

SENSIBILIDADE DE *Alternaria alternata* (Fr.) KEISSLER  
A TRÊS FUNGICIDAS

MARIA REGINA GONÇALVES UNGARO

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas

PIRACICABA  
Estado de São Paulo-Brasil  
Dezembro, 1981

A meus pais

À vovó Maria

dedico

À minha família,

Fernando,

Gustavo e Eduardo

ofereço

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Lucio de Azevedo, pela orientação, atenção e paciência dispensadas durante a elaboração do presente trabalho.

Aos Pesquisadores da Seção de Microbiologia Fitotécnica do IAC pela orientação e atenção dispensada durante os trabalhos de laboratório.

Ao Pesq. Cient. Sérgio de Almeida Moraes, da Seção de Microbiologia Fitotécnica do IAC, pela revisão do texto.

Aos funcionários da Seção de Microbiologia Fitotécnica do IAC, em especial à D. Luzia, Valdete, Vera Lucia, Lourdes e Antonia, pelo auxílio nos trabalhos de laboratório.

À Prof. Sonia Elizabeth B. Lucatto, pela revisão de português.

Ao Prof. John Coningham Netto, pela revisão do Summary.

À Seção de Citologia do IAC, em especial à Dra. Dixier M. Medina e Dra. Neusa D. da Cruz, pelo apoio e incentivo recebido e pelo empréstimo do material de laboratório.

Ao Pesq. Cient. Rafael Alvarez, pelo apoio recebido durante a realização do curso de pós-graduação.

Aos funcionários da Seção de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

A todos que indireta ou diretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	viii
SUMMARY .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Descrição do fungo .....	3
2.2. Crescimento e esporulação do gênero <i>Alternaria</i>	
2.2.1. Efeito da luz .....	5
2.2.2. Efeito da temperatura .....	7
2.2.3. Injúria ao micélio .....	9
2.2.4. Alteração do meio de cultura .....	10
2.3. Fungicidas .....	12
2.4. Genética do gênero <i>Alternaria</i> .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Isolados utilizados , sua origem e isolamento .....	19
3.2. Caracterização dos isolados .....	20
3.3. Fungicidas ensaiados	
3.3.1. Dithane Z-78 .....	20
3.3.2. Orthocide 50 WP .....	20
3.3.3. Benlate .....	21
3.4. Soluções e meios de cultura utilizados	
3.4.1. Solução de Tween .....	21
3.4.2. Solução de extrato de folhas de girassol .	21
3.4.3. Meio de BDA (batata-dextrose-ágar) .....	21

	Página
3.4.4. Meio de batata-ágar .....	22
3.4.5. Solução de V-8 .....	22
3.4.6. Meio com Dithane Z-78 .....	22
3.4.7. Meio com Benlate .....	22
3.4.8. Meio com Captan 50 WP .....	22
3.4.9. Condições de preparo e conservação das soluções e dos meios de cultura utilizados .....	23
3.5. Inoculação e incubação .....	23
3.6. Sobrevivência aos fungicidas .....	24
3.7. Curva Dose-Resposta .....	24
3.8. Recuperação de conidiação .....	25
3.9. Promoção de esporulação e do desenvolvimento das colônias	
3.9.1. Alteração das condições de cultivo .....	25
3.9.2. Alteração do meio de cultura .....	27
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Caracterização das espécies de <i>Alternaria</i> encontradas e morfologia de suas colônias .....	28
4.2. Diferenças morfológicas entre os isolados .....	
4.2.1. Coloração quando em ausência ou presença dos fungicidas .....	28
4.2.2. Tamanho das colônias .....	32
4.3. Sobrevivência aos fungicidas	
4.3.1. Zineb .....	33

	Página
4.3.2. Captan .....	36
4.3.3. Benomyl .....	36
4.4. Promoção de esporulação e do desenvolvimento das colônias	
4.4.1. Recuperação da capacidade de esporular ..	50
4.4.2. Alteração das condições de cultivo .....	52
4.4.3. Alteração do meio de cultura .....	54
5. DISCUSSÃO .....	55
6. CONCLUSÕES .....	60
7. LITERATURA CITADA .....	61

## LISTA DE TABELAS

	Página
01 - Coloração dos isolados de <i>A. alternata</i> quando em meio de cultura com ou sem a adição de fungicidas .....	29
02 - Desenvolvimento das colônias em BDA , à temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , mantidas sempre no escuro, 7 dias após a inoculação.....	33
03 - Diâmetro médio das colônias (em cm) submetidas a concentrações crescentes de Zineb .....	34
04 - Porcentagem de desenvolvimento das colônias de cada isolado calculada a partir dos dados apresentados na Tabela 3 .....	34
05 - Diâmetro médio das colônias (em cm) submetidas a concentrações crescentes de Captan .....	37
06 - Porcentagem de desenvolvimento das colônias de cada isolado calculada a partir dos dados apresentados na Tabela 5.....	38
07 - Diâmetro médio das colônias (em cm) submetidas a concentrações crescentes de Benomyl .....	40
08 - Porcentagem de desenvolvimento das colônias de cada isolado calculada a partir dos dados apresentados na Tabela 7 .....	41
09 - Medida dos diâmetros das colônias de três isolados de <i>A. alternata</i> , 7 dias após a inoculação em meio de BDA, com ou sem a adição de extrato de folhas de girassol .....	51

- 10 - Grau de esporulação dos isolados quando submetidos a diferentes regimes de luz e injúria ao micélio, 7 dias após inoculação em meio de BDA ..... 52
- 11 - Crescimento das colônias submetidas a diferentes regimes de luz e injúria ao micélio, 7 dias após inoculação em meio de BDA ..... 53



## LISTA DE FIGURAS

	Página
01 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados da Tabela 4 .....	35
02 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados da Tabela 6 .....	39
03 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados da Tabela 8 .....	42
04 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados das Tabelas 4,6 e 8, para a linhagem 2208 <sub>3</sub> .....	43
05 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados das Tabelas 4,6 e 8, para a linhagem 2208 <sub>5</sub> .....	44
06 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados das Tabelas 4,6 e 8, para a linhagem 2208 <sub>22</sub> .....	45
07 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados das Tabelas 4,6 e 8, para a linhagem 2208 <sub>29</sub> .....	46
08 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados das Tabelas 6 e 8, para a linhagem 3119-3.....	47
09 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados das Tabelas 6 e 8, para a linhagem 3127-1.....	48
10 - Curvas Dose-Resposta obtidas a partir dos dados das Tabelas 6 e 8, para a linhagem 3127-3.....	49

## LISTA DE FOTOS

	Página
01 - Coloração do isolado 2208 <sub>22</sub> com e sem a adição de Zineb e do 2208 <sub>29</sub> , sem a <u>a</u> dição de fungicida.....	30
02 - Coloração dos isolados 2208 <sub>3</sub> e 2208 <sub>5</sub> com e sem a adição de Captan .....	30
03 - Coloração do isolado 3127-3 em meio de cultura com adição de Captan .....	31
04 - Coloração do isolado 3127-1 com a adição de Captan e do 3127-3, com adição de Benomyl ao meio de cultura .....	31

SENSIBILIDADE DE *Alternaria alternata*(Fr.)Keissler  
A TRÊS FUNGICIDAS

MARIA REGINA GONÇALVES UNGARO

Orientador: João Lúcio de Azevedo

RESUMO

Realizou-se o presente trabalho com o objetivo de se verificar os níveis de sensibilidade a três fungicidas, encontrados em isolados de *Alternaria alternata*(Fr.)Keissler isoladas de folhas e pecíolos de girassol(*Helianthus annuus* L) provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo e de sementes recebidas do exterior. Três fungicidas, Dithane Z-78, Captan 50WP e Benlate foram utilizados. Também, foram feitos ensaios sobre algumas condições de cultivo do fungo.

O isolamento de colônias de *Alternaria* revelou que duas espécies estavam ocorrendo, a saber, *A. alternata* e *A. helianthi*, em praticamente iguais proporções. Devido ao crescimento mais abundante e à melhor esporulação, a *A. alternata* foi usada nos ensaios posteriores. Quando em presença dos fungicidas, os isolados apresentaram alta variabilidade morfológica. O fungicida que maior influência teve na alteração da morfologia das colônias foi o Zineb. Com relação à inibição do desenvolvimento das colônias, os melhores foram, em ordem decrescente, Zineb, Benomyl e Captan, mantendo-se o Zineb como o mais eficiente no controle deste fungo "in vitro".

Fizeram-se várias alterações quanto às condições de cultivo para verificação do comportamento dos isolados. Assim, a adição de extrato de folhas de girassol em BDA recuperou a capacidade de esporular dos isolados que não mais

estavam esporulando, porém, houve reação diferente entre os isolados, quanto à sua influência no crescimento das colônias. O cultivo dos isolados em ausência de luz parece ser o mais indicado para o crescimento e esporulação, sendo que a adoção ou não de injúria ao micélio não mostrou influência na esporulação.

O ensaio também mostrou que tanto o meio de BDA (batata-dextrose-ágar) quanto o uso de papel de filtro embebido em solução V-8 apresentaram-se satisfatórios para o desenvolvimento e a esporulação, sendo indiferente o uso de qualquer um dos dois, ao passo que o meio de batata-ágar não se mostrou apropriado para esses isolados de *A. alternata*.

SENSIBILITY OF *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler  
TO THREE FUNGICIDES

MARIA REGINA GONÇALVES UNGARO

Adviser: João Lúcio de Azevedo

SUMMARY

The present work was conducted to verify the natural sensibility levels to three fungicides, founded in *Alternaria alternata* strains isolated from leaves and leaf-stalks of sunflower (*Helianthus annuus* L) from different regions of Sao Paulo State, and from seeds received from other countries. Three fungicides, Dithane Z-78, Captan 50WP e Benlate were used. Also, we studied the fungus cultural conditions.

The isolations of *Alternaria* revealed that the two species, *A. alternata* e *A. helianthi*, were occurring together in practically the same proportion, in the regions amostrated.

Due to its abundant growth and better sporulation, *A. alternata* was used in the latter tests. In relation to the fungicides, the isolates showed high morphological variability. The more effective fungicide causing this variability was Zineb. With regard to the colony development inhibition, the better were, in decreasing sequence, Zineb, Benomyl and Captan, Zineb conserving the most efficient control in the fungus development "in vitro".

Alterations in the culture conditions were made to verify the isolates' behaviour. Then, the addition of sunflower leaf-extract recovered the isolates' sporulation that had ceased, but did not showed different reactions in diffe-

rent reactions in different isolates in relation to their colony developments.

The cultivation of the isolates in the dark should be the most indicated for the development and sporulation, and the scraping of the culture did not showed any influence in the sporulation.

The study also showed that both PDA-media (potato-dextrose-agar) and the filter-paper with V-8 method were similar in their results; on the other hand, the potato-agar media was not appropriate for these isolates.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Alternaria alternata* (Fries) Keissler ataca o girassol (*Helianthus annuus* L) em várias regiões do mundo, podendo causar lesões nas folhas, hastes e pecíolos (HEDJAROU DE, 1973; SVETOV, 1975). A maioria dos trabalhos, porém, refere-se apenas ao gênero *Alternaria* em girassol, não entrando em detalhes quanto à espécie e sua importância agrônômica (LUCIANO e DAVREUX, 1967; VRANCEANU, 1974).

