento para futuras investigações visando a identificação de raças fisiológicas e a seleção de variedades de brássicas resistentes ou tolerantes ao patógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Alternaria* foi estabelecido em 1817 por Nees (*Apud* JOLY, 1964), tendo como parâmetro a descrição de uma única espécie, *A. tenuis*. De acordo com ELLIS, (1971), o gênero contém 44 espécies. Outros taxonomistas descreveram outras espécies, aumentando esse número. NEERGAARD (1945), citado por ELLIS (1971), descreveu *A. brassicicola* como *A. oleracea*; JOLY (1964), descreveu a espécie como *A. tenuis*. O agente causal da requeima de batatinha, *A. solani*, foi descrito por

Sorauer, com base em estudos procedidos por NEERGAARD (1945), como *A. porri* f. sp. *solani*, e por JOLY (1964) como *A. dauci* f. sp. *solani*.

WILTSHIRE (1933) retomou os estudos sobre o gênero *Alternaria* e *Microsporium*, formulando os conceitos básicos para o gênero, em vigor até a presente data, embora ainda permaneçam dúvidas e discordâncias em torno de sua classificação em espécies e subespécies. A espécie *A. brassicicola*, estabelecida por WILTSHIRE em 1947, apresenta inúmeras sinonímias, tais como *Helminthosporium brassicicola* Schweintz, (1932; *Macrosporium cheiranthi* Fr. var. *circinans* Berk. & Curt., (1875); *Alternaria circinans* (Berk. & Curt.) Bolle, 1924) e *Alternaria oleracea* (NEERGAARD, 1945).

A. brassicicola foi descrita por ELLIS (1971), causando lesões em forma de manchas com zonas concêntricas em folhas de repolho e couve. Posteriormente, outros pesquisadores descreveram e registraram a ocorrência da doença em vários países e regiões do mundo, como noroeste da Europa, Austrália, Malavi, Malásia, Ilhas Maurício, Nepal, Holanda, Nova Guiné, Nova Zelândia, Nigéria, Rodésia, Romênia, Serra Leoa, África do Sul, Sudão, Tanzânia, Turquia, Uganda, Estados Unidos e Zâmbia (1976).

Segundo AGRIOS (1988), as doenças induzidas por patógenos do gênero *Alternaria* estão entre as mais comuns e importantes do mundo, afetando primariamente folhas, ramos e frutos de plantas anuais, especialmente hortaliças e ornamentais. Também pode afetar plantas frutíferas como citros e macieira.

O patógeno está incluído na classe Deuteromycetes, subclasse Hyphomycetidae, ordem Moniliales, família Dematiaceae, gênero

Alternaria. Apresenta inúmeras espécies fitopatogênicas entre as quais *A. brassicicola* e *A. brassicae* (MENEZES, 1987). A maioria das espécies, porém, é saprófita (ALEXOPOULOS & MIMS, 1974).

Alternaria sp. causa mancha foliar, queima foliar, damping-off de seedlings, podridão do colo, podridão de frutos e tubérculos (AGRIOS, 1988; MENEZES, 1987).

Entre as doenças induzidas pelas várias espécies do patógeno estão a mancha de *Alternaria* do tomateiro, da batata, do tabaco, do gerânio, a queima foliar da cenoura, do cravo, crisântemo, petúnia, zínia e queima ou mancha zonada das crucíferas causada por duas espécies, *A. brassicae* e *A. brassicicola*. (AGRIOS, 1988). Outras doenças causadas por *Alternaria* incluem mancha de *Alternaria* do feijoeiro e mancha púrpura da cebola, causadas por *A. solani* e *A. porri*, respectivamente (MATSUOKA *et al.*, 1985; VENTURA & COSTA, 1995).

A mancha de *Alternaria* em brássicas é conhecida também por queima de *Alternaria* e mancha de *Alternaria*, correspondendo aos sintomas descritos anteriormente (VENTURA & COSTA, 1995).

A existência de variabilidade entre isolados de *A. solani* tem sido evidenciada em níveis morfológico, patogênico, fisiológico e bioquímico (CASTRO, 1997, *apud* BONDE, 1929). Foi demonstrado que isolados de *A. solani*, provenientes de tubérculos de batata, exibiram diferenças quanto à morfologia da colônia, formação de pigmento em BDA, capacidade de esporulação, taxa de crescimento em cultura, frequência de mutação e patogenicidade em tubérculos e folhas excisados.

Com relação às características culturais, fisiológicas e morfológicas do patógeno, alguns autores têm estudado algumas espécies, entre elas *A.*

porri, no que se refere ao efeito de meios de cultura, luminosidade, fontes de carbono e nitrogênio, relação C/N e características morfológicas (VIANA, 1988).

NEERGAARD (1977) listou todas as espécies de *Alternaria* que são patógenos de sementes e prejudicam a germinação por damping-off de pré e pós-emergência. As espécies citadas e seus respectivos hospedeiros são: *A. alternata* (tabaco e berinjela); *A. brassicae* e *A. brassicicola* (brássicas); *A. dianthi* e *A. dianthicola* sobre cravo; *A. porri* sobre cebola e *A. dauci* sobre plântulas de cenoura.

A susceptibilidade das folhas mais velhas à infecção de *Alternaria* é relatada pela maioria dos pesquisadores, sendo verificado em todos os sistemas *Alternaria*-hospedeiro, tais como *A. alternata* -batata-berinjela, *A. brassicicola*-mustarda-couve, *A. brassicae* e *A. brassicicola*-repolho-couve (BABADOOST & GABRIELSON, 1979; BOLKAN, 1983).

ANSARI *et al.* (1989) estudaram os efeitos de alguns fatores ambientais sobre o crescimento e esporulação de *A. brassicae*, constatando influência significativa da luz e nutrientes.

BASSEY & GABRIELSON (1983) estudaram os efeitos da umidade, nível de infecção de sementes, temperatura e estresse por nutrientes provocados por *A. brassicicola* sobre plantas de repolho, tendo encontrado efeito positivo para todos os parâmetros estudados.

No entanto, para a espécie *A. brassicicola*, particularmente, poucas informações foram encontradas na literatura especializada. Como se trata de patógeno importante para brássicas, nas condições de trópico úmido, mais especificamente na Amazônia, esses estudos são importantes, haja vista a

ocorrência generalizada do patógeno no Amazonas e no Amapá (CRUZ, comunicação pessoal; MARTINS & TAKATSU, 1990).

Os fungos, independentes de serem saprófitas, fitopatogênicos ou mutualistas simbióticos, são organismos heterotróficos e, portanto, dependem de um substrato do qual derivam seus requerimentos nutricionais, necessários ao seu crescimento e reprodução (HAWKER, 1950). Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento dos fungos. Entre os fatores ambientais que mais influenciam o crescimento e reprodução dos fungos estão os fatores nutricionais, a temperatura, luminosidade, pH, pressão de oxigênio, umidade relativa, relação C/N, etc (COCHRANE, 1950).

Com relação à nutrição geral dos fungos, HAWKER (1950) afirma que algumas substâncias são mais importantes para os fungos que outras. Entre estas substâncias estão os carboidratos, como fonte primária de carbono, as proteínas, como fonte de nitrogênio, as vitaminas e alguns sais minerais. De acordo com LILLY (1963), todos os compostos carbonados que ocorrem naturalmente são utilizados pelos microrganismos, especialmente os fungos.

Os fungos precisam de carbono e nitrogênio para sintetizar compostos que entram na composição majoritária da parede celular, a quitina e/ou celulose, polissacarídeos complexos (MENEZES, 1987). Os meios de cultura, portanto, devem conter os princípios nutritivos fundamentais para promover o crescimento e a reprodução dos fungos (HAWKER, 1950).

Com relação à nutrição, ANGEL (1929) utilizou cerca de 60 subespécies diferentes no estudo das características culturais de *A. porri*,

verificando que o fungo crescia bem em meios de cultura comuns, principalmente quando os açúcares faziam parte de sua composição.

NOLLA (1927) conduziu trabalhos com *A. allii* utilizando vários substratos. Os estudos mostraram que as características culturais do fungo variaram bastante em função dos meios utilizados (BDA, farinha de milho-ágar, farinha de aveia-ágar e decocto de cebola-ágar). O autor encontrou várias diferenças no aspecto das colônias, principalmente no que se refere à pigmentação do micélio e conídio. Há relatos mencionado a pigmentação do meio por *A. porri* (VIANA, 1988)

MENEZES(1987) descreveu as variações culturais de *Colletotrichum graminicola*. Observou íntima relação da temperatura com a coloração da colônia do patógeno, constatando que o fungo cultivado em BDA e farinha de milho-ágar no escuro, por um período de seis dias, sob diferentes temperaturas, desenvolveu abundante massa micelial. As colônias apresentaram aspecto feltroso, com coloração variando do cinza-esverdeado ao cinza-esbranquiçado. O melhor crescimento foi observado em BDA, à temperatura de 28°C.

NEERGAARD (1945) afirma que *A. porri* produz em meio BDA, micélio aéreo cotonoso, denso, feltroso, com cerca de 2 mm de altura, de cor cinza-pálido a verde-oliva claro, enquanto o micélio submerso é descrito como increspado e radiado, de cor cinza-oliváceo a verde-oliva escuro.

A. porri cresceu profusamente em meios com carboidratos, sendo observado maiores crescimentos em farinha de aveia-ágar, farinha de milho-ágar, Czapeck-ágar, batata-acúcar-ágar e Cook's II-ágar; porém em meio com açúcar, na ausência de amido e proteína, o crescimento foi pobre (NOLLA, 1927).

FAHIM (1966) observou abundante crescimento de *A. porri* em batata-dextrose-ágar (BDA), cebola-ágar e folhas de cebola-ágar. Relatou também bom crescimento micelial em meio de farinha de milho-ágar e crescimento regular em meio Czapeck-ágar. Relata, ainda, que o crescimento micelial diminui à medida que decresce a concentração do extrato de batata no meio.

TABER *et al.* (1968) selecionaram o meio malte-ágar como padrão para estudo do efeito da temperatura no crescimento de três espécies de *Alternaria*.

A taxa de crescimento e produção de conídios nos fungos está relacionada com fatores nutricionais do meio e com a capacidade destes em produzir enzimas capazes de decompor o substrato (VIANA, 1988).

MORETTO & BARRETO (1995) avaliaram o efeito de alguns meios de cultura no crescimento e na esporulação de *A. solani*. Em relação ao desenvolvimento micelial, observaram que BDA + CaCO₃ prejudicou o crescimento inicial do fungo, aos 7 dias, em relação a BDA somente. Porém, aos 10 dias, o crescimento em BDA não diferiu daquele observado em BDA sem CaCO₃. Em MPA (Maltose-peptona-ágar), a adição de CaCO₃ estimulou o desenvolvimento micelial em relação a MPA sem adição de CaCO₃. Em relação à esporulação, BDA adicionado de CaCO₃ imprimiu maior produção de conídios aos 11 dias de incubação.