Toda vez que uma cultura passa a ser plantada em grande escala começam, também, a surgir os problemas com doenças. Quando se iniciou os estudos com *A. alternata* e sua reação face a três tipos de fungicidas, a cultura do girassol dava os primeiros passos no sentido de se tornar uma boa opção como segunda cultura no Brasil, isto é, plantada em fevereiro-março, após a cultura principal e, como tal, sujeita ao ataque de *Alternaria*, já verificado nos ensaios como aparecendo, principalmente, nos plantios mais tardios, ou seja, "da seca".

A utilização de fungicidas no combate à doença, embora seja uma solução para o problema, pode ser apenas de caráter temporário devido à emergência de linhagens resistentes ao fungo em questão. Até há poucos anos, a ocorrência de resistência era bastante rara devido ao tipo de fungicida utilizado, o qual era pouco específico. Com o aumento desta especificidade, principalmente devido ao aparecimento dos fungici

das sistêmicos, o problema passou a merecer estudos mais intensivos, visto que estes fungicidas atuam em sítios específicos do metabolismo celular e uma única alteração genética pode acabar resultando em um alto grau de resistência.

Com isto em mente, um dos objetivos da presente pesquisa foi o de verificar os níveis de resistência natural a alguns fungicidas, existentes em linhagens de *Alternaria alternata* isoladas de folhas e pecíolos de girassol plantado em diferentes regiões do Estado de São Paulo, e de sementes provenientes do exterior. No presente trabalho foram ensaiados três fungicidas, pertencentes a grupos distintos e, principalmente, com graus variáveis de especificidade: o Dithane Z-78, pertencente ao grupo dos tiocarbamatos, que vem sendo utilizado há muitos anos, de baixa especificidade e, portanto, com poucos problemas quanto ao desenvolvimento de resistência pelos patógenos; o Orthocide 50WP, pertencente ao grupo dos orgânicos, para o qual, os casos de resistência em campo são bastante raros; o Benlate, pertencente aos sistêmicos, com alta especificidade e, portanto, com desenvolvimento de resistência ao produto por parte dos patógenos, como realmente tem sido verificado tanto no campo quanto em ensaios de laboratório.

Como para ensaiar a resistência aos fungicidas era necessário um prévio conhecimento de alguns aspectos da biologia deste gênero, e a literatura a respeito apresentava-se com dados esparsos e nem sempre coincidentes, foram ensaiadas, ainda, algumas condições de cultivo, como complemento de informação e, também, para uso nos testes com os fungicidas.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Descrição do fungo

O gênero *Alternaria* compreende espécies saprofitas e patogênicas. Os conidióforos, de coloração escura, são curtos, espessos e algo alongados. Os conídios são septados transversalmente e muitos dos segmentos formados são divididos por septos longitudinais. O conídio é produzido em cadeia, sendo que o elemento basal da cadeia é o mais velho e melhor desenvolvido e o apical é produzido por último, sendo menor e não completamente septado. Em cadeias longas, o conídio terminal pode ser unicelular. As cadeias podem ser facilmente quebradas (VERONA e BENEDEK, 1959).

O conidióforo pode permanecer simples, com um único poro no seu ápice e produzindo um único conídio através do poro, ou ele pode-se tornar geniculado, através do crescimento renovado de sua célula apical na região lateral à do poro existente. Essa nova ramificação pode produzir um conídio no seu ápice e pode servir de base para extensões geniculadas adicionais. Células conidiais individuais também podem dar formação direta a conidióforos funcionais. Conidióforos produzidos diretamente por células conidiais e aqueles que surgem de hifas especializadas têm a mesma característica básica da região apical uniperfurada, abruptamente arredondada. A forma fundamental do conídio é ovóide, isto é, a porção proximal da célula

la, à qual lhe dá origem, é mais larga que a porção distal . Essa forma ovóide está comumente aparente em um estágio precoce do desenvolvimento do conídio, muitas vezes antes que o primeiro septo seja produzido. A parede do conídio é lisa ou com rugosidade variável. Um conídio pode permanecer solitário ou pode servir como unidade basal numa cadeia de conídios. As cadeias são formadas quando um conídio dá origem a um segundo, através de um poro simples no seu pico, de acordo com descrição feita por SIMMONS (1967).

Dependendo da espécie estudada, os processos fisiológicos podem ser influenciados por condições do ambiente, cada uma tendo o seu ambiente ótimo para a formação de conídio e conidióforo. GALLI et alii (1968) citam que os conídios são disseminados principalmente pelas sementes, sendo que permanecem viáveis em restos de cultura. Eles germinam em ampla gama de temperatura (1 a 45°C), sendo que o ótimo localiza-se entre 20 e 30°C, dependendo da espécie. Alto teor de umidade relativa no ar propicia uma esporulação abundante nas lesões. O fungo mostra uma grande variabilidade de características de patogenicidade, crescimento e capacidade de esporulação em cultura pura, provavelmente devido à heterocariose, que é frequente neste gênero ( GALLI et alii , 1968 ; NETZER e KENNETH, 1970).

BONDE, em 1929, já havia detectado linhagens fisiológicas de *A. solani*, as quais podiam ser diferenciadas com base, entre outras coisas, na produção de esporos , formação de pigmentos em BDA e rapidez de crescimento , sendo que a dimensão dos esporos não podia ser usada como diferenciador porque ocorria variação em diferentes condições de cultivo.

AQUINO et alii (1971) e RIBEIRO et alii (1974) descrevem a espécie *A. helianthi* como apresentando colônias restritas, com pouco mais de 1 cm de diâmetro, com conidióforos cilíndricos, de coloração amarela e cinza-clara, ligeiramente curvos, simples ou ramificados. Os conídios têm formas que va-

riam de cilíndrica a elipsóide longa; são ligeiramente curvos, com coloração variando entre amarela, cinza-claro a marron-claro; com 1 a 10 septos transversais (5 em média), ocasionalmente apresentando septos longitudinais, constrito nos septos, arredondados em ambas as extremidades, com dimensões médias de 84,55 x 22,67 micra.

A *A. alternata*, descrita em Simmons (1967), apresenta-se com conídios e conidióforos de coloração amarela-claro amarronzada a dourada. Conidióforos simples, retos ou curvos, lisos, com 1-3 septos, com uma perfuração apical, algumas vezes com a célula basal levemente protuberante. Conídio ovóide, obclavado, obpiriforme ou raramente elipsoidal, usualmente com um poro basal facilmente visível; quando elipsoidal, o bico torna-se menor. O bico nunca chega a igualar o comprimento do corpo do conídio, representando geralmente, 1/4 ou 1/3 do comprimento total do conídio. O corpo do conídio contém 1-8 septos transversais, 1 a 2 septos longitudinais em cada uma das 1-6 divisões transversais e, comumente, um septo fortemente oblíquo na divisão basal. Já foi descrito atacando o girassol no Irã (HEDJAROUDE, 1973) e Rússia (SVETOV, 1975).

A *A. zinniae*, também se encontra na literatura atacando o girassol na Argentina (MUNTANOLA, 1948); Quênia (NATRASS, 1950) e Canadá (MCDONALD e MARTENS, 1963) é diferente das anteriores por apresentar um apêndice no conídio e por dimensões distintas. Na classificação exposta por Joly (1967), esta espécie é citada como portadora de esporos amarelados, com dimensões de 50-60 x 15-25 micra, com transição abrupta entre o corpo do esporo e o bico, e com longo filamento.

## 2.2. Crescimento e esporulação do gênero *Alternaria*

### 2.2.1. Efeito da luz

RANDS (1917), estudando *A. solani*, para conseguir abundante esporulação, expôs as colônias à luz solar, mantendo-as, em seguida, no escuro. Uma segunda coleta de esporos podia

ser feita bastando-se umidecer as colônias e proceder como descrito acima. CHARLTON (1953), com esse mesmo fungo, promoveu a esporulação irradiando a cultura com luz ultravioleta para iniciar a esporulação, após o que, o melhor foi colocar as colônias no escuro porque a luz encorajava o crescimento de micélio aéreo, dificultando a remoção dos esporos.

LUKENS (1960) verificou que, após 24h em papel de filtro sob luz fluorescente, havia formação de conidióforos e que, quando a cultura era mantida no claro ou no escuro, por 24 horas, 50-75% dos conidióforos produziam conídios; culturas sob contínua exposição à luz não produziam conídios, mesmo após 7 dias. Em *A. solani* (Elli & Martin) Jones & Grout, *A. passiflorae* Simmons, *A. dauci* (Elli) Neerg. e *A. dianthicola* Neerg., ARAGAKI (1964) observou que a alternância de luz e escuro parecia necessária à esporulação.

Em *A. tomato* (Cke) Weber, ARAGAKI (1961) verificou que a esporulação abundante podia ocorrer tanto no claro quanto no escuro, dependendo da variação de temperatura.

FAHIM (1966), trabalhando com *A. porri* (Elli) Cif., determinou que colônias mantidas no escuro não esporulavam, sendo que, aquelas mantidas no claro ou submetidas a diferentes períodos de exposição à luz solar difusa, apresentavam esporulação variável de acordo com o regime adotado; esporulação abundante foi obtida após 2h de exposição a raios solares, seguido de 48h de incubação no escuro. Por outro lado, LLOYD (1968) incubou placas de Petri com *A. longipes* no escuro, obtendo boa esporulação; LUKENS e HORSFALL (1969) verificaram que conidióforos de *A. solani* crescidos em luz fluorescente (50-75 ft-c) produziram esporos cerca de 3h após terem sido colocados no escuro. Também VAN DEN HENVAL (1970) encontrou que, em *A. zinniae*, o crescimento é mais rápido no escuro, sendo que a luz tem pouca ou nenhuma influência na esporulação; para *A. alternata*, MISAGHI et alii (1978) determinaram que a luz não foi necessária para a esporulação, sendo que o tamanho, formato e número de conídios não se alteraram com os vários regimes de luz adotados.

Em *A. tomato*, ARAGAKI et alii (1973) citam que há abundante formação de conidióforos em culturas desenvolvidas sob constante exposição à luz fluorescente branca fria. Em culturas sob luz ultravioleta (aproximadamente 400 nm) não houve formação de conidióforos, o mesmo sendo citado em LUKENS e HORSFALL (1973). Neste caso, as culturas tornam-se de aparência cotonosa devido à abundante formação de micélio aéreo vegetativo. Porém, também ocorreu abundante formação de conidióforos quando a cultura se desenvolveu sob contínua exposição à radiação de luz fluorescente branca fria. Quando essa exposição se estendeu por 5 dias, seguida de 24h de escuro, os conidióforos regrediram para uma forma não vegetativa. GAMBOGI et alii (1976), trabalhando com *A. zinniae*, determinaram que a esporulação era mais abundante a baixas temperaturas, quando estimulada por alternância de luz próxima do ultravioleta. Já GUPTA e PUSHKARNATH (1962) induziram esporulação em *A. solani* através de exposição da cultura aos raios solares por 40 min., seguida de 60 min de raios infra-vermelhos, após 10 dias de escuro.

Ensaando a intensidade e a qualidade de luz em *A. tenuis*, JIMENEZ e MILLER (1966) notaram que, quando os isolados mantidos no escuro, eram colocados no claro durante 48h, havia aumento de esporulação. A produção de esporos aumentou com o aumento da intensidade de 0 a 400 ft-c, mas foi variável em intensidades maiores, sendo que 200 ft-c foi a melhor intensidade.

LUKENS e HORSFALL (1973) citam que a iniciação da formação de conídios nas extremidades dos conidióforos é induzida por ausência de luz visível. PRASAD et alii (1973) encontraram máxima formação de esporos em culturas colocadas na luz solar difusa; quando no escuro, a esporulação ocorria somente quando a temperatura era maior.

*A. solani* e *A. tomato* são tidas como sinônimos.

### 2.2.2. Efeito da temperatura

CHARLTON (1953) determinou como ideal para a esporulação de *A. solani*, a temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , vinculada

ã condição de escuro. Em *A. tomato* (Cke.) Weber, ARAGAKI (1961) encontrou que, em temperaturas que variavam entre 15 e 30°C, a colônia esporulava bem desde que mantida no escuro; porém, quando mantida sob iluminação, a temperatura poderia oscilar entre 16 e 23°C, sendo que, em temperaturas maiores, ocorria uma queda (23-25°C) ou mesmo paralização (acima de 25°C); esse mesmo autor, ARAGAKI (1964), estudando outras espécies de *Alternaria* (*A. solani*, *A. passiflorae*, *A. dauci* e *A. dianthicola*) observou que a alternância de luz e escuro parece necessária à esporulação, a mesma não ocorrendo sob iluminação a temperaturas entre 26 e 31°C. Porém, quando em incubadoras iluminadas a 20°C, ou no escuro entre 26 e 31°C, esporulava profusamente. Sob alternância de condições de luz e escuro, a esporulação aumenta com o aumento do fotoperíodo de 0-15 horas, mas decresce progressivamente com mais de 16 horas.

Ao contrário de ARAGAKI (1964), GUPTA e PUSHKARNATH (1962) induziram esporulação quando culturas de *A. solani* sofriam alternância de escuro e claro, a 27°C.

FAHIM (1966), trabalhando com *A. porri* (Ell.) Clif determinou que, em colônias mantidas sempre no escuro, não havia esporulação sendo que, aquelas mantidas no claro ou submetidas a diferentes períodos de exposição à luz solar difusa apresentavam esporulação variável, de acordo com o regime adotado. A temperatura ótima para esporulação foi 25°C; esporulação abundante foi encontrada após 2 horas de exposição aos raios de sol, seguida de 48 horas de incubação no escuro. Por outro lado, LLOYD (1968), incubou placas de Petri contendo *A. longipes*, a 25°C, no escuro, obtendo boa esporulação e LUKENS e HORSFALL (1969) verificaram que conidióforos de *A. solani* crescidos no claro a 23°C produziram esporos cerca de 3 horas após terem sido colocados no escuro. Também STRIDER (1978) verificou que *A. dianthi* cresce bem quando mantida no escuro, a 24°C.

MISAGHI et alii (1973) encontraram, em *A. al-*

*ternata*, uma correlação negativa entre temperatura de incubação e tamanho do conídio formado.

ARAGAKI et alii (1973), com *A. tomato*, citam a temperatura de 27°C como ideal. Já para *A. zinniae*, GAMBOGI et alii (1976) determinaram o ótimo entre 22 e 24°C para que houvesse crescimento rápido.

Já LUKENS e HORSFALL (1973) citam que, no gênero *Alternaria*, a iniciação da formação de conídios nas extremidades dos conidióforos pode ser induzida por baixas temperaturas.

PRASAD et alii (1973) verificaram, em *A. solani*, que as culturas colocadas no escuro requerem maiores temperaturas para esporulação e que esta é completamente inibida quando a temperatura atinge 48°C. Já para a germinação dos conídios, VERMA e PRASAD (1977) encontraram temperatura ótima de 30°C.

### 2.2.3. Injúria ao micélio

Alguns autores citam a injúria ao micélio como uma das maneiras de se promover uma esporulação abundante em fungos do gênero *Alternaria*, como é o caso de RANDS (1917) que, estudando *A. solani*, conseguiu abundante esporulação quando a colônia era cortada e o micélio severamente danificado. Ele promoveu o crescimento do fungo em placas de Petri, em meio de batata-ágar, por 10-12 dias, seguido de corte do ágar em tiras e agitação para separar os pedaços e, eventualmente, distribuí-los, controlando por 24 a 48 horas a relação de umidade, já que a maior superfície exposta induz a maior secagem do meio; FAHIM (1966), trabalhando com *A. porri* (Ell.) Clif., verificou que a injúria ao micélio não teve efeito significativo no número de esporos.

CHARLTON (1953) verificou, em *A. solani*, que a presença ou não de injúria ao micélio teve o mesmo efeito na

quantidade de esporos produzidos; porém, quando não injuriado, a presença de micélio aéreo dificultava a remoção dos esporos. Já LUKENS e HORSFALL (1973) citam que a injúria ao micélio não encorajou a produção de conidióforos em fungos do gênero *Alternaria*.

#### 2.2.4. Alteração do meio de cultura

No decorrer das pesquisas com as diferentes espécies de *Alternaria*, muitos meios de cultura têm sido utilizados, tentando melhorar a esporulação e o desenvolvimento, em cultura, do referido fungo.

Assim, em *A. zinniae*, DIMOCK e OSBORN (1943) usaram uma suspensão diluída de esporos e micélio, em 1% de ágar-água.

O meio de BDA (batata-dextrose-ágar) foi utilizado por GATANI (1954) e GERHOLD (1957) para cultivo de *A. solani* e por WHITE e STARRAT (1967) no cultivo de *A. zinniae*.

ARAGAKI (1961 e 1964) e ARAGAKI et alii (1973) usaram, em *A. tomato*, V-8-ágar, composto de 10% de suco V-8, 0,2% de CaCO<sub>3</sub> e 2% de ágar.

Ainda usando o meio V-8, MCDONALD e MARTENS (1963) ensaiaram algumas modificações no cultivo de *A. zinniae*, na obtenção de esporos para propósitos de inoculação. Assim sendo, utilizaram o método de papel de filtro, sugerido por LUKENS (1960). Fitas de papel de filtro foram colocadas em tubos de ensaio contendo cerca de 5 ml de V-8, após o que, foi inoculado com uma suspensão de esporos de *A. zinniae*. Após 14 dias em temperatura ambiente, houve abundante formação de esporos sobre essas tiras.

Como foi difícil a retirada desses esporos, o método foi modificado para o uso de placas de Petri, nas quais discos de papel de filtro, molhados em V-8, foram colocados e, em seguida, autoclavados. Esses discos foram, posteriormente,



cobertos com batata-ágar-água e inoculados com uma suspensão de esporos. A grande quantidade de esporos formados foram facilmente lavados da superfície para se conseguir uma suspensão dos mesmos.

Culturas de *A. porri* foram estocadas em BDA por FAHIM (1966) e as culturas experimentais foram desenvolvidas em batata-ágar, sendo que, das concentrações de batata ensaiadas, a que resultou em melhor esporulação foi a de 50 g/l.

O BDA também foi utilizado por GATANI (1954) e GERHOLD (1967) para cultivo de *A. solani* e por WHITE e STARRAT (1967), no cultivo de *A. zinniae*.

IONNAIDIS e MAIN (1973), estudando meios de cultura para *A. alternata*, concluíram que o melhor para a produção de conídios foi o "lima bean agar". Em BDA e V-8 ágar, as concentrações ótimas para promover esporulação foram 1x e 3x a concentração da fórmula padrão, respectivamente. A concentração de ágar utilizada foi constante e igual a 20 g/l. Nem o meio nem a sua concentração afetaram o crescimento radial da cultura. No entanto, a densidade do micélio aumentou sensivelmente com o aumento da concentração dos meios. Os autores usaram o Tween 80 a 0,01% para a suspensão de esporos. Ainda com este mesmo fungo, MISAGHI et alii (1978), usaram o "corn meal agar" como meio de cultura, enquanto VERMA e PRASAD (1977), estudando o ataque de *Alternaria* em *Juglans regia* L, determinaram que os esporos germinam e se desenvolvem bem em solução de ágar com 1% de sucrose.

Tanto "lima bean" quanto V-8 ágar foram utilizados para induzir abundante esporulação em *A. dianthi* por STRIDER (1978). A esporulação em BDA e "oatmeal agar" foi moderada e ao acaso, sendo que em ágar-água, ela foi incipiente e em "corn meal agar" ela não ocorreu.

Uma outra maneira de se tentar aumentar a esporulação e o desenvolvimento da colônia é através da adição de extrato de folhas da cultura em que o patógeno ataca. Isso já

foi testado com folhas de amendoim tanto para *Mycosphaerella arachidicola* e *M. berkeleyi* por ABDU (1966) como para *Cercospora arachidicola* por SMITH (1971) e MORAES (1977). A diferença entre os ensaios de cada um dos três autores foi que ABDU usou o método de decocção e os outros dois usaram o de extração. No entanto, MORAES (1977) ressalva que a decocção parece ser melhor para a extração dos nutrientes.

Como conclusão dos quatro itens discutidos, podemos dizer que colônias colocadas no claro tendem a preferir temperaturas mais baixas, enquanto que aquelas colocadas no escuro preferem temperaturas mais elevadas; a injúria ao micélio e o meio de cultura variam com a espécie e as condições de cultivo.

### 2.3. Fungicidas

SEILER (1975), discorrendo sobre a classificação dos fungicidas, colocou-os em dois grupos: protetores e curativos. Os fungicidas protetores são aqueles que não podem penetrar nos tecidos das plantas e devem ser usados na prevenção das infecções. Para que isto seja efetivo, há necessidade de que toda a superfície da planta esteja coberta pelo fungicida para que não ocorra o estabelecimento do patógeno, sendo que a aplicação precisa ser continuamente repetida para proteger as partes em contínuo crescimento. A este grupo pertencem as preparações à base de cobre e enxofre, as quais ainda hoje são utilizadas.

Posteriormente, desenvolveram-se os fungicidas orgânicos, dos quais fazem parte os ditiocarbamatos e as ftalimidas, que são largamente utilizados. Mais recentemente, foram desenvolvidos os sistêmicos, os quais são capazes de penetrar nas células vegetais e controlar doenças de fungos que já se tenham estabelecido, constituindo-se na classe dos fungicidas curativos. Os fungicidas sistêmicos são transportados das áreas de aplicação para as regiões de crescimento da planta, protegendo-as. Os sistêmicos necessitam ser aplicados

somente quando as doenças já estão presentes e o número de aplicações se reduz bastante. O primeiro sistêmico a ser introduzido na agricultura foi o Benomyl (Benlate).

A ocorrência de resistência a fungicidas era rara até há pouco tempo devido à pouca especificidade apresentada pelos fungicidas utilizados, que eram de ação protetora. Porém, este problema vem-se agravando no presente, devido ao aumento da seletividade dos fungicidas utilizados.

Em uma revisão feita por ASHIDA (1965) sobre a adaptação de fungos a fungicidas metálicos, não foi encontrado nenhum caso de importância fitopatológica. GEORGOPOULOS e ZARACOVITIS (1967) constataram o mesmo em sua revisão sobre fungicidas orgânicos.

Segundo GEORGOPOULOS (1969) somente eram reconhecidos uns poucos casos em que a indução de resistência trouxera problemas para a agricultura. Porém, ele já advertia que, da mesma maneira que o uso de fungicidas mais específicos diminua o risco para a planta, ele também aumenta o risco de aparecimento de resistência por parte do fungo.