Segundo HAWKER (1950), o estudo dos fatores que influenciam a esporulação dos fungos é de grande interesse e de importância prática. Entre os fatores ambientais, menciona os meios de cultura e os aspectos nutricionais como condicionantes da esporulação e crescimento.

FAHIM (1966) verificou o efeito de alguns meios de cultura na produção de conídios de *A. porri*, concluindo que o patógeno esporulou melhor em Batata-ágar, observando que a esporulação decrescia à medida que diminuía a concentração do extrato de batata no meio.

LIMA (1982) estudou a influência de diferentes meios de cultura na esporulação de *Stemphylium solani*. Os meios testados foram BDA, Aveia-ágar (MA), Alimento infantil-carbonato de cálcio (MAI) e Maltose-peptona-ágar (MPS). Dentre os meios testados, Maltose-peptona-ágar (MPS) demonstrou ser altamente eficiente na esporulação do fungo, tendo observado conídios em todos os isolamentos já a partir do terceiro dia de incubação.

MINUSSI *et al.* (1977) elegeram o meio artificial V.8-ágar para a realização de estudos do efeito das condições ambientais sobre *A. solani*.

MORETTO & BARRETO (1995) *apud* SHAUIN & SHEPARD (1979), relataram as experiências realizadas por vários pesquisadores que desenvolveram técnicas e artifícios para induzir a esporulação do fungo *A. solani*. Entre as experiências, são registradas irradiações com luz ultravioleta e a exposição do micélio aos raios solares. A luz ultravioleta foi efetiva para indução de conidióforo de *A. solani*, segundo VAKALOUNAKIS (1991). Em relação à luz azul, a mesma tem sido referida por induzir a esporulação em vários fungos, e também como inibidora da formação de conídios em outros, de acordo com relatos de VAKALOUNAKIS (1992). O mesmo autor, citado por MORETTO & BARRETO (1995), desenvolveu uma técnica eficiente e simples para induzir a esporulação de *A. solani*, baseada na inoculação do fungo, aos 4 dias de cultivo, em discos de tecidos esterilizados de solanáceas e

cucurbitáceas, onde massas de conídios eram formadas após 6 dias de incubação, a 20°C e sob luz negra.

SHANIN & SHEPARD (1979) propuseram a utilização de dois meios de cultura em duas etapas para induzir o crescimento e esporulação de *A. solani*. O primeiro meio, chamado de meio de cultura primário, foi utilizado para crescimento micelial e o segundo, para esporulação. O método para esporulação do fungo no último meio foi baseado na transferência de blocos de ágar com micélio, obtidos na primeira etapa, para meio de ágar comum, suplementado com CaCO₃ ou meio de Sacarose-ágar + CaCO₃, e pH ajustado para 7,4 .

MENEZES (1987) realizou estudos sobre a influência de vários meios de cultura na esporulação de *Septoria glycines*. Os meios testados foram Aveia-ágar, BDA, Czapeck-ágar, Extrato de tomate-ágar, Extrato de folha de soja-ágar, Farinha de milho-ágar, Fries-ágar, Sabouraud-dextrose-ágar e Semolina-ágar. O meio de Fries-ágar destacou-se dos demais como o melhor para a esporulação do fungo, acreditando o autor que os efeitos benéficos na esporulação sejam devido à presença de extrato de leveduras (1g) na composição do meio.

MINUSSI *et al* (1977) investigaram a influência de meios de cultura e regimes de iluminação sobre a esporulação de *S. solani*. Os meios de cultura utilizados foram Maltose-peptona-ágar (MPA), com 3 adaptações, e V.8-ágar, com 2 diferentes volumes por placa de Petri. O meio de cultura V.8-ágar foi superior a MPA na produção de conídios, sob escuro constante e, principalmente, com volume de meio de 10 ml e concentração de 10⁴ conídios/ml.

PONTES (1987) *apud* QUEBRAL (1958), relata que tanto em Batata-dextrose-ágar (BDA) como em Aveia-ágar, o fungo *Colletotrichum graminicola* produziu abundante esporulação, constatando melhor crescimento e esporulação do fungo no meio de Aveia-dextrose-ágar (ADA).

VIANA (1988), *apud* HAWKER (1950), LILLY & BARNETT (1963) e COCHRANE (1950), afirma que a capacidade de crescimento radial e de esporulação de uma determinada espécie fúngica é condicionada à sua habilidade na utilização dos componentes dos meios, principalmente carbono e nitrogênio, derivando daí os seus requerimentos nutricionais. Segundo ele, cada espécie fúngica produz um complexo enzimático que permite ao fungo hidrolisar as substâncias essenciais ao seu crescimento e reprodução. Dessa forma, TABER *et al.* (1968) obtiveram melhor desenvolvimento de *A. brassicae* e *A. brassicicola* quando utilizaram nitrato de potássio no meio de cultura, como fonte de nitrogênio. Semelhante resultado foi obtido por TARR & KAFI (1968), ao investigarem o crescimento de cinco espécies de *Helminthosporium*.

Em relação aos carboidratos (açúcares) e sua utilização como fonte de carbono na suplementação de meios de cultura para o crescimento dos fungos, COCHRANE (1950) afirma que D-manose (dextrose) e maltose estão entre os mais eficientes; contudo, há espécies que utilizam bem alguns oligossacarídeos como a dextrina e o amido. Segundo VIANA (1988), as fontes de carbono no meio tiveram maior influência sobre o crescimento de *A. porri*, em relação às fontes de nitrogênio, tendo observado melhor efeito do nitrogênio sobre a esporulação do fungo.

BIGGS (1993) estudou o crescimento micelial e a esporulação de *A. alternata* sobre meio BDA, suplementado com 0, 0,25, 2,5, 25 ou 250 microgramas/ml de iprodione (Rovral 50 WP). De todos os tratamentos, somente isolados resistentes cresceram em BDA suplementado com 25 ou 250 microgramas/ml de iprodione. Com relação à esporulação, os isolados resistentes a iprodione foram bem melhores. Em todos os experimentos, a esporulação dos isolados sensíveis a iprodione, quando plaqueados em BDA, foram superiores aos isolados originais quando plaqueados no mesmo meio.

Com relação à influência de meios de cultura nas características morfológicas de *A. porri*, VIANA (1988) verificou variação no comprimento e na largura dos conídios em diferentes meios de cultura. O autor cita que às mesmas conclusões chegaram ANGEL (1929), JOLY (1964) e NEERGAARD (1945). Dos seis meios de cultura testados, BDA apresentou maior tamanho médio de conídios de *A. porri*. O tamanho médio dos conídios da espécie em BDA foi de 33,49 x 13,92 µm sendo observado que a mais longa faixa de variação no tamanho dos conídios ocorreu em BDA, ou seja, 19,98 a 66,6 µm para comprimento, e 9,99 a 19,98 µm para largura; no entanto, o autor conclui que estas variações situaram-se dentro da variação descrita por NEERGAARD (1945) para a espécie.

O número de septos transversais e longitudinais do corpo dos conídios de *Alternaria* sp varia de acordo com a espécie tratada (ELLIS, 1971; ROTEM, 1994). Para a espécie *A. porri*, VIANA (1988) encontrou 3 e 1 septos transversais e longitudinais, respectivamente, o que está de acordo com a descrição do número de septos da espécie, descrita por NEERGAARD (1945), dando conta de conídios com 3 a 14 septos

transversais e de 0 a 8 septos longitudinais. NOLLA (1929), no entanto, relata a existência de 6 a 12 septos transversais e 1 a 2 septos longitudinais. ELLIS (1971) afirma que a espécie *A. porri* possui conídios com número de septos transversais variando de 7 a 10.

Em relação à *A. brassicicola* e *A. brassicae*, ELLIS (1971) descreve suas estruturas reprodutivas, incluindo conidióforos e conídios. *A. brassicicola*, segundo a descrição, possui conidióforos simples ou em grupos de 2 a 12, septados, comprimento superior a 70 μm e largura variando de 5 a 8 μm . Os conídios não apresentam bico, possuindo célula apical mais ou menos retangular, com 1 a 11 septos transversais, a maioria menos de 6. Os conídios possuem poucos septos longitudinais, mas podem atingir, em caso raro, até 6. A coloração dos conídios é marrom-escuro oliváceo, com 18-130 μm de comprimento e 8 a 20 μm de largura na parte mais dilatada. O bico, quando presente, é uma célula apical que mede 1/6 do corpo do conídio e 6 a 8 μm de largura. A descrição de *A. brassicae* apresenta diferenças marcantes em relação a *A. brassicicola*, e suas estruturas reprodutivas. *A. brassicae* produz conidióforos em grupos de 2 a 10, com comprimento superior a 170 μm e de 6 a 11 μm de largura. Os conídios se apresentam levemente curvos, obclavados, com 6 a 19 (a maioria de 1-15) septos transversais e 0 a 8 septos longitudinais. Apresentam comprimento de 75 a 350 μm e de 20 a 30 μm de largura, às vezes acima de 40 μm , na parte mais dilatada. O bico tem em torno de 1/3 da metade do comprimento do corpo do conídio, e 5 a 9 μm de largura. Os conídios de *A. brassicae* são bem maiores do que os de *A. brassicicola*, possuindo maior número de septos transversais e longitudinais, e uma

característica, fundamental na diferenciação entre as duas espécies: a presença de pronunciado bico.

Existem relatos sobre a variação no tamanho de conídios produzidos em meio de cultura contido em placas de Petri e aqueles oriundos de microcultura, principalmente em relação ao gênero *Colletotrichum* (SUTTON, 1980). Segundo os autores, conídios de *Colletotrichum* sp produzidos em microcultura tenderiam a ser maiores em comprimento e largura, apresentando alguns conídios gigantes, totalmente fora das características das espécies estabelecidas por SUTTON (1980).

VIANA (1988) não observou alterações profundas na morfologia dos conídios de *A. porri*, em diferentes meios de cultura testados. Cita, porém, ANGEL (1929), que encontrou diferenças morfológicas significativas entre conídios de *A. alternata* obtidos de lesões foliares e aqueles produzidos em meio de cultura artificial. O autor cita outros autores como ELLIOT (1949) e KAFI & TARR (1966) que encontraram modificações morfológicas marcantes em conídios de *Helminthosporium*, por influência de meios de cultura, tendo o mesmo sido observado por NEERGAARD (1945), trabalhando com *S. solani*.

Apesar dos vários estudos de fisiologia e morfologia existentes sobre *Alternaria* sp., na literatura especializada não foram encontrados relatos consistentes em relação a *A. brassicicola*. Informações básicas, como condições físicas e ambientais que permitam melhor crescimento e abundante produção de conídios para inoculação, visando desenvolver variedades de brássicas resistentes ao patógeno, são ainda carentes (MENEZES, 1987).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia Agrícola da FCA/FUA, laboratório de Fitopatologia e casa-de-vegetação do Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental (CPAA/EMBRAPA), no período de 15 de agosto a 02 de novembro de 1996.