BYRDE (1970), discorrendo sobre as propriedades dos fungicidas, diz que, para que um sistêmico tenha sucesso, ele necessita ser rapidamente absorvido pela planta e ser capaz de translocação; deve resistir a uma degradação rápida ou, se isto ocorrer, os seus produtos de decomposição devem, também, ser efetivos; deve estar apto a penetrar na membrana do patógeno e interferir em algum processo vital (enquanto não faz o mesmo com o hospedeiro). Observou-se que a maioria dos fungicidas convencionais são inibidores dos sistemas de produção de energia, enquanto que os sistêmicos agem, primeiramente, contra a síntese de proteínas ou da parede celular (o que é de importância imediata para o patógeno, muito mais do que para o hospedeiro, por causa da necessidade de crescimento rápido que o patógeno tem)

TOLEDO (1974), em sua revisão a respeito da resistência a fungicidas, não se refere ao desenvolvimento de resistência ao fungicida Zineb, do grupo dos ditiocarbâmicos. Já para o Captan, pertencente aos orgânicos, tanto *Penicillium notatum* quanto *Stemphyllium sarcinaeforme* e *Sclerotinia fructicola* há casos de desenvolvimento de resistência. Finalmente, no grupo dos sistêmicos, resistência em *Fusarium oxisporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc)Snyd & Hans, *Aspergillus nidulans*, *Sphaeroteca fuliginea* (Schlecht)Poll, *Botrytis cinerea*, *Penicillium brevicompactum* Dierckx, *P. corymbiferum* Wistling, *P. italicum* e *P. digitatum*, *Colletotrichum musae*, *Erysiphe graminis* e *Mycosphaerella fragariae*, foi encontrada para o fungicida Benomyl.

Nota-se, então, pelos dados acima, que os fungicidas mais modernos vêm apresentando um aumento assustador de casos de resistência quando comparados com os em uso há mais tempo. Isso pode ser explicado sabendo-se que, quando um fungicida do tipo dos ditiocarbamatos e dos metálicos interfere em muitos sítios do metabolismo do fungo, a obtenção de mutantes resistentes envolve diversas mutações complementares, ao contrário dos de um único sítio, como é o caso dos sistêmicos.

O primeiro grupo de fungicidas que estudamos foi o dos ditiocarbâmicos, que compreende fungicidas utilizados há muito tempo. Como exemplo típico, cita-se o Zineb, de ação protetora, sendo descrito como controlando ataque das mais diferentes espécies do gênero *Alternaria*, tanto no campo quanto em condições de laboratório. Trabalhos a respeito foram feitos por GERHOLD (1957), com *A. solani*, em laboratório, na dosagem de 3,85 mg/ml; por PROTA (1960), no tratamento de sementes de *Zinnia elegans* para controle de *A. zinniae*; por DICKINSON e WALLACE (1976), EKBOTE e MORE (1977) e AGRAWAL et alii (1978), em *Alternaria* atacando trigo, verificando a boa eficiência do Zineb, o mesmo acontecendo em *Alternaria* isolada de *Juglans regia*, L., estudada por LEYENDECKER (1954) e VERMA et alii

(1977). No controle de *A. solani*, dos fungicidas ensaiados por LODHA (1977), o Dithane Z-78 foi dos mais efetivos. STRIDER (1978) cita que o Zineb é bastante usado no controle de *A. dianthi*, na concentração de cerca de 1,3 mg/ml.

CHOPRA e JHOOTY (1975) encontraram um ED<sub>50</sub> de 45 ug/ml para *A. cucumerina*, em laboratório.

Ainda do grupo dos orgânicos, foi escolhido, no presente trabalho, o Captan, como representante das ftalimidas, o qual, segundo HOCHSTEIN e COX (1956), parece afetar a degradação de carboidratos em fungos e inibir a fermentação de glicose pelos conídios, sugerindo a possibilidade de que a conversão de piruvato para álcool também possa ser afetada. Os casos de resistência em condições de campo são bastante raros, porém, em laboratório, há descrição de formas resistentes em *Penicillium notatum*, *Sclerotinia fructicola* e *Stemphyllium sarcinaeforme* (PARTRIDGE e RICH, 1962) e em *Botrytis cinerea* (PARRY e WOOD, 1959).

SLIFKIN (1973) verificou que, quando colônias de *A. mali* eram expostas aos produtos de decomposição deste fungicida, a produção de conídios era incrementada, porém, poucos eram viáveis.

Um dado importante obtido por KO et alii (1976) em seu trabalho com *A. solani*, foi que a eficiência do Captan e do Benomyl não é alterada quando o meio usado é água ou agar-água, o que não acontece com alguns outros produtos, sendo importante no momento de se confrontar resultados. Encontraram, ainda, que o Captan era eficiente no controle desta espécie, enquanto que o Benomyl mostrava baixa eficiência.

STRIDER (1978) utilizou a dosagem de 1,19 mg/ml de Captan, obtendo bons resultados no controle de *A. dianthi*.

Do grupo dos sistêmicos foi escolhido o Benomyl como representante. ERWIN (1973), apresentando suas vantagens, cita, entre elas, a sua decomposição em MBC, quando em água, o

qual não é um produto fitotóxico, ao contrário da Butilamina ; de seu grupo de fungicidas, ele é o mais efetivo; pode ser adicionado ao meio de cultura antes da autoclavagem, por ser resistente ao calor. A tolerância apresentada por alguns isolados pode ser explicada por absorção lenta, destoxificação ou alguns outros fatores metabólicos. O MBC parece inibir a síntese de DNA ou processo estreitamente relacionado (SEILER, 1975).

LEYENDECKER (1954) obteve resultados satisfatórios na aplicação de 0,88 mg/ml do princípio ativo contra diferentes espécies de *Alternaria*; ENGLEHARD (1972), utilizando-se de 16 fungicidas durante cinco meses, observou que *A. dianthi* atacou mais severamente as folhas e hastes de crisântemos pulverizados com Benomyl que sobre as pulverizadas com água ; DICKINSON e WALLACE (1976) não conseguiram controlar *Alternaria sp* e *A. alternata*, em folhas de trigo, da mesma maneira que BARNETT e LUKE (1976), mesmo com uma concentração de 3,125 mg/ml também não conseguiram controle satisfatório.

LAMBERT e WEST (1975), trabalhando com linhagens de *Verticillium malthousei* tolerantes a Benomyl, encontraram que elas foram mais tolerantes a soluções de 20 ug/ml de Zineb que os conídios sensíveis a Benomyl.

Provavelmente devido à baixa concentração utilizada, que foi de cerca de 0,300 mg/ml, STRIDER (1978) não conseguiu bom controle de *A. dianthi* com este fungicida.

A frequência de mutação para resistência a Benomyl foi determinada por VAN TUYL (1977) como sendo de um mutante em  $10^7$  esporos.

Outro dado de importância para o presente trabalho foi obtido por RICHMOND e PRING (1980) que, comparando isolados de *Botrytis cinerea* sensíveis e resistentes a Benomyl, verificaram que a maioria dos isolados resistentes cresciam mais lentamente que os sensíveis, porém, alguns chegavam a crescer mais depressa, quando na ausência do fungicida; estes mes-

mos isolados não tinham sua taxa de crescimento reduzida quando eram colocados na presença do fungicida e ainda produziam mais esporos que a maioria dos isolados sensíveis.

#### 2.4. Genética do gênero *Alternaria*

A modificação do comportamento de um organismo, quando em presença de um fungicida, pode-se dar por diversas maneiras. AZEVEDO (1976) cita-as, discorrendo sobre elas: 1) mutação, a qual nada mais é do que um erro na replicação do DNA; 2) recombinação sexual, a qual consiste na fusão de dois núcleos haplóides dando, então, um núcleo diplóide que, por divisão meiótica produz, novamente, núcleos haplóides; 3) heterocariose, que vem a ser a coexistência de núcleos geneticamente diferentes em um citoplasma comum; 4) parassexualidade, a qual consiste na fusão de núcleos haplóides de genótipos diferentes em um heterocário dando, assim, um núcleo diplóide, o qual, depois de passar por divisões mitóticas, pode sofrer permuta mitótica, resultando em recombinantes. Ou, também, por não-disjunção mitótica, pode passar por diversas fases de aneuploidia e formar haplóides diferentes dos originais; 5) fatores citoplasmáticos.

Desde que não se conhece estágio sexual em *Alternaria*, SLIFKIN (1973) elimina a recombinação como fonte provável de variação neste gênero. Ele obteve duas variantes de *A. mali* quando conídios homocarióticos foram expostos ao Captan. Quando este mesmo fungo foi exposto, durante dez gerações, ao Zineb, não ocorreu adaptação a esse fungicida. No entanto, ocorreram alterações morfológicas, isto é, as colônias quando em contato com o fungicida, passavam do verde-cremoso para verde acinzentado e eram mais flocosas. Ainda neste trabalho, notou-se que as formas variantes encontradas após exposição aos fungicidas, não revertiam e se mantiveram mesmo após cinco ge-

rações em cinco meios diferentes, sugerindo que eles eram mutantes provenientes de conídios homocarióticos. O fato de que o mesmo número de conídios tratados e não tratados não apresentou "saltation" ou mutações e que um isolado replicado a cada 2 a 4 semanas, durante sete meses, manteve suas características, indica que os variantes foram induzidos pelos fungicidas.

Como descrito em GALLI et alii (1968), o fungo mostra uma grande variabilidade de características de patogenicidade, crescimento e capacidade de esporulação em cultura pura, provavelmente devido à heterocariose, que é frequente neste gênero.

Aliás, NETZER e KENNETH (1970), também explicam a grande variabilidade do gênero *Alternaria* atribuindo-a à heterocariose, além da parassexualidade e mutação.

Tanto em *A. dauci*, NETZER e KENNETH (1970), como em *A. solani*, STALL (1958), observou-se que os conidióforos eram multinucleados, na maioria dos casos. *A. dauci* apresentou-se com conídios multinucleados, geralmente homocarióticos, ao passo que em *A. solani* era frequente o aparecimento de heterocariose.

HARTMANN (1966) determinou que *A. tenuis* produz, no mesmo micélio, tanto conídios em que todos os núcleos resultam de divisões de um único, como conídios nos quais mais de um núcleo migrou da célula apical do conidióforo. Ele possui núcleos variando de 1 a 11 por célula de hifa. Conidióforo multiseptado é formado quando os núcleos são arranjados em pequenos intervalos ao longo do comprimento do conidióforo e o septo é formado entre eles. Já em *A. solani*, STALL (1958) encontrou de 1 a 9 núcleos por célula.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens utilizadas, sua origem e isolamento

Fungos do gênero *Alternaria* costumam aparecer atacando o girassol (*Helianthus annuus* L) frequentemente nas folhas, hastes e pecíolos, sendo que, geralmente, o ataque às folhas antecede aos demais.

O material utilizado foi coletado de folhas apresentando lesões aproximadamente circulares, com o centro necrótico rodeado por uma região clorótica; nas hastes e pecíolos as manchas apresentaram-se um pouco mais alongadas.

O isolamento do material foi feito retirando-se pequenas porções da região de transição entre tecido sadio e doente, colocando-as em placas de Petri contendo cerca de 25ml de BDA (batata-dextrose-ágar) e incubando-as, no escuro, a 27°C. Após 5 ou 6 dias, as colônias que evidenciaram serem de *Alternaria* foram repicadas em diferentes placas de Petri, as quais foram mantidas como descrito acima e observadas, após a sua esporulação, para identificação da espécie do fungo.

Foram, ainda, feitos isolamentos a partir de sementes procedentes da Rodésia, as quais foram colocadas em placas de Petri com BDA, procedendo-se como para as lesões.

Tanto as sementes quanto o material retirado das regiões doentes passaram por desinfecção superficial composta

de um mergulho do material em álcool etílico, seguido de 1<sup>1/2</sup> minuto em solução de hipoclorito de sódio 1:3.

Dos isolamentos feitos, escolheram-se os seguintes para dar sequência aos ensaios:

Isolado nº 2208<sub>3</sub>, a partir de haste e capítulo do cultivar URL III, plantado em Tietê, S.P., no ano agrícola de 1976.

Isolado nº 3119-3, a partir de capítulos do cultivar VNIIMK, plantado em Ribeirão Preto, S.P., em 1976.

Isolados nº 3127-1 e 3127-3, originários de um ensaio de cultivares instalado no Centro Experimental de Campinas, no ano agrícola de 1978.

Isolados 2208<sub>5</sub>, 2208<sub>22</sub>, 2208<sub>29</sub>, a partir de sementes de girassol provenientes da Rodésia, recebidas em 1977.

### 3.2. Caracterização dos isolados

Os isolados foram diferenciados entre si com base em suas diferenças morfológicas e fisiológicas, a saber: coloração das colônias 7 dias após inoculação em BDA; esporulação; tamanho das colônias em BDA; comportamento face aos fungicidas utilizados; aparência dos conídios.

### 3.3. Fungicidas ensaiados

#### 3.3.1. Dithanè Z-78 (Rhom and Haas do Brasil S.A.)

Com 75% de princípio ativo, conhecido tecnicamente como Zineb, vem a ser um fungicida orgânico, do grupo dos ditiocarbâmicos, cuja fórmula é etileno bi-ditiocarbamato de zinco (GALLI et alii, 1968).

#### 3.3.2. Orthocide 50 WP (Stauffer Chemicals)

Tecnicamente conhecido como Captan, contém 50% de princípio ativo. Vem a ser um fungicida orgânico, cuja fórmula é N(triclorometil-thio)-4-ciclohexana-1,2-dicarboxamida. Ele

é sintetizado pela reação do perclorometil mercaptan com certas imidas, amidas e hidantóides (HOCHSTEIN e COX, 1956).

### 3.3.3. Benlate (Du Pont do Brasil S.A.)

Conhecido como Benomyl, com 50% de princípio ativo, foi o primeiro fungicida sistêmico a ser utilizado e vem a ser o metil-1(butilcarbamil)2-benzimidazol carbamato (MBC), o qual, possivelmente, ocupa uma posição chave na toxicidade global (ERWIN, 1972; SEILER, 1975).

## 3.4. Soluções e meios de cultura utilizados

### 3.4.1. Solução de Tween

Tween 80 .....	0,1 ml
Água destilada até .....	100,0 ml

A solução é agitada durante uns 20 minutos para completa dissolução do Tween 80.

### 3.4.2. Solução de extrato de folhas de girassol

Folhas sadias, sem terem sido anteriormente pulverizadas com qualquer tipo de fungicida, provenientes de plantas de girassol com cerca de 40 dias após o plantio.

Água

Cozinham-se as folhas em água e coa-se a mistura para se extrair o suco.

### 3.4.3. Meio de batata-ágar

Constituído de:

Ágar em fita .....	20 g
Batata .....	200 g
Água para completar .....	1000ml

Cozinham-se as batatas em água e extrai-se o

suco ao qual, após filtragem em algodão, é adicionado o ágar e completado o volume com água.

#### 3.4.4. Meio de BDA (batata-dextrose-ágar)

Idem meio de batata-ágar-água, adicionando-se , ainda, 20 g de açúcar (dextrose).

#### 3.4.5. Solução de V-8

V-8 é o nome de um produto da "Campbell Soup Co" constituído de uma mistura dos sucos de tomate, cenoura, beterraba, alface, agrião, espinafre, salsa e aipo. Essa solução pode servir de substrato para o desenvolvimento de fungos, como proposto primeiramente por MILLER (1955), em adição a 0,2% de  $\text{CaCO}_3$  e 2% de ágar.

Neste trabalho usou-se a modificação proposta por MCDONALD e MARTENS (1963), em que círculos de papel de filtro, embebidos em V-8, foram colocados em placas de Petri e autoclavados, após o que, foram recobertos por uma fina camada de ágar-água e o inóculo colocado sobre essa camada. A diferença, no presente ensaio, foi que, em vez de ágar-água, utilizou-se batata-ágar-água ou mesmo o BDA (batata-dextrose-ágar).

#### 3.4.6. Meio com Zineb (Dithane Z-78)

Zineb foi diluído em BDA em concentrações crescentes variáveis de 10 a 2.500  $\mu\text{g/ml}$  do princípio ativo.

#### 3.4.7. Meio com Benomyl (Benlate)

Benomyl foi colocado em BDA, diluído em acetona, em dosagens crescentes de 10 a 5.000  $\mu\text{g/ml}$  do princípio ativo.

#### 3.4.8. Meio com Captan (Captan 50 WP)

Captan foi diluído em BDA, em dosagens crescentes de 10 a 5.000  $\mu\text{g/ml}$  do princípio ativo.

### 3.4.9. Condições de preparo e conservação das soluções e dos meios de cultura utilizados

Significado dos quesitos:

- A- Autoclavados a 120°C, durante 20 minutos
- B- Levado a banho-maria por 5 minutos
- C- Diluição em acetona, não excedendo a 1% da solução
- D- Conservação à temperatura ambiente
- E- Conservação em geladeira, a 10°C
- F- Preparado pouco antes de usar

Soluções e meios de cultura	Quesitos correspondentes
Solução de Tween	A, D
Solução de extrato de folhas de girassol	A, D
Solução de V-8	A, E
Meio de BDA	A, D
Meio de ágar-água	A, D
Meio com Dithane Z-78	B, F
Meio com Benlate	C, B, F
Meio com Captan	B, F

### 3.5. Inoculação e incubação

A inoculação em meio de cultura foi feita procedendo-se à retirada de porções de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup>, da região do perímetro externo de uma colônia do fungo com cerca de 10 dias, utilizando-se de um fio de níquel-cromo, e colocando-as no centro de placas de Petri contendo o meio de cultura, na presença ou ausência dos fungicidas.

A incubação foi feita em estufa com temperatura constante de 27<sup>±</sup>1°C, na ausência de luz.

O material a ser utilizado em inoculações futu

ras foi guardado em geladeira, em meio de BDA.

Os isolados em estudo foram conservados em água esterilizada, na Micoteca da Seção de Microbiologia Fito-técnica do Instituto Agronômico de Campinas.

### 3.6. Sobrevivência aos fungicidas

Cada um dos isolados foi inoculado em meio de BDA, contendo doses crescentes dos fungicidas ensaiados. As doses variaram de acordo com os fungicidas utilizados, como descrito nos itens 3.4.6., 3.4.7. e 3.4.8.

Sete dias após a inoculação mediu-se os diâmetros das colônias que se desenvolveram, tomando-se o cuidado de não incluir, nesta medida, os mutantes que porventura pudessem aparecer.

Ao valor da dose 0 (zero) ou testemunha foi atribuído 100%, isto é, o máximo crescimento da colônia na ausência do fungicida, sete dias após a inoculação. As demais medidas foram dados valores proporcionais à dose 0 ou testemunha

Após a inoculação, os isolados foram mantidos no escuro, a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 7 dias. Cada tratamento teve de 3 a 5 repetições.

### 3.7. Curva Dose-Resposta

O efeito dos três fungicidas utilizados sobre os isolados de *A. alternata* foi determinado através da medida do diâmetro das colônias. Porções de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$  de colônias dos diferentes isolados foram retiradas de culturas com cerca de 10 dias, da região perimetral externa e repicadas em meio de BDA contendo as diferentes doses utilizadas dos fungicidas, como descrito nos itens 3.4.6., 3.4.7. e 3.4.8. As placas controle não se adicionou nenhuma dosagem do fungicida.

A tomada dos diâmetros das colônias foi feita sete dias após a inoculação.

### 3.8. Recuperação de conidiação

Após longo período mantidas em meio de cultura, as colônias tornaram-se miceliais, não mais apresentando esporulação, além de ter o seu desenvolvimento diminuído. Para promover a esporulação, foram coletadas algumas folhas de girassol, as quais não haviam sido anteriormente pulverizadas com nenhum tipo de fungicida. As folhas foram cozidas e extraiu-se o suco ou extrato, por cocção, o qual foi adicionado ao meio de cultura, na proporção de 1/10.

Foram ensaiados os isolados 2208<sub>3</sub>, 2208<sub>22</sub> e o 2208<sub>29</sub>, os quais foram inoculados em meio de BDA, com ou sem a adição de extrato. Após 7 dias, foram tomadas as medidas dos diâmetros das colônias e feitas algumas lâminas para observação, em microscópio, da existência ou não de conídios.

### 3.9. Promoção da esporulação e do desenvolvimento das colônias.

#### 3.9.1. Alteração das condições de cultivo

Por serem muito escassas as citações bibliográficas referentes à biologia de *A.alternata* foram ensaiadas algumas situações para tentar aumentar a esporulação e o desenvolvimento das colônias deste fungo.

Foram escolhidos três isolados, 2208<sub>3</sub>, 2208<sub>5</sub> e 2208<sub>29</sub>, para o ensaio de crescimento e esporulação nos seguintes tratamentos:

Tratamento A- isolados mantidos sempre no escuro, após a inoculação em BDA. Sem injúria ao micélio.

Tratamento B- isolados mantidos sempre no escuro, sendo feita injúria ao micélio no 7º dia após a inoculação

Tratamento C- Mantidos sempre no claro, em estufa com iluminação fluorescente. Sem injúria ao micélio

Tratamento D- Mantidos sempre no claro. Injúria

ao micélio no 7º dia após a inoculação em meio de BDA.

Tratamento E- colônias mantidas no escuro até o 6º dia após a inoculação, permanecendo, então, durante 4 dias em estufa iluminada. Sem injúria ao micélio.

Tratamento F- o mesmo procedimento do tratamento E, somente diferenciando a existência de injúria ao micélio no 7º dia após a inoculação em BDA.

Cada tratamento teve três repetições por isolado.

As placas de Petri, de vidro Pirex, foram colocadas a cerca de 30 cm de distância da lâmpada Phillips luz do dia, quando em estufa iluminada, mantendo-se a temperatura a cerca de 27°C.

A interpretação dos resultados foi feita utilizando-se dos diâmetros e aparência das colônias no 10º dia após a inoculação e feitura de lâminas para verificação do grau de esporulação das colônias.

Para verificação do grau de esporulação foram atribuídas notas, da seguinte maneira:

- 1- micélio iniciando ou mesmo sem esporulação
- 2- micélio diferenciado
- 3- pequena esporulação, isto é, menos que  $10^4$  esporos/ml
- 4- esporulação média, a saber, entre  $10^4$  e  $10^6$  esporos/ml
- 5- esporulação abundante, isto é, mais que a concentração de  $10^6$  esporos/ml



A contagem dos esporos foi feita colocando-se 10 ml de solução de Tween na placa contendo o isolado ensaiado e procedendo-se à raspagem da colônia com uma lâmina de vidro, após o que, a suspensão de conídios era transferida para um tubo de ensaio. Do tubo retirava-se, com o auxílio de uma pipeta, uma pequena quantidade de suspensão, a qual era colocada num hemacitômetro, procedendo-se à contagem dos esporos ao microscópio.