3.1. Obtenção do isolado

O isolado de *A. brassicicola* foi obtido a partir de folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) apresentando lesões características de manchas de *Alternaria*, resultantes de infecção natural em plantios de campo. O material foi coletado em hortas comerciais situadas na periferia do município de Manaus/AM.

3.2. Isolamento do patógeno

Em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar), fragmentos de tecido foliar de aproximadamente 2,5 a 3,5 mm de diâmetro foram retirados da área de transição entre o tecido sadio e o tecido necrosado, com auxílio de lâmina de bisturi flambado.

Os fragmentos foram colocados em vidro de relógio e a seguir passados em solução de álcool a 70%, durante 30 segundos, com a finalidade de quebrar a tensão superficial e facilitar o contato dos fragmentos com a solução esterilizante, em número de 12; em seguida os

fragmentos foram desinfestados superficialmente numa solução de hipoclorito de sódio (NaClO), preparada na proporção de três partes de água destilada e esterilizada para uma parte do produto comercial (água sanitária a 2% do ingrediente ativo (i.a.) - por 1,5 minutos. A desinfestação superficial teve por objetivo a eliminação de microrganismos secundários e saprófitas presentes no material.

As seções de tecido foliar foram a seguir lavadas em duas porções de água destilada e esterilizada, a fim de remover o excesso da solução desinfestante. Após esse procedimento, o material tratado foi submetido à câmara úmida, formada por placa de Petri contendo camada dupla de papel de filtro qualitativo esterilizado, que foi umedecida com água destilada e esterilizada, com a finalidade de induzir a esporulação do fungo na superfície do tecido lesionado. A incubação foi feita à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2$), sob luminosidade natural (12 h de claro/12 h de escuro).

Após a permanência do material em câmara úmida durante 72 horas, a área das lesões apresentava-se coberta de conídios do patógeno. Com auxílio de binocular estereoscópica (40 X) e estilete flambado, transferiu-se alguns desses conídios, em condições assépticas, para meio BDA contido em placas de Petri e tubos de ensaio. Para obtenção de cultura monospórica, foi preparada, a partir de colônias crescidas em BDA, uma suspensão padrão de conídios em solução esterilizada de Tween-80 a 1%. Essa suspensão foi diluída 3 vezes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) e uma alíquota de 0,2 ml da última diluição foi plaqueada e espalhada sobre meio ágar-água. Após 24 horas, conídios germinados individualmente foram coletados, juntamente com fragmentos de meio, e a seguir, transferidos, em condições assépticas e isoladamente, para placas de Petri contendo meio BDA.

Tubos de ensaio com colônias derivadas de culturas monospóricas foram armazenados em refrigerador a 4°C para serem utilizados nos trabalhos subsequentes.

3.3 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade do isolado foi feito em casa-de-vegetação, utilizando-se plantas de couve de 35 dias de idade, crescidas em vasos contendo uma mistura de terriço e serragem decomposta, esterilizados. O teste foi feito em plantas cultivadas individualmente em cinco vasos.

3.3.1 Preparo do inóculo e inoculação das plantas

Em câmara asséptica, com o auxílio de estilete flambado e resfriado, efetuou-se a transferência de estruturas do patógeno, removidas de um tubo de ensaio para placas de Petri contendo Trigo-dextrose-ágar (TDA). Este meio, em ensaio preliminar, mostrou-se melhor que BDA para produção de conídios do patógeno. As placas foram incubadas sobre bancada de laboratório, à temperatura ambiente, em regime de luminosidade natural alternada (12 h claro/12 h escuro), por 192 horas. Foram preparadas sete placas de Petri como matrizes para produção do inóculo.

Após o período de incubação, adicionou-se a cada uma das placas, 20 ml de água destilada e esterilizada e, a seguir, com auxílio de pincel de pêlos macios, efetuou-se a raspagem superficial da colônia para liberação dos conídios. O material removido foi filtrado em gaze dupla esterilizada, obtendo-se uma suspensão concentrada de conídios, livre de fragmentos de micélio e meio de cultura. A concentração de conídios na suspensão foi determinada utilizando-se câmara de Neubauer (hemacitômetro),

estabelecendo-se uma média para o número de conídios nos dois campos de contagem da câmara.

A suspensão final de conídios foi ajustada para três concentrações: 10^5 , 2×10^5 e 4×10^5 . Adicionou-se a cada uma das suspensões o espalhante Tween-80, na proporção de uma gota para cada 100 ml, com a finalidade de conferir uma distribuição uniforme na área de contagem, e maior adesão dos conídios no tecido do hospedeiro, na inoculação das plantas.

As plantas foram inoculadas em casa-de-vegetação, no estágio de 6 a 8 folhas, através de aspersão foliar das três suspensões de conídios, com auxílio de um atomizador elétrico de pressão, aplicando-se 10 ml de cada suspensão por planta. Cada planta foi inoculada com uma suspensão de conídios nas concentrações supramencionadas. As duas plantas restantes foram inoculadas em ambas as lâminas foliares com água destilada e esterilizada, servindo de testemunhas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida, consistindo de sacos plásticos internamente umedecidos, com a finalidade de propiciar ambiente adequado à germinação e penetração dos conídios no tecido hospedeiro. As plantas permaneceram em câmara úmida por um período de 36 horas, em casa-de-vegetação.

3.3.2 Confirmação da patogenicidade

A confirmação dos Postulados de Koch foi feita mediante a observação das plantas, a partir do 12º dia após a inoculação, para verificação da ocorrência de lesões foliares típicas do patógeno e coleta de material para reisolamento, com a finalidade de confirmar a patogenicidade do isolado de *A. brassicicola* obtido. Os sintomas podem ser vistos na fig.1.



Figura 1 - Sintomas induzidos em folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) inoculadas com *A. brassicicola*

O reisolamento foi efetuado conforme técnica descrita no item 3.2 e, após a identificação do patógeno cultivado em cultura pura (TDA), procedeu-se a repicagem para tubos de ensaio contendo TDA e estocados em geladeira para os estudos posteriores.

3.4. Meios de cultura utilizados

Os meios de cultura utilizados nos testes que compõem este trabalho foram:

a) Meio de Batata-dextrose-ágar (BDA) - TUIITE (1969)

Batata	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	17,0 g
Água destilada q. s. p.	1,0 l

b)Meio de Trigo-dextrose-ágar (TDA) - JOHNSON & CURL (1972)

Germe de trigo	70,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	17,0 g
Água destilada q. s. p.	1,0 l

c)Meio de Milho-dextrose-ágar (MDA) - JOHNSON & CURL (1972)

Farinha de milho	20,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	17,0 g
Água destilada q. s. p.	1,0 l

d)Meio de Suco V.4-ágar (TUIITE, 1969, modificado)

Suco de 4 hortaliças*.....	200,0 ml
CaCO ₃	3,0 g
Água destilada q. s. p.	1,0 l

*O suco vitamínico foi obtido de folhas de couve, cenoura, feijão-vagem e tomate. 50 g de cada hortaliça foram submetidas ao calor de vaporização até o pré-cozimento, cerca de 15 minutos, e então triturados em liquidificador com 200 ml do próprio decocto. O macerado resultante foi filtrado em gaze dupla esterilizada.

e) Meio de Levedura-dextrose-ágar (LDA) - TUIITE (1969)

Extrato de levedura	4,0 g
Dextrose	4,0 g
Extrato de malte	10,0 g
Ágar	17,0 g
Água destilada q. s. p. ...	1,0 l

3.5 Características fisiológicas do isolado

Esta fase do experimento foi fundamentada na capacidade de desenvolvimento do patógeno, determinada em relação aos parâmetros de crescimento micelial, produção de conídios (esporulação) e características culturais, de acordo com o tipo de meio de cultura utilizado.

3.5.1 Efeito de meios de cultura sólidos no crescimento, esporulação e características culturais do fungo

Este experimento teve como objetivo selecionar um meio de cultura sólido para crescimento e esporulação de *A. brassicicola*, além de descrever suas características culturais.

A partir de colônia isolada em tubo de ensaio e em condições assépticas, conforme item 3.1; transferiu-se o fungo para placas de Petri contendo TDA. Utilizaram-se sete placas de Petri com colônias matrizes para inoculação dos meios. Decorridos sete dias, selecionou-se a colônia mais característica do fungo, da qual foi obtida o inóculo utilizado em cada plaqueamento. O inóculo consistiu de um disco de ágar de 5 mm de

diâmetro, retirado da região de crescimento ativo da colônia, com auxílio de furador de rolhas e alça de platina flambados.

3.5.2 Plaqueamento e inoculação dos meios

Discos de ágar contendo estruturas do patógeno foram depositados no centro de placas de Petri contendo, cada uma, cerca de 20 ml de um dos diferentes meios de cultura a serem testados, isto é, BDA, TDA, MDA, V.4-Ágar e LDA. Para cada meio de cultura foram inoculadas 4 placas, totalizando 20 ao final. O pH variou de 5,06 a 5,84 entre estes meios.

As placas foram incubadas à temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em regime de alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro).

O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado, constando de 5 tratamentos, representados pelos meios de cultura, com 3 repetições, perfazendo um total de 15 parcelas, representadas pelas placas de Petri.

As avaliações consistiram na determinação do crescimento micelial, esporulação e apreciação das características culturais das colônias nos diversos tratamentos.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada pela medição do diâmetro da colônia em dois sentidos, diametralmente opostos, estabelecendo-se uma média para cada repetição. As leituras foram efetuadas com o auxílio de uma régua milimetrada, a intervalos de 48 horas, desde a instalação do experimento até 336 horas, ocasião em que a colônia do fungo atingiu o diâmetro da placa em um dos tratamentos. A partir das

leituras efetuadas, estimou-se o crescimento linear e a área da colônia, esta obtida a partir do raio do diâmetro do inóculo (5 mm). A fórmula utilizada para o cálculo da área da colônia foi $A = \pi \cdot R^2$. Nas primeiras 48 horas o cálculo da área da colônia foi feito da seguinte maneira: área total da colônia menos a área inicial do inóculo. Para os intervalos subsequentes, utilizou-se a mesma metodologia. No final do período de incubação as placas de Petri foram abertas e as colônias representando os tratamentos foram identificadas e fotografadas. Em seguida foi determinada a esporulação, através da média da estimativa do número de conídios nos dois campos da câmara de Neubauer, de acordo com o item 3.3.1.

Adicionou-se a cada placa contendo a colônia do fungo, 20 ml de uma suspensão de água estéril mais Tween-80, na proporção de uma gota do espalhante para cada 100 ml de água destilada e esterilizada. O espalhante confere melhor distribuição e conseqüentemente melhor uniformidade dos conídios nas áreas de contagem da câmara de Neubauer. A seguir foi feita a raspagem superficial da colônia com pincel de pêlos finos, e o material obtido foi filtrado em gaze dupla esterilizada. A partir da suspensão de conídios obtida foi determinada a esporulação mediante o emprego de câmara de Neubauer sob objetiva de 40X de microscópio composto. De cada repetição foram feitas duas leituras, tirando-se uma média do número de conídios por ml.