### 3.9.2. Alteração do meio de cultura

Uma outra maneira ensaiada para se tentar incrementar a produção de esporos foi o uso de meio de cultura com V-8. Papel de filtro foi embebido em solução de V-8, colocando-o, em seguida, em placas de Petri e autoclavando. Em sequência, foi colocada uma fina camada de BDA sobre o papel de filtro contendo o V-8. Semeou-se o isolado nesse meio e as placas foram incubadas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  no escuro, durante 10 dias. Após esse período, as placas foram examinadas e procedeu-se à leitura das lâminas e observação da esporulação.

Também foi usado, como teste, colocar meio de batata-ágar-água ao invés de BDA, procedendo-se, em seguida, como já descrito.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Caracterização das espécies de *Alternaria* encontradas e morfologia de suas colônias

Dos 16 isolamentos feitos, 13 resultaram em fungos do gênero *Alternaria*, de duas espécies: *A. alternata* (Fr.) Keissler e *A. helianthi* Tubaki e Nishihara, aproximadamente em iguais proporções, em se tratando de material isolado de folhas, hastes e pecíolos. No caso do isolamento a partir de sementes, só foi detectada a *A. alternata*. Em um teste inicial, a espécie *A. helianthi* apresentou-se com colônias restritas, de coloração parda-clara. Por outro lado, a *A. alternata* apresentou colônias de coloração variável entre o branco-esverdeado, verde-oliva acinzentado e cinza-escuro, bem desenvolvidas sendo, por isso, escolhida para prosseguir com os trabalhos. Os isolados ensaiados no ítem 3.1. (Material e métodos) foram utilizados nos demais passos do trabalho.

##### 4.2. Diferenças morfológicas entre os isolados

###### 4.2.1. Coloração quando em ausência ou presença dos fungicidas

A colônia do isolado 2208<sub>3</sub> mostrou-se cinza-clara, com um halo mais escuro em volta (foto 2) quando em meio de BDA sem a adição do fungicida; o do 2208<sub>5</sub> apresentou-se cinza

Tabela 1 - Coloração dos isolados de *A. alternata* quando em meio de cultura com ou sem a adição de fungicidas

Isolado	fungicida	coloração das colônias
2208 <sub>3</sub>	isento	cinza-claro, com halo mais escuro (foto 2)
	Zineb	sem alteração
	Captan	micélio branco, cotonoso
	Benomyl	sem alteração
2208 <sub>5</sub>	isento	cinza-escuro esverdeado, com halo cinza-claro (foto 2)
	Zineb	cinza-claro, ficando salmon nas concentrações mais altas
	Captan	cinza-claro cotonoso (foto 2)
	Benomyl	sem alteração
2208 <sub>22</sub>	isento	verde-escuro acinzentado (foto 1)
	Zineb	amarelo ouro, nas concentrações mais altas (foto 1)
	Captan	sem alteração
	Benomyl	sem alteração
2208 <sub>29</sub>	isento	verde-claro acinzentado
	Zineb	sem alteração
	Captan	sem alteração
	Benomyl	amarelada
3119-3	isento	cinza
	Captan	sem alteração
	Benomyl	sem alteração
3127-1	isento	cinza
	Captan	cinza-escuro (foto 4)
	Benomyl	cinza-escuro (foto 4)
3127-3	isento	cinza
	Captan	cinza, clareando nas concentrações mais altas (foto 3)
	Benomyl	cinza-escuro (foto 4)

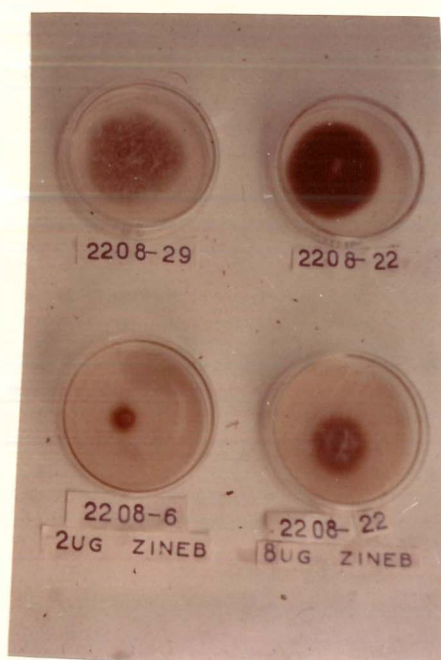


Foto 1- Coloração do isolado 2208<sub>22</sub> com e sem a adição de Zineb e da 2208<sub>29</sub>, sem a adição de fungicida.



Foto 2- Coloração dos isolados 2208<sub>3</sub> e 2208<sub>5</sub> com e sem a adição de Captan.

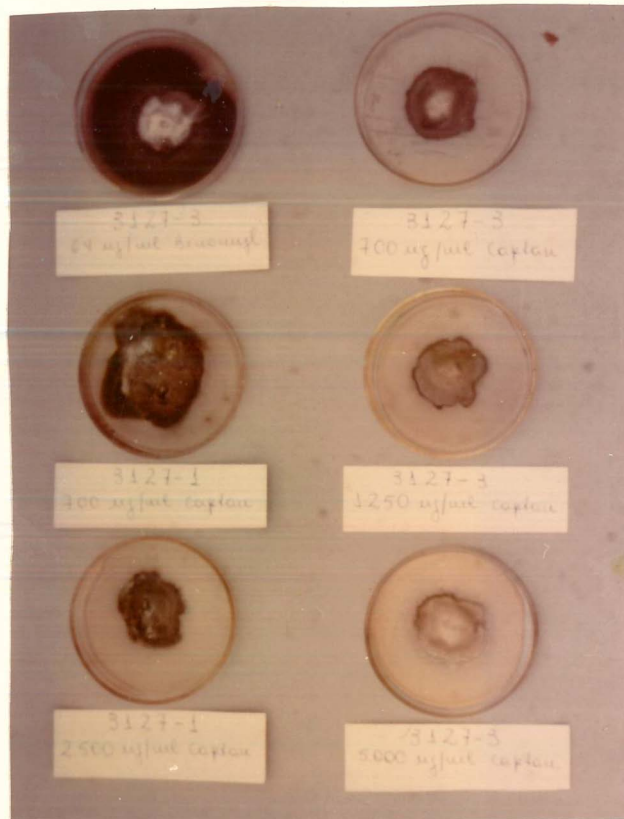


Foto 3- Coloração do isolado 3127-3 em meio de cultura com adição de Captan

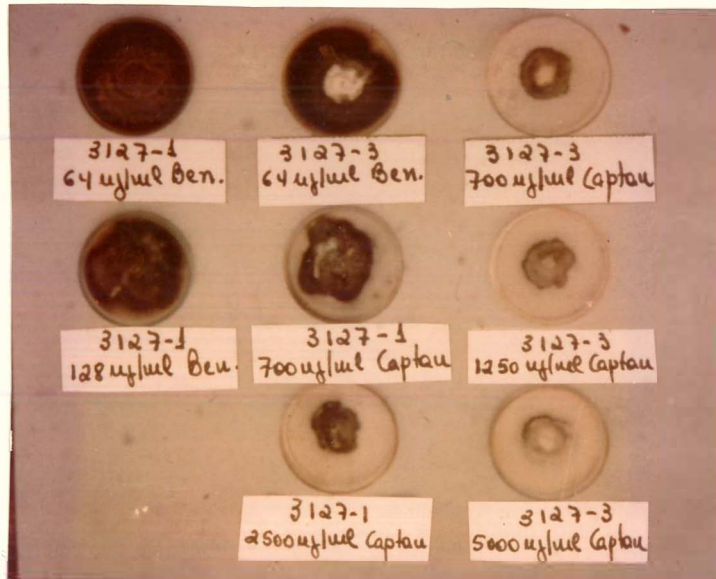


Foto 4- Coloração do isolado 3127-1 com a adição de Captan e do 3127-3, com a adição de Benomyl ao BDA.

escura esverdeada com um halo cinza-claro (foto 2); o 2208<sub>22</sub> ficou verde-escura acinzentada (foto 1); o 2208<sub>29</sub>, verde-clara acinzentada e os 3119-3, 3127-1 e 3127-3 mostraram-se com coloração cinza.

Mantendo-se constantes as condições de cultivo, como temperatura e ausência de luz, e adicionando-se diferentes concentrações de zineb, notamos que as colônias dos isolados 2208<sub>3</sub> e 2208<sub>29</sub> não se alteraram; o 2208<sub>5</sub> tornou-se cinza-clara nas concentrações mais baixas e salmon nas concentrações mais elevadas; e o 2208<sub>22</sub> mostrou-se amarelo-ouro nas concentrações mais altas. Os demais isolados não foram ensaiados na presença deste fungicida.

Com a adição de Captan tivemos alteração de coloração no isolado 2208<sub>3</sub>, que apresentou micélio branco de aspecto cotonoso; no 2208<sub>5</sub>, com colônia de coloração cinza-claro cotonoso (foto 2); no 3127-1, que se tornou cinza-escura (foto 4) e no 3127-3, que se mostrou cinza mais claro nas concentrações mais elevadas deste fungicida (foto 3), sendo que os demais isolados não sofreram alteração.

Quando se adicionava Benomyl, os isolados 2208<sub>3</sub>, 2208<sub>5</sub>, 2208<sub>22</sub> e 3119-3 não sofriam qualquer alteração na coloração; o 2208<sub>29</sub> tornava-se amarelado, enquanto o 3127-1 e o 3127-3 mostravam-se cinza-escuros (foto 4), o que pode ser melhor visualizado através da Tabela 1.

#### 4.2.2. Tamanho das colônias

O desenvolvimento das colônias em BDA, a 27±1°C, 7 dias após inoculação uniforme mostrou que, os que se desenvolveram mais rapidamente foram os isolados 3119-3, seguido pelos 2208<sub>5</sub>, 3127-1 e 3127-3. Os isolados 2208<sub>3</sub>, 2208<sub>22</sub> e 2208<sub>29</sub> tiveram um desenvolvimento mais lento (Tabela 2).

A análise estatística dos resultados mostrou, pelo teste F, que houve uma diferença estatisticamente significativa, ao nível de 5% de probabilidade, entre os isolados estu-

dadas, com respeito ao seu desenvolvimento em BDA. O coeficiente de variação do ensaio ficou em 13,46%.

Tabela 2- Crescimento das colônias dos isolados ensaiados quando em meio de BDA, medindo-se os diâmetros das colônias 7 dias após a inoculação.

Isolado	Diâmetro das colônias em cm (média de 3 repetições)
2208 <sub>3</sub>	7,03 ± 0,90 ab
2208 <sub>5</sub>	8,30 ± 0,50 b
2208 <sub>22</sub>	6,20 ± 0,46 a
2208 <sub>29</sub>	6,33 ± 0,90 a
3119-3	8,50 ± 0,50 b
3127-1	7,77 ± 0,40 ab
3127-3	7,93 ± 0,05 ab

As médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

#### 4.3. Sobrevivência aos fungicidas

##### 4.3.1. Zineb

De uma maneira geral o Zineb foi o que melhor inibiu o desenvolvimento do fungo, sendo que, dos isolados ensaiados, somente o 2208<sub>5</sub> apresentou-se com um nível elevado de resistência natural. O isolado melhor controlado pelo produto foi o 2208<sub>29</sub>, no qual concentrações de 160 ug/ml do princípio ativo já foram suficientes para impedir o seu desenvolvimento. O isolado 2208<sub>3</sub> apresentou uma queda bastante acentuada no desenvolvimento com somente 10 ug/ml porém, ele só foi totalmente inibido com 320 ug/ml. Finalmente, o 2208<sub>22</sub> foi totalmente inibido com 640 ug/ml (Tabelas 3 e 4 e Figuras 1,4,5,6 e 7). Os demais isolados não puderam ser ensaiados com este fungicida porque o nosso estoque já se esgotara e o mesmo não mais se encontrava disponível no mercado.