Com relação às características culturais, foram consideradas, principalmente, o aspecto da colônia tendo como base os parâmetros de consistência, superfície de contorno, margens, cor do micélio aéreo, cor do micélio submerso, zoneamento (círculos concêntricos), exsudação de líquidos, pigmentação do meio, etc, conforme descritos no anexo (item 7).

O Aspecto da colônia do patógeno nos diferentes meios de cultura pode ser visualizado nas figuras 2,3, 4, 5 e 6.

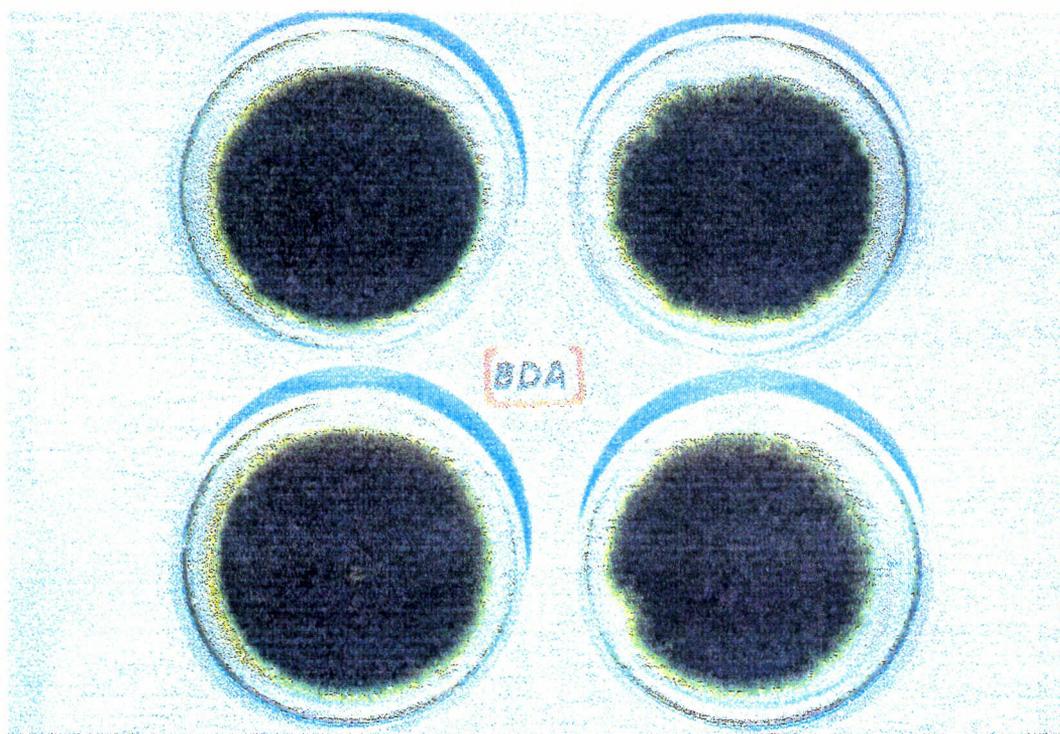


Figura 2 - Aspecto cultural da colônia de *A. brassicicola* em BDA

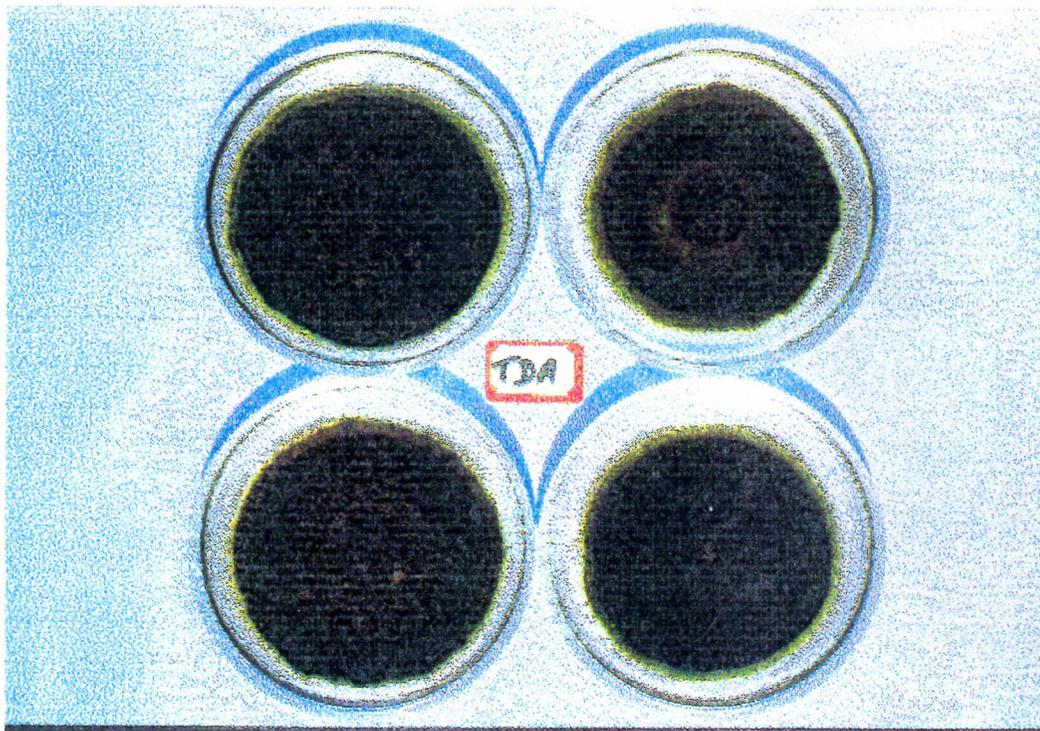


Figura 3 - Aspecto cultural da colônia de *A. brassicicola* em TDA

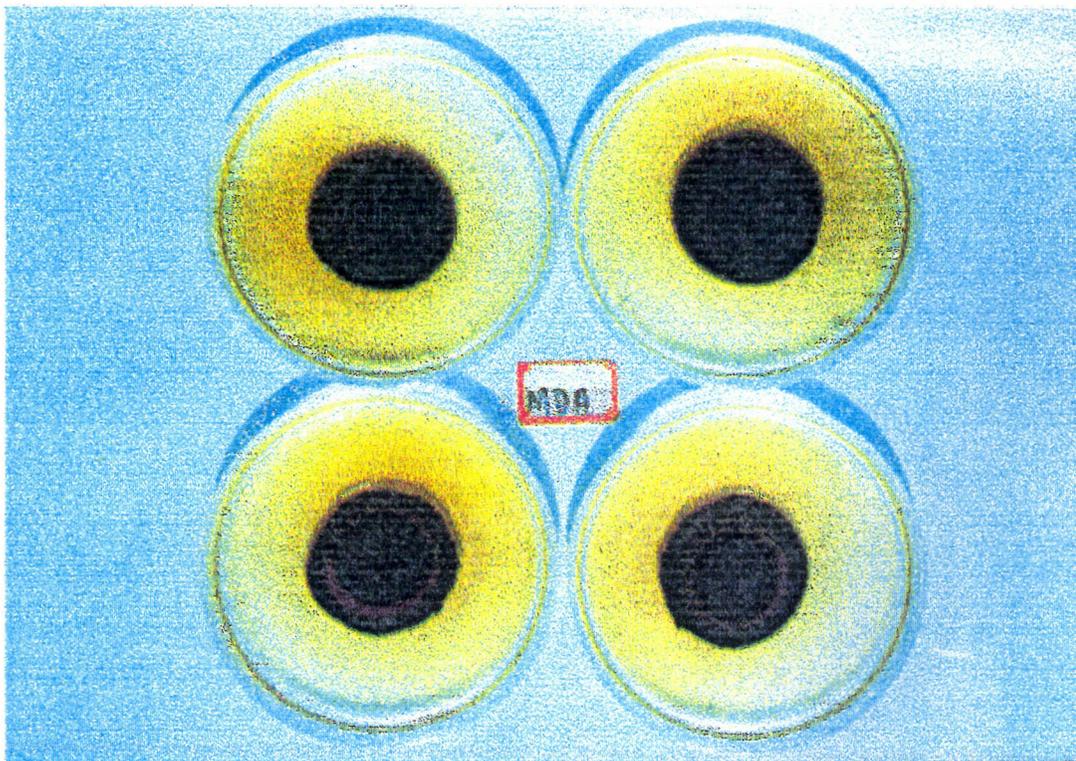


Figura 4 - Aspecto cultural da colônia de *A. brassicicola* em MDA

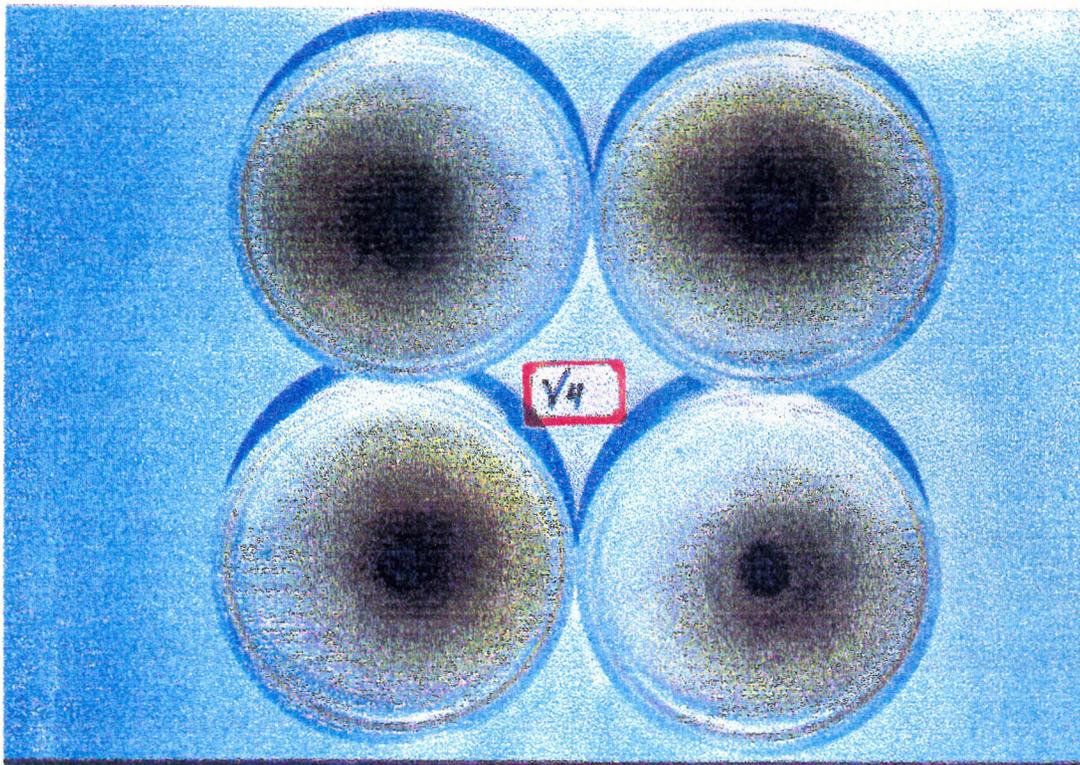


Figura 5 - Aspecto cultural da colônia de *A. brassicicola* em V.4-Ágar

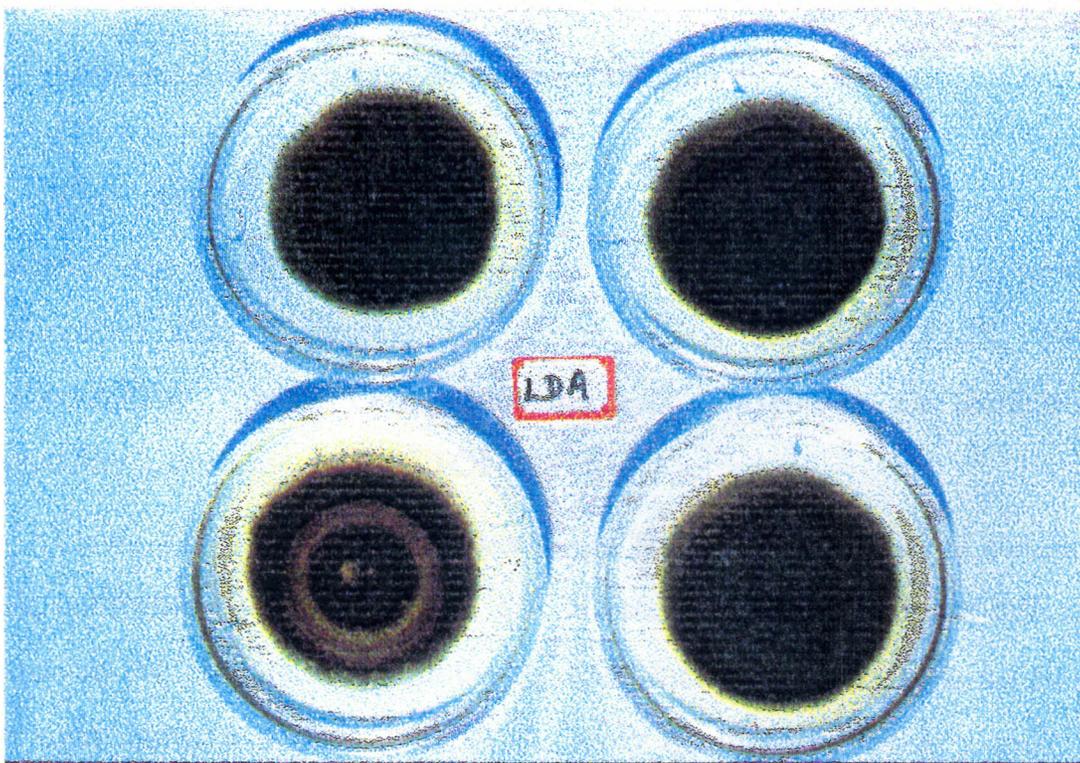


Figura 6 - Aspecto cultural da colônia de *A. brassicicola* em LDA

Os dados de esporulação foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, para efeito de análise estatística (SNEDECOR (1975) e as médias para crescimento e esporulação foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES, 1985).

3.6 Características morfológicas do isolado

As características morfológicas do fungo foram baseadas em parâmetros como forma e tamanho dos conídios, presença ou ausência de bico, número de septos e cor do conídio. Esta fase do experimento teve como finalidade a identificação da espécie isolada e sua confirmação com descrição da literatura.

3.6.1 Influência do meio de cultura na morfologia dos conídios

Este experimento foi instalado com o objetivo de estudar as características morfológicas do isolado de *A. brassicicola*, para análise comparativa com descrições feitas por outros autores (ELLIS, 1971; NEERGAARD, 1945). O método utilizado baseou-se na técnica da microcultura, descrita por SUTTON (1980).

Os meios de cultura utilizados foram BDA, TDA, MDA, V.4-Ágar e LDA, conforme indicados no item 3.4. Na técnica da microcultura referida, utilizou-se um conjunto constituído de uma placa de Petri forrada ao fundo com uma camada dupla de papel de filtro qualitativo, sobre a qual foi depositada uma lâmina de vidro apoiada sobre um suporte de vidro

triangular. Todo conjunto foi esterilizado em autoclave a 120°C, por 20 minutos.

Em câmara asséptica, pequenos blocos de ágar com cerca de 1 cm², correspondentes a cada um dos diversos meios de cultura testados, foram depositados na superfície da lâmina de vidro do conjunto. Utilizou-se lâmina de bisturi para seccionar o meio sólido contido nas placas. O inóculo, constituído de fragmentos de micélio e meio da colônia fúngica, foi transferido para o centro de cada uma das quatro margens dos blocos de ágar, os quais foram cobertos com lamínulas esterilizadas. Em seguida foi adicionada água esterilizada à camada dupla de papel de filtro, a fim de se obter um ambiente úmido durante todo período de incubação. As microculturas foram incubadas à temperatura ambiente (26°C ± 2°C) e regime de luminosidade natural, por 12 dias.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, consistindo o experimento de 5 tratamentos, representados pelos meios de cultura, e 50 repetições, estas representadas pelo número de leituras efetuadas em cada tratamento. Cada leitura foi feita tomando como base o comprimento e a largura do conídio (tamanho) e também o número de septos.

As avaliações foram realizadas após o período de incubação, considerando-se os seguintes parâmetros: comprimento e largura do corpo do conídio; número de septos longitudinais e transversais do corpo do conídio, presença ou ausência de bico. Para efeito de medição, considerou-se maduro o conídio pluricelular de cor e septação definidas. As medições foram efetuadas com auxílio de microscópio composto, tipo Zeiss, sob objetiva de 40 X, ao qual adaptou-se uma lente ocular micrométrica com aumento de 10 X. O micrômetro ocular foi aferido em lâmina micrométrica,

do qual resultou um fator numérico de 2,33 unidades. Os registros foram feitos através de tabelas com anotações de dados quantitativos e qualitativos, bem como microfotografias obtidas com auxílio de câmara fotográfica acoplada ao microscópio e sob objetiva 40 X, obtendo-se aumento de 400 X.

Os dados paramétricos obtidos foram analisados estatisticamente segundo sua variância, através do teste de F e as médias comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de patogenicidade

O isolado de *A. brassicicola* mostrou-se altamente patogênico quando inoculado em plantas sadias de couve, nas três concentrações utilizadas. As folhas mostraram sintomas severos de infecção em toda a área do limbo, iniciando-se por inúmeros pontos escuros circundados por halos amarelos. As manchas evoluíram e coalesceram originando lesões necróticas extensas, amarelecimento, seca e por fim queda da folha. Não houve diferença no tempo decorrido entre o aparecimento dos sintomas e a morte do tecido foliar, nas 3 concentrações de conídios utilizadas na inoculação. Entre o aparecimento dos primeiros sintomas, amarelecimento e necrose do tecido foliar, decorreram somente 6 dias.

O número de pontos necróticos que evoluíram para manchas e lesões foliares, seguida de morte rápida do tecido foliar, indicam que as concentrações de 10^5 , 2×10^5 e 4×10^5 conídios/ml foram muito altas para

inoculação artificial, não permitindo o aparecimento de lesões características do patógeno, semelhante àsquelas observadas em infecção natural no campo.

4.2. Características fisiológicas do isolado

4.2.1. Efeito do meio de cultura sólido no crescimento micelial do patógeno

Os resultados médios obtidos no estudo do crescimento micelial de *A. brassicicola*, nos diferentes meios testados, encontram-se nas tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente.

Tabela 4.1 - Crescimento radial em mm de *A. brassicicola*

Tempo de Incubação	Meios de Cultura				
	BDA	TDA	MDA	V. 4 Ágar	LDA
0 Hora	5	5	5	5	5
48 Horas	13,6	17,55	12,4	15,2	15,3
96 Horas	26,5	30,4	22,6	27,1	26,9
144 Horas	39,4	44,8	28,4	39,2	37,3
192 Horas	50,9	51,7	31,3	50,4	43,5
240 Horas	64,8	62	34,3	63,6	50,1
288 Horas	73,9	70,9	39	73,8	59,1
336 Horas	79,6	78,1	42,6	79,8	66,5

Tabela 4.2 - Crescimento em área (mm²) de *A. brassicicola*

Tempo de Incubação	Meios de Cultura				
	BDA	TDA	MDA	V. 4 Ágar	LDA
0 Hora	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9
48 Horas	146,3	242,1	121,3	181,8	184,1
96 Horas	555,8	726,0	402,9	578,1	568,9
144 Horas	1220,9	1576,8	555,7	1209,6	1093,3
192 Horas	2036,2	2101,8	770,8	1996,7	1488,0
240 Horas	3304,6	3043,5	924,9	3178,0	1975,7
288 Horas	4295,4	4016,4	1199,3	4287,3	2749,2
336 Horas	4981,7	4796,2	1426,1	5026,4	2478,5

As taxas médias para crescimento radial de *A. brassicicola* encontram-se nas figuras 7 e 8.