Observamos, ainda, que o 2208<sub>29</sub> sofreu um decréscimo mais brusco no seu desenvolvimento quando se aumentou a

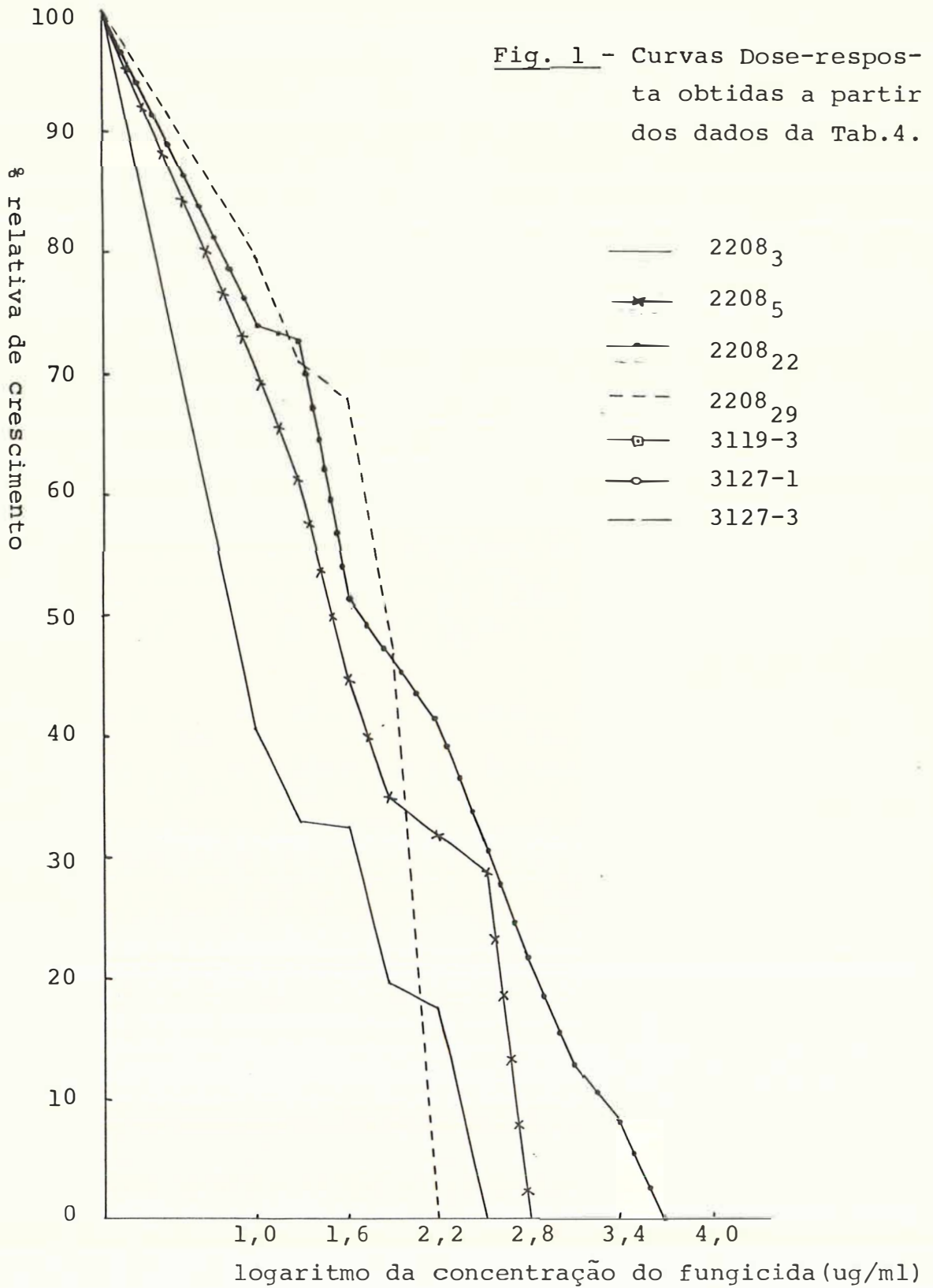
Tabela 3 - Diâmetro médio das colônias (em centímetros) submetidas a concentrações crescentes de Zineb. Tempo de incubação: 7 dias. Média de 3 a 5 experimentos.

Conc. de Zineb ug/ml	Diâmetro médio das colônias			
	2208 <sub>3</sub>	2208 <sub>5</sub>	2208 <sub>22</sub>	2208 <sub>29</sub>
0	6,35	8,24	6,28	6,65
10	2,58	6,10	4,43	5,30
20	2,07	6,00	3,85	4,70
40	2,05	4,23	2,80	4,50
80	1,25	3,90	2,20	3,10
160	1,10	3,40	2,00	0,00
320	0,00	2,60	1,80	0,00
640	0,00	1,77	0,00	0,00
1250	0,00	1,04	0,00	0,00
2500	0,00	0,60	0,00	0,00
5000	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 4 - Porcentagem de desenvolvimento das colônias de caldo isolado calculada a partir dos dados apresentados na Tabela 3.

Conc. de Zineb ug/ml	Porcentagem relativa de crescimento			
	2208 <sub>3</sub>	2208 <sub>5</sub>	2208 <sub>22</sub>	2208 <sub>29</sub>
0	100,0	100,0	100,0	100,0
10	40,6	74,0	70,5	79,7
20	32,6	72,8	61,3	70,7
40	32,3	51,3	44,6	67,7
80	19,7	47,3	35,0	46,6
160	17,3	41,3	31,8	0,0
320	0,0	31,5	28,7	0,0
640	0,0	21,5	0,0	0,0
1250	0,0	12,6	0,0	0,0
2500	0,0	8,0	0,0	0,0
5000	0,0	0,0	0,0	0,0





dosagem de 80 para 160 ug/ml, e o 2208<sub>22</sub>, de 320 para 640 ug/ml.

#### 4.3.2. Captan

O Captan apresentou um controle deficiente da maioria dos isolados ensaiados. Assim, tivemos quatro dos isolados em estudo crescidos razoavelmente em dosagens tão elevadas quanto 5.000 ug/ml (Figura 2). É interessante notar que, de uma maneira geral, os isolados que inicialmente sofreram maior redução no crescimento de suas colônias foram os que conseguiram melhor crescimento em dosagens mais altas ( 2.500 a 5.000 ug/ml); já os isolados 2208<sub>3</sub> e 2208<sub>29</sub> que, até à dosagem de 80 ug/ml, praticamente não tinham sofrido queda no desenvolvimento das colônias, não apresentaram qualquer crescimento em dosagens de 1.250 ug/ml. O isolado 3119-3, com 5.000 ug/ml, ainda apresentou um crescimento de 22,6% do valor da testemunha; 3127-3, um valor de 17,8% ; o 3127-1, 12,9% e o 2208<sub>5</sub> , com 11,5%.

Alguns isolados apresentaram uma queda de desenvolvimento bastante acentuada quando se variava a dosagem. Assim, o isolado 2208<sub>3</sub> passou de 61,6% de porcentagem relativa de crescimento para 18,9% quando se aumentava a dosagem de 160 para 320 ug/ml; de maneira menos acentuada, o isolado 3127-3 quando se adicionava 10 ug/ml de Captan ao meio, passava de 100 para 72,7%; 3127-1, passava de 71,9 para 36,4% quando se aumentava a dosagem de 320 para 640 ug/ml; 2208<sub>22</sub>, que passava de 75,6 para 40,4% quando de 40 dobrava-se para 80 ug/ml , sendo que este mesmo isolado já havia sofrido uma queda razoável em 10 ug/ml. Os demais isolados sofreram decréscimo gradativo conforme se aumentava a dosagem do fungicida (Tabelas 5 e 6 e Figura 2).

Tanto o isolado 2208<sub>3</sub> quanto o 3119-3 mostraram pouca alteração no crescimento, o primeiro em dosagens variando de 10 a 80 ug/ml e o segundo, no intervalo entre 10 e 160 ug/ml (Tabela 6, Figuras 2, 4 e 8).

Tabela 5 - Diâmetro médio das colônias (em centímetros) submetidas a concentrações crescentes de Captan. Tempo de incubação: 7 dias (Média de 3 a 5 experimentos).

Conc. de Captan ug/ml	Diâmetro médio das colônias (cm)							
	2208 <sub>3</sub>	2208 <sub>5</sub>	2208 <sub>22</sub>	2208 <sub>29</sub>	3119-3	3127-1	3127-3	
0	6,35	8,24	6,28	6,65	7,52	7,33	7,84	
10	6,05	7,33	4,92	6,32	6,25	6,48	5,70	
20	5,99	6,42	4,86	6,00	6,11	6,29	5,38	
40	5,90	4,60	4,75	5,35	5,95	5,90	4,75	
80	5,23	4,25	3,25	5,21	5,94	5,81	4,67	
160	3,88	3,55	2,27	4,94	5,93	5,63	4,50	
320	1,20	2,17	1,89	4,26	4,43	5,27	3,90	
640	0,70	1,60	1,75	3,30	3,07	2,67	2,20	
1250	0,00	1,17	0,00	0,00	1,96	2,27	1,50	
2500	0,00	1,10	0,00	0,00	1,90	1,47	1,40	
5000	0,00	0,95	0,00	0,00	1,70	0,95	1,40	

Tabela 6 - Porcentagem de desenvolvimento das colônias de cada isolado em meio de BDA mais Captan, calculada a partir dos dados apresentados na Tabela 5.