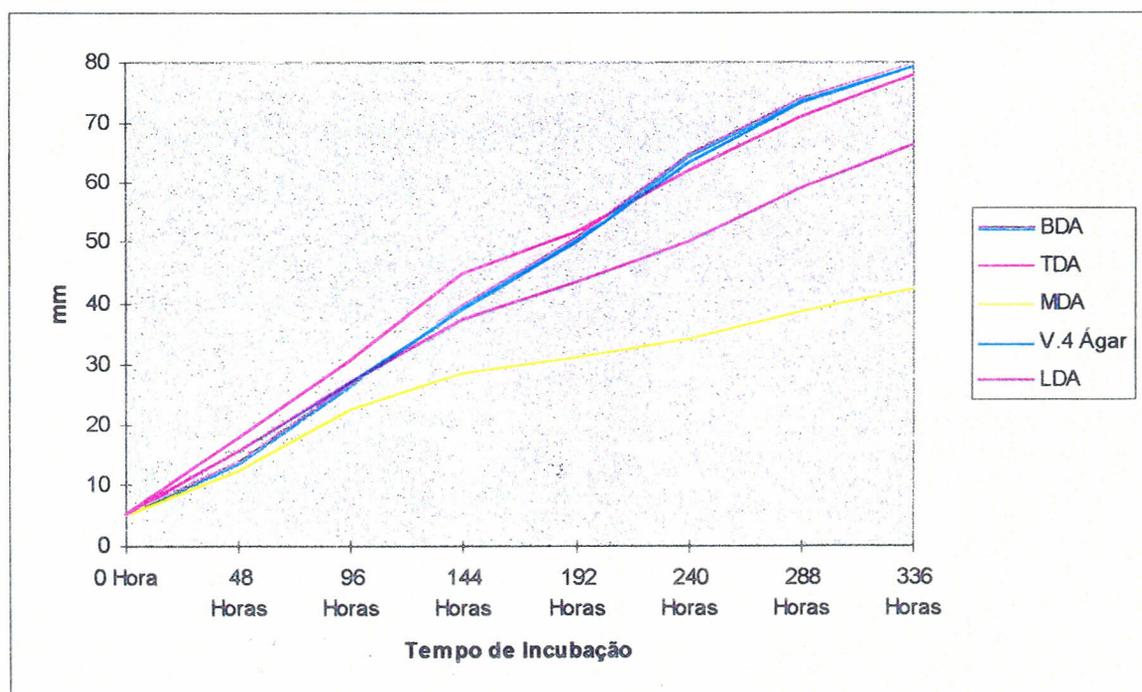


Figura 7 - Crescimento micelial em mm de *A. brassicicola* em diferentes Meios de Cultura

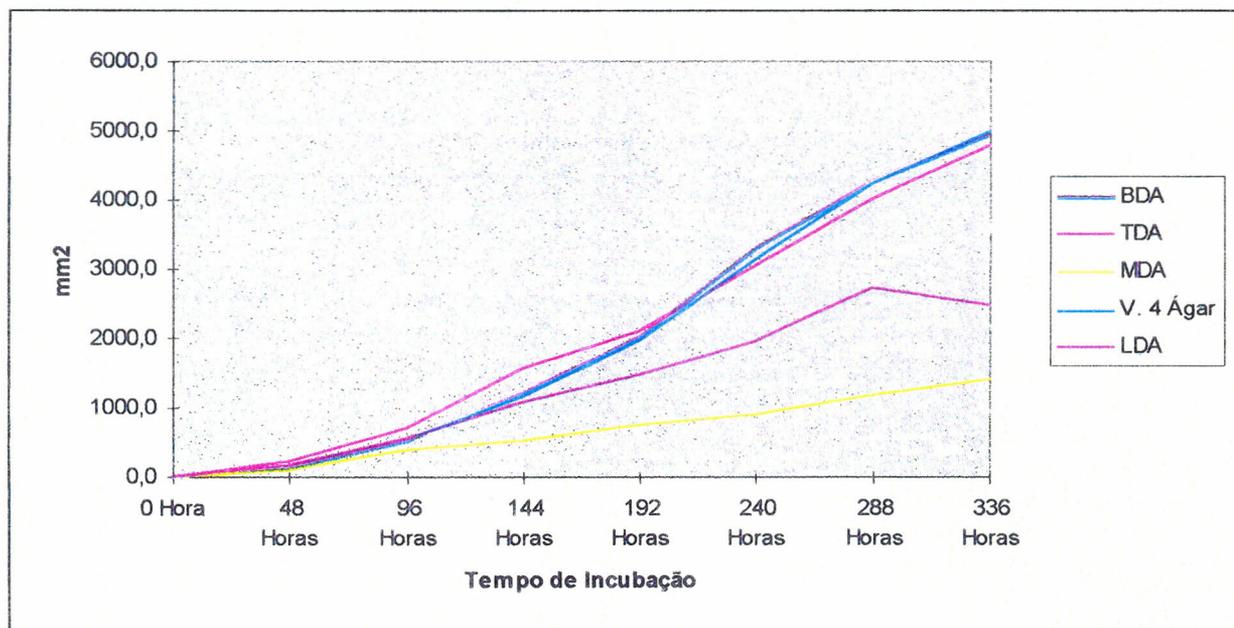


Figura 8 - Crescimento micelial em mm^2 de *A. brassicicola* em diferentes Meios de Cultura.

Os gráficos mostram a evolução do crescimento do patógeno usando dois parâmetros: medida do crescimento linear e área da colônia.

Os efeitos para crescimento linear (mm) e em termos de área da colônia (mm^2) encontram-se nas tabelas 4.3 e 4.4.

Tabela 4.3. Médias para efeito de crescimento (mm) de *A. brassicicola* em diferentes meios de cultura, aos 14 dias de incubação.

Meio de cultura	Crescimento micelial (mm) ¹
V.4-Ágar	79,80 a
BDA	79,60 a
TDA	78,10 a
LDA	66,50 b
MDA	42,60 b

DMS (5%) = 6,909

CV = 5,265

¹Médias de 3 repetições. Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 4.4. - Médias para efeito de crescimento (mm²) de *A. brassicicola* em diferentes Meios de Cultura, aos 14 dias de incubação

Meios de Cultura	Crescimento micelial (mm ²) ¹
V.4 - Ágar	5026,40 a
BDA	4981,70 a
TDA	4796,18 a
LDA	3078,52 b
MDA	1446,12 c
DMS (5%) = 822,785	
CV = 11,015	

¹Médias de 3 repetições. Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A análise de variância para crescimento revelou efeito altamente significativo dos meios de cultura empregados no crescimento do fungo. Através das médias apresentadas nas tabelas 4.3 e 4.4., comparadas através do Teste de Tukey ao nível de 5%, verifica-se que, dentre os diferentes meios testados, V.4-Ágar, BDA e TDA imprimiram melhor crescimento micelial do fungo, embora V.4-Ágar tenha induzido um crescimento médio superior aos demais. Dessa forma, os meios V.4-Ágar, BDA e TDA não apresentaram diferença significativa entre si, ao nível de 5% de probabilidade, porém foram superiores a LDA e MDA. Dentre os meios testados, V.4-Ágar, BDA e TDA foram os melhores, enquanto LDA e MDA foram os piores para crescimento de *A. brassicicola*

Nas primeiras 48 horas de incubação, TDA apresentou taxa de crescimento do fungo superior a todos os outros meios, sendo observado em

MDA o menor crescimento. As Figuras 3 e 4 mostram o crescimento do fungo nos diferentes meios, a intervalos de 48 horas. Pode-se observar comportamento semelhante do fungo em todos os meios até 144 horas após a instalação do experimento. Até esse intervalos de tempo, as taxas de crescimento do fungo foram decrescente em função do tempo, para todos os meios testados. Para os meios BDA e V.4-Ágar, a taxa de crescimento foi decrescente em todos os intervalos do período de incubação, com total de 336 horas. Com exceção de TDA (intervalo de 192-240 h), MDA (intervalo de 240-288 h) e LDA (intervalo de 240-288 h), todos os meios de cultura apresentaram taxa de crescimento descendente durante o período de incubação, tendo todos chegados ao final do experimento (336 horas) com a menor taxa de crescimento micelial do fungo.

Levando-se em consideração que as maiores taxas de crescimento, para todos os meios testados, foram verificadas nas primeiras 48 horas, e as menores, no final do período de incubação, pode-se concluir que houve, no primeiro intervalo, maior atividade enzimática de degradação de compostos orgânicos, dos meios, propiciando maior absorção dos nutrientes. À medida que se exauriam do meio os compostos de fácil decomposição enzimática, a absorção de nutrientes, provavelmente, se tornou mais lenta, tendo como consequência a redução na taxa de crescimento do fungo. A exaustão de nutrientes do meio explica a queda no crescimento do fungo verificada no decorrer do período de incubação.

O crescimento mais regular, medido pelo desvio padrão da média de crescimento nos diferentes intervalos de tempo, foi observado em MDA.

A Figura 4 mostra que não houve mudança no crescimento do fungo, em relação aos dois parâmetros de avaliação do crescimento adotado. O

crescimento linear não diferiu do crescimento em área de colônia. Com isso, chegamos à conclusão que ambos os métodos empregados são eficientes para avaliar o crescimento do fungo em meio sólido.

Os resultados obtidos no presente trabalho, quanto ao crescimento micelial de *A.brassicicola* nos diferentes meios de cultura testados, demonstram que o patógeno utiliza melhor o meio V.4-Ágar, o mesmo resultado encontrado por VIANA (1988), trabalhando com *A. porri*. *A.brassicicola* atingiu o diâmetro da placa em 336 horas de incubação, a uma temperatura média de 26°C. Resultados semelhantes chegaram ANGEL (1929) e FAHIM (1966), utilizando meio de cultura contendo cebola e o fungo *A. porri*. No experimento de VIANA (1988), que testou vários meios de cultura no crescimento de *A. porri*, V.4-Ágar e BDA não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos, neste experimento, com V.4-Ágar e BDA, no crescimento de *A. brassicicola*. O meio de cultura TDA, que neste experimento teve bom desempenho de crescimento, não diferindo estatisticamente de V.4-Ágar e BDA, teve o pior desempenho de crescimento, entre todos os meios testados, no experimento de VIANA (1988) com *A. porri*. MDA teve o pior desempenho entre os meios testados para crescimento de *A. brassicicola*, enquanto no experimento de VIANA (1988), com *A. porri*, foi superior a TDA e estatisticamente semelhante a LDA.

Os resultados confirmam que tanto *A. brassicicola* quanto *A. porri* crescem muito bem nos meios de cultura V.4-Ágar e BDA, enquanto diferem na preferência por TDA e MDA. LDA, um meio sintético à base de extrato de leveduras, não apresentou bom desempenho de crescimento nos

dois experimentos envolvendo o crescimento das duas espécies de *Alternaria*. Isso demonstra a preferência do patógeno por meios semi-sintéticos, à base de extrato de legumes e batata.

4.2.2 Efeito do meio de cultura sólido na esporulação do patógeno

A análise de variância dos dados de esporulação revela efeito altamente significativo dos diferentes meios de cultura, confirmado pelo teste de comparação de médias (Tukey, 5%), apresentado na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Médias para efeito dos meios de cultura na esporulação de *A.brassicicola*, aos 14 dias de incubação.

Meio de cultura	Esporulação ¹ (Conídios/ml x 10 ⁴)
BDA	9,95 a
TDA	9,88 a
LDA	8,31 ab
MDA	6,31 ab
V.4-Ágar	4,95 b

DMS (5%) = 4.126

C.V.= 19,469

¹ Médias de 3 repetições por tratamento. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

4.2.3 - Características Culturais de *A. brassicicola*

As características culturais do patógeno variaram de um meio para o outro, conforme evidenciado nas figuras 2, 3, 4, 5 e 6.

Os meios de cultura BDA, TDA, LDA e MDA foram superiores a V.4-Ágar e não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os meios BDA e TDA, em termos de média, foram superiores a todos os demais, em termos de esporulação do fungo. No entanto, não houve diferença significativa entre eles e os meios LDA e MDA.

Os meios LDA e MDA, em termos de média, apresentaram o mesmo desempenho em termos de esporulação, sendo superiores a V.4-Ágar.

O pior desempenho na esporulação do fungo foi verificado no meio V.-Ágar. Este meio apresentou maior regularidade de esporulação, medido através do desvio padrão (s), com 0,11 e o de menor regularidade foi LDA, com 2,17, conforme a Figura 5.

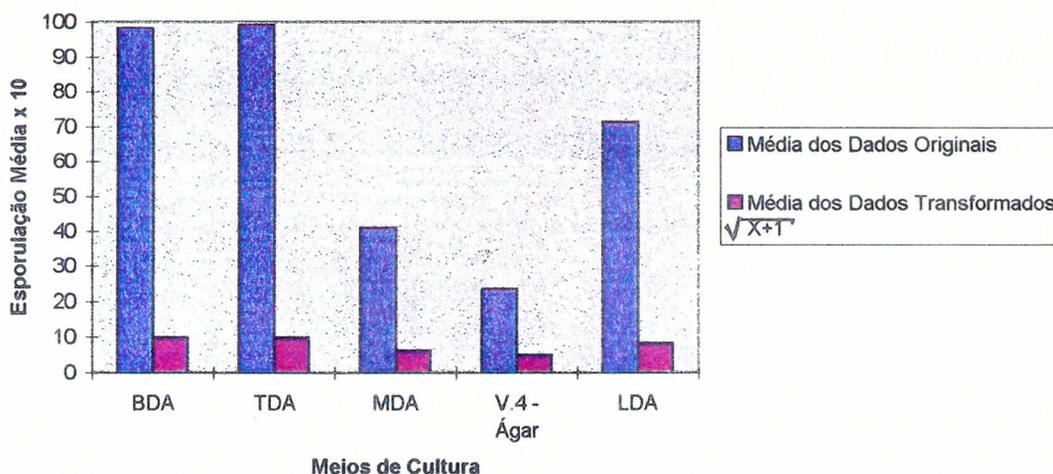


Figura 9 - Esporulação de *A. brassicicola* em diferentes meios de cultura

Com relação à esporulação de *A. brassicicola* nos diferentes meios de cultura testados, verificou-se que BDA induziu maior produção de conídios, embora não significativa, estatisticamente, em relação à produção em TDA, LDA e MDA. O meio V.4-Ágar teve o pior desempenho na esporulação do fungo, diferindo estatisticamente dos demais meios.

Trabalho realizado por VIANA (1988) resultou em abundante esporulação de *A. porri* em meio V.4-Ágar, enquanto FAHIM (1966) obteve, com a mesma espécie, excelente esporulação em meio sólido de batata e moderada em meio de Cebola-ágar.

Com relação a *A. brassicicola*, os resultados obtidos estão de acordo com os de FAHIM (1966) e contrários aos de VIANA (1988). Contrariamente aos resultados de VIANA (1988) com *A. porri*, V.4-Ágar teve o pior desempenho na esporulação de *A. brassicicola*.

As condições ideais para esporulação de uma espécie fúngica diferem muito, nos requisitos nutricionais, daquelas exigidas para o seu crescimento (HAWKER, 1950). Percebe-se, pelos resultados obtidos e confrontados com outros trabalhos sobre esporulação de *Alternaria*, que há divergência de opiniões em termos de substrato, porém, cada espécie requer condições nutricionais peculiares tanto para crescimento quanto para esporulação.

4.2.4 - Efeito do meio de cultura sólido no tamanho e número de septos dos conídios

Os resultados médios obtidos neste experimento para tamanho de conídios (comprimento e largura) são apresentados na Tabela 4.7. Os

resultados oriundos dos dados originais relativos à variação no tamanho, número de septos do corpo, em cada meio, encontram-se na Tabela 4.6.

A análise de variância para comprimento e largura de conídios revelou efeito altamente significativo dos meios de cultura testados. O teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade revela que houve diferença significativa entre as médias de tratamento. Para o parâmetro tamanho de conídios (comprimento e largura), os dados são apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6. Médias para efeito dos meios de cultura no comprimento e largura de conídios de *A. brassicicola*, aos 14 dias de incubação

Meio de Cultura	Tamanho do corpo do conídio (μm) ¹	
	Comprimento	Largura
BDA	27,80 a	11,34 b
LDA	27,72 a	12,64 a
V.4-Ágar	26,56 a	10,06 cd
TDA	25,34 ab	10,98 bc
MDA	22,04 b	9,50 d

DMS (5%) = 3,786 e 1,122
CV = 26,605 e 18,722

¹Médias de 50 repetições para cada tratamento. Médias na mesma coluna, seguidas das mesmas letras, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A seguir estão representadas diferentes aspectos da morfologia de conídios de *A. brassicicola* em diferentes meios de cultura:



Figura 10 - Conídios maduros e novos. Detalhe: germinação de conídios a partir de outro conidio;



Figura 11 - Hifas, conidióforos e conídios de *A. brassicicola*. Detalhe: apenas um conidio apresenta septo longitudinal;



Figura 12 - Conídios escuros com 2 e 3 septos transversais em cadeia;

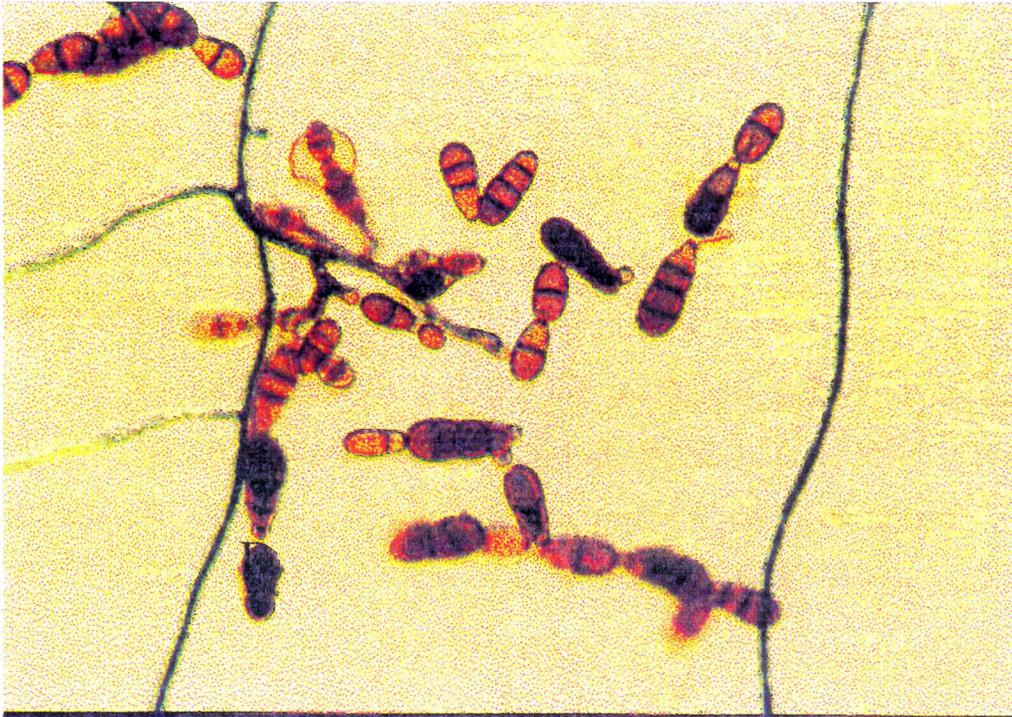


Figura 13-Conídios maduros e imaturos apresentando médias de 1 a 3 septos.

A morfologia de *A. brassicicola* variou em comprimento e largura dos conídios, nos diferentes meios de cultura testados, conforme resultados da tabela 4.7, fato também verificado em trabalhos de VIANA (1988), ANGEL (1929), JOLY (1964), NEERGAARD (1945) e ELLIS (1971).

VIANA (1988) encontrou tamanho médio de conídios de *A. porri*, em meio BDA, de 33,49 x 13,92 μm , inferior aos observados por NEERGAARD (1945) para o mesmo meio e fungo, de 63,5 x 17,1 μm . Os resultados para *A. brassicicola* mostram tamanho de conídios em BDA de 27,72 x 12,64 μm , tendo sido o maior em largura, porém, em comprimento foi superado por LDA com tamanho de 27,80 x 11,34 μm .

Segundo ELLIS (1971) as dimensões de conídios de *A. brassicicola* variam de 18-130 μm de comprimento por 8-20 μm de largura, enquanto que para *A. brassicae*, descreve comprimento acima de 170 μm por 6-11 μm de largura. Dessa forma, os valores encontrados para comprimento e largura de conídios de *A. brassicicola*, em todos os meios testados, encontram-se dentro dos limites padrões descritos para a espécie.

A tabela 4.7 mostra as dimensões médias, em comprimento e largura dos conídios, nos diferentes meios de cultura estudados. Observa-se que no meio LDA o fungo produziu conídios de maior comprimento médio. Os meios de cultura LDA, BDA, V.4-Ágar e TDA não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, enquanto no meio MDA os conídios apresentaram menor comprimento, porém, este não diferiu estatisticamente de TDA ao nível de 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

Para largura de conídios observou-se diferenças significativas entre médias de tratamento. O meio de cultura BDA apresentou maior largura de

conídios, sendo superior aos demais. Os meios LDA e TDA não diferiram estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os meios TDA e V.4-Ágar não diferiram estatisticamente entre si. MDA apresentou o pior desempenho em relação à largura de conídios, não diferindo, entretanto, de V.4-Ágar.

As características dos conídios que definem a espécie em estudo são, fundamentalmente, o tamanho do conídio (Comprimento e largura), pigmentação, número de septos, forma (morfologia) e modo de inserção do conídio no conidióforo (ELLIS, 1971).

Tabela 4.7 - Médias para efeito de meios de cultura no número de septos dos conídios de *A. brassicicola* aos 14 dias de incubação

Meio de cultura	Número médio de septos/conídios ¹
LDA	2,84 a
V.4-Ágar	2,78 a
BDA	2,66 ab
TDA	2,66 ab
MDA	2,06 b

DMS (5%) = 0,61481

CV= 43,019

¹ Médias de 50 repetições para cada tratamento. Médias na mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Com relação ao número de septos, o experimento determinou somente os septos transversais. Os septos transversais e longitudinais descritos para a espécie *A. brassicicola*, segundo descrição de ELLIS (1971), são as seguintes: 1-11 septos transversais, a maioria menos de 6, com poucos septos longitudinais, podendo, no entanto, em caso raro, atingir até 6. Conforme resultados obtidos no presente Experimento, a média do número de septos por conídios variou de 2,06 a 2,84 para os meios MDA e LDA, respectivamente. Os resultados demonstram que o parâmetro número de septos por conídios, da espécie estudada, não apresentou grandes variações entre os meios de cultura testados, havendo diferença estatística somente em relação a MDA, que diferiu dos demais meios. Em todos os meios de cultura, no entanto, a média de septos está dentro do limite padrão descrito por ELLIS (1971) para a espécie *A. brassicicola*.

5. CONCLUSÕES

1) O isolado de *A. brassicicola* revelou-se altamente patogênico quando inoculado em folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) nas concentrações de 10^5 , 2×10^5 e 4×10^5 , induzindo sintomas severos de manchas necróticas sobre o limbo foliar.

2) Os meios de cultura sólidos BDA, V.4-Ágar e TDA proporcionaram as maiores taxas de crescimento de *A. brassicicola*, tendo BDA apresentado a maior taxa de crescimento médio.

3) Não houve diferença em relação aos métodos de mensuração linear e em termos de área da colônia, utilizados como parâmetros de avaliação do crescimento micelial de *A. brassicicola*.

4) BDA e TDA apresentaram os melhores desempenhos na esporulação de *A. brassicicola*, porém, em termos estatísticos, foram semelhantes aos meios LDA e MDA.

5) V4-Ágar foi o meio que propiciou melhor crescimento micelial do patógeno, sendo também o de pior desempenho, em termos de esporulação.

6) Os meios LDA, BDA, V.4-Ágar e TDA, nessa ordem, apresentaram os maiores comprimentos de conídios, porém, todos dentro da faixa estabelecida para a espécie.

7) BDA foi o meio de cultura que proporcionou maior largura de conídios, porém, dentro do intervalo estabelecido para espécie.

8) Não se observou variação no número de septos por conídios nos meios LDA, V4-Ágar, BDA e TDA, porém, o número médio de septos no primeiro meio foi ligeiramente superior.

9) Pelas variações culturais observadas, pode haver variabilidade fisiológica em *A. brassicicola*.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Third edition. Academic Press, Inc, New York, 1988. 803 p.
- ALEXOPOULOS, C. J. & MIMS, C. W. **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, New York, 1974. 632 p.
- ANGEL, H.R. Purple blotch of onion (*Macrosopium porri* Ell.). **Journal of Agricultural Research**, 38 (9):467-87. 1929.
- ANSARI, N.A.; KHAN, M.W. & MUHEET, A. Effect of some factors on growth and sporulation of *Alternaria brassicae* causing *Alternaria* blight of rapeseed and mustard.. **Acta Botany Indica**, 17:49-53. 1989.
- BABADOOST, M. & GABRIELSON, R.L. Pathogens causing *Alternaria* disease of *Brassica* seed crops in western Washington. **Plant Disease Reporter**. 63: 815-820. 1979.
- BESSEY, E. O. & GABRIELSEN, R.L. The effects of humidity, seed infection level, temperature and nutrient stress on cabbage seedling disease caused by *Alternaria brassicicola*. **Seed Science Technology**, 11: 403-410. 1983

- BIGGS, A. R. Control of *Alternaria* infection of fruit of apple cultivar nittany with calcium chloride and fungicides. **Plant disease**, 77 (10): 976-980. 1993
- BOLKAN, H.A.; RIBEIRO, N. R. C. Ocorrência e patogenicidade de *Alternaria brassicicola* no Brasil. **Plant Disease**, 67 (7): 8225-8226. 1983.
- BONDE, R. Fisiological strains of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, 19: 533-548. 1929.
- COCHRANE, V. W. **Physiology of fungi**. New York, J. Wiley, 1958. 542p.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.
- ELLIOTT, E.S. The effect of the sugar concentration on conidial size of some species of *Helminthosporium*. **Phytopathology**, 39 (12): 953-8, 1949.
- FAHIM, M. M. The effect of light and others factors on the sporulation of *Alternaria porri*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 49 (1): 73-8, 1966.
- FILGUEIRAS, F. A. R. **Manual de olericultura - Cultura e comercialização de hortaliças**. Agronômica Ceres, São Paulo, 1972. 453p.

- HAWKER, L. E. **Physiology of fungi**. London. University of London, 1950. 360p.
- JOLY, P. Le Genere *Alternaria*. **Encyclopedie Mycologique**, 33: 1-2250, 1964.
- JOHNSON, L.F. & CURL, E.A. **Methods for research on the ecology of soil borne plant pathogens**. Minnesota, Burgess, 1972. 247p.
- KAFI, A. & TARR, S. A. J. Growth, sporulation and conidial characteristics of five Graminicolous species of *Helminthosporium*. I. Effects of nutrients. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 49 (2) : 327-37, 1966.
- KOIKE, S. T. **UC IPM pest manegement guidelines**: In: Cole Crops - *Alternaria leafspot*. University of California, 1994. 6p.
- LILLY, V. G. The relation of fungus physiology to physiology of disease. In: WEST VIRGINIA UNIVERSITY. **The physiology of fungi and fungus diseases**. Virginia, West Virginia University, 1963. p. 33-63
- LIMA, D. M. M. Matose-peptona-ágar, um meio de cultura para esporulação de *Stemphylium solani*. **Pesq. agrop. Bras.**, 17 (1): 81-3, 1982.
- MARTINS, M. & TAKATSU. Doenças de hortaliças no Amapá. **Fitopatologia Brasileira**, 15 : 357-359. 1990

MATSUOKA, K.; FILHO, J. C. da. MARTINS, M. C. P. del.; ANSANI, C.
V. Doenças causadas por fungos e bactérias. **Informe Agropecuário**,
11(131) : 22-24. 1985.

MENEZES, M. **Fungos fitopatogênicos**. UFRPE. Recife, 1987. 580p.
(Apostila).

MINUSSI, E.; MACHADO, C. C.; MENTEN, J.O. M.; CASTRO, C.;
KIMATI, H. Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de
Stemphylium solani weber em meio de cultura. **Fitopatol. Bras.**, 2 (2):
167-71, 1977.

MORETTO, K.C.K. ; BARRETO, M. Efeitos de alguns meios de cultura no
crescimento e na esporulação de *A. solani* e de alguns fatores na
frequência de infecção em tomateiro. **Summa Phytopathologica**,
Piracicaba, V.21, N° 2, 188 - 191, 1995.

NEERGAARD, P. **Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium***.
Copenhagen, Elinaar Muksgaard Publisher, 1945. 560 p.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. Macmillan, London, 1977. 380 p.

NOLLA, J. A. B. A New *Alternaria* disease of onion (*Allium cepa* L.).
Phytopathology, 17 (2) : 115-32, 1927.

- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Nobel, Piracicaba, 1985. 466p.
- PONTES, M.F.C. de. **Características fisiológicas e morfológicas de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. E avaliação de fontes de resistência milho (*Zea mays* L.)**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1987. 82p. (Dissertação de Mestrado).
- ROTEM, J. **The genus *Alternaria*: Biology, epidemiology and pathogenicity**. The American Phytopathological Society. St. Paul, 1994. 326p.
- SHAHIN, E. A. & SHEPARD, J. F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. **Phytopathology**, 69 (6): 618-20, 1979.
- SNEDECOR, G.W. **Métodos estatísticos**. México, Continental, 1975. 703p.
- SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Kew, Commonwealth Agricultural Bureaux, 1980. 696 p.
- TABER, R.A.; VANTERPOOL, T.C.; TABER, W. A. A comparative nutritional study of *Alternaria raphany*, *A. brassicae* and *A. brassicicola* with special reference to *A. raphany*. **Phytopathology**, 58: 609-16. 1968.

- TARR, S. A. & KAFI, A. Growth, sporulation and conidial characteristics of Graminicolous species of *Helminthosporium*. II. Effect of nitrogen and pH. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 51 (5): 771 - 7, 1968.
- TUITE, J. **Plant pathological methods fungi and bacteria**. Minnesota, Burgess, 1969. 239p.
- VAKALOUNAKIS, D.J. Control of early blight of greenhouse tomato, caused by *Alternaria solani*, by inhibiting sporulation with ultraviolet-absorbing vinyl film. **Plant Disease** 75: 795-797. 1991.
- VAKALOUNAKIS, D.J. Host range of *Alternaria alternata* f. *sp.cucurbitae* causing leaf spot of cucumber. **Plant Disease**, 74: 227-230. 1992.
- VENTURA, J.A. & COSTA, H. Doenças causadas por fungos em *Cruciferas*. **Informe Agropecuário**, 17 (183): 53-56, 1995.
- VIANA, F. M. P. Características fisiológicas e morfológicas de *Alternaria porri* (Ell.) Cif., agente da mancha púrpura da cebola (*Allium cepa* L.). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1988. (Dissertação de Mestrado).
- WILTSHIRE, S. P. The Foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 18: 135-60, 1933.

7.ANEXO

Tabela 7.1 - Características culturais de *A. brassicicola*, em diferentes meios de cultura

Meio de Cultura	Descrição das Características Culturais da Colônia
BDA	Colônia de aspecto aveludada, coloração escura no centro e esverdeada nos bordos; micélio frouxo, superfície de contorno lisa, de margem verde-esbranquiçado, aspecto esfiapado com uma a duas faixas de zonação radial a partir da metade da colônia, separando a parte central mais escura da zona periférica mais clara, ou escura-esverdeada. Zona de esporulação escura no diâmetro central da colônia. Micélio aéreo cinza-escura e micélio submerso escuro.
TDA	Colônia de aspecto feltroso no centro e mais compacta e baixa na periferia; coloração escura, com pontos esbranquiçados no diâmetro central; micélio frouxo, superfície de contorno lisa, margem esverdeada, de aspecto esfiapado. Esporulação numa larga faixa a partir do diâmetro central, até próximo às bordas da colônia. Zona de esporulação radial, de coloração variando entre o escuro e o verde-escuro. Bordas com faixa estreita

com faixa estreita de coloração verde-oliva, de aspecto desfiado na extremidade da colônia. Micélio aéreo e submerso, escuros.

MDA

Colônia predominantemente escura, com faixa marrom-escura próximo à borda, delimitando a zona de esporulação para dentro e para fora do círculo. Colônias de coloração totalmente escuras até à borda, apresentando micélio feltroso e compacto; superfície de contorno lisa, margem escura, com extremidades claras, de aspecto desfiado, menos que o anterior. Esporulação em toda a colônia, sem zonas alternadas, uniformemente escura. Meio não pigmentado. Micélio aéreo e submerso, escuros.

V4-Agar

Colônia fracamente aveludada, micélio escasso, de coloração branca, com zonas ou círculos concêntricos de coloração escura. Micélio aéreo pouco desenvolvido; micélio submerso branco, pobre. Superfície de contorno lisa, margem de coloração branca, desfiada. Esporulação em zonas concêntricas a partir do disco de inóculo, até próximo à zona da borda, de coloração branca.

Ausência de pigmentação do meio e exsudação de líquido.

LDA

Colônia em geral de aspecto feltrosa, com variação para cotonosa, coloração escura, apresentando variação para zonas concêntricas de coloração esbranquiçadas, de superfície elevada, margem cinza-esverdeado, de aspecto desfiado; esporulação em toda a colônia, rareando em direção à borda da colônia. Variação para zonas concêntricas de esporulação no centro, próximo ao disco de inóculo, e mais raso na periferia. Ausência de pigmentação e de exsudação de líquido.