Conc. de Captan ug/ml	Porcentagem relativa de crescimento							
	2208 <sub>3</sub>	2208 <sub>5</sub>	2208 <sub>22</sub>	2208 <sub>29</sub>	3119-3	3127-1	3127-3	
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
10	95,2	88,9	78,3	95,0	83,1	88,4	72,7	
20	94,4	77,9	77,4	90,2	81,2	85,8	68,7	
40	92,9	55,8	75,6	80,4	79,1	80,5	60,6	
80	82,3	51,5	40,4	78,3	79,0	79,3	59,5	
160	61,6	43,0	36,6	74,2	78,8	76,8	57,4	
320	18,9	26,3	30,2	66,0	58,9	71,9	49,7	
640	11,0	19,8	28,7	49,6	40,8	36,4	28,1	
1250	0,0	14,2	0,0	0,0	26,1	31,0	19,1	
2500	0,0	13,3	0,0	0,0	25,3	20,1	17,8	
5000	0,0	11,5	0,0	0,0	22,6	12,9	17,8	

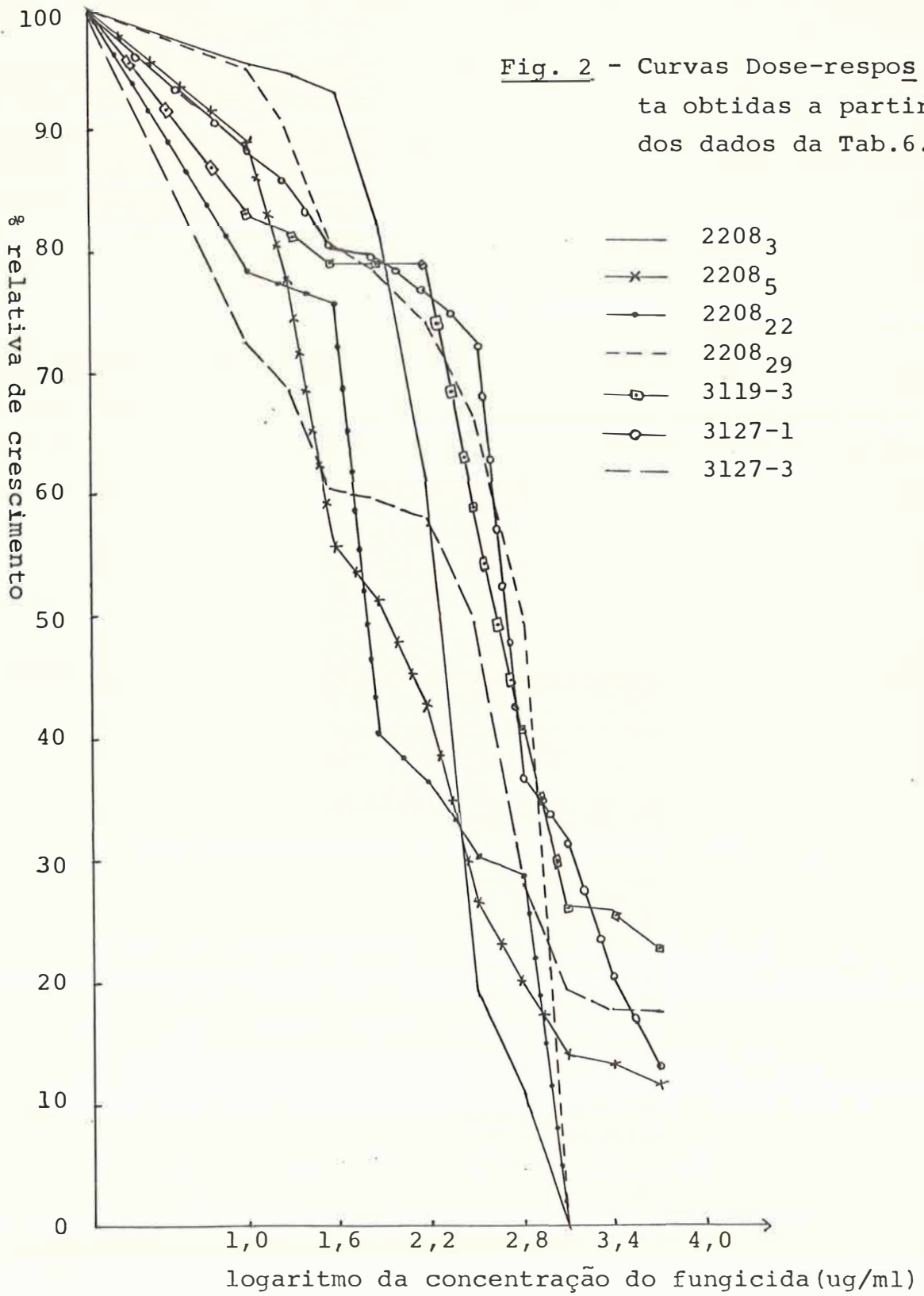
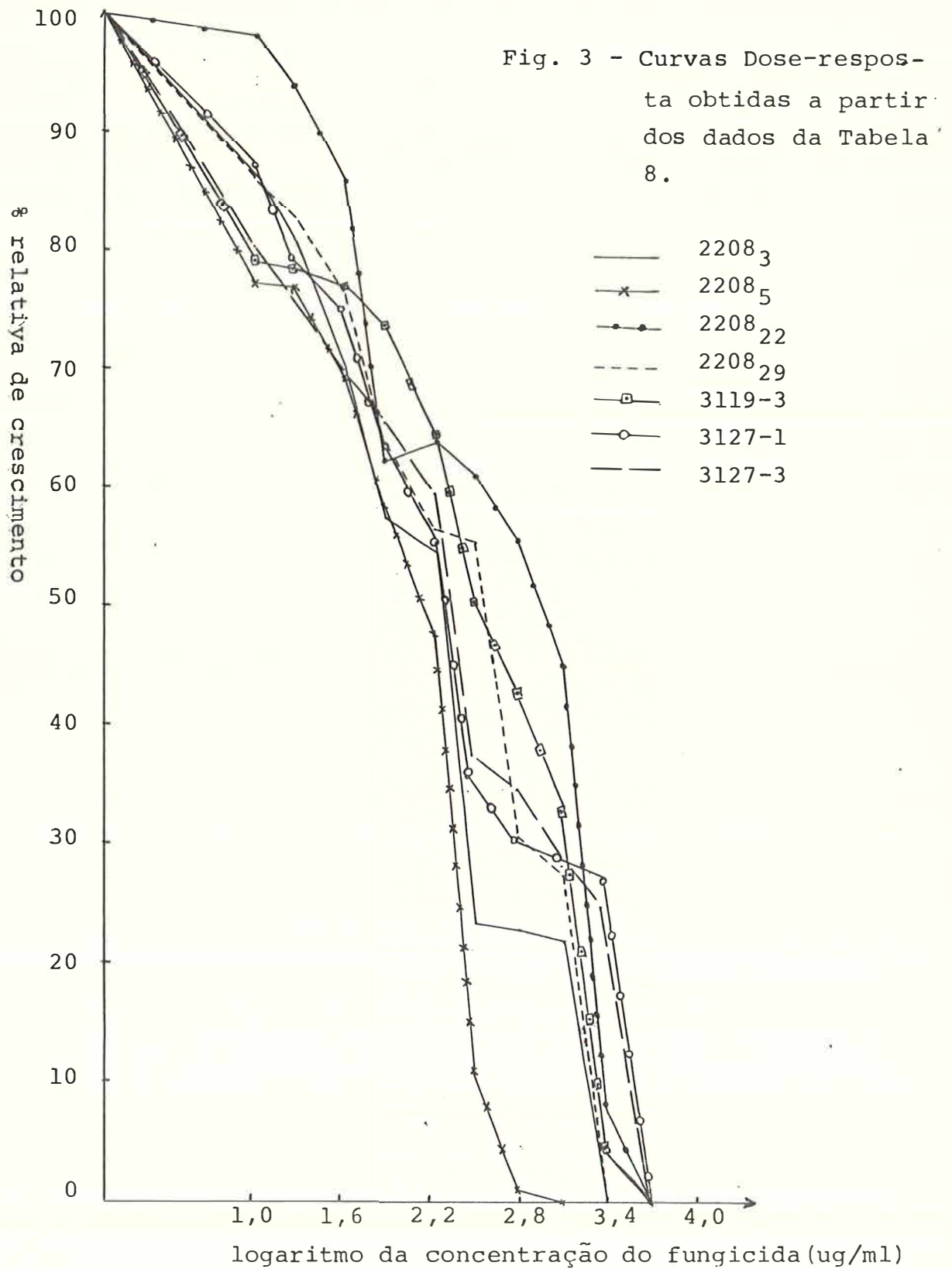


Tabela 7 - Diâmetro médio das colônias (em centímetros) submetidas a concentrações crescentes de Benomyl. Tempo de incubação: 7 dias. Média de 3 a 5 experimentos.

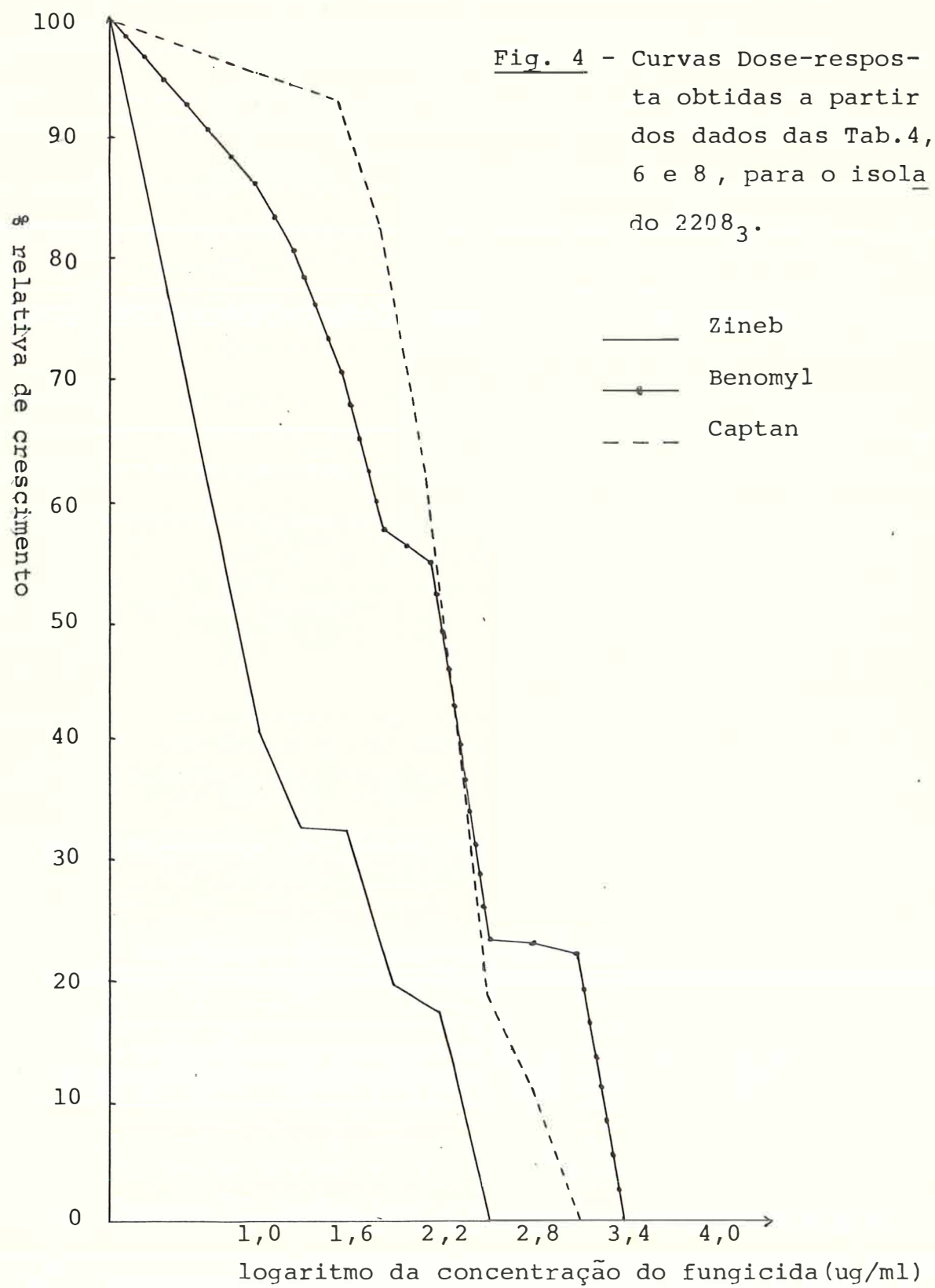
Conc. de Benomyl ug/ml	Diâmetro médio das colônias (cm)							
	2208 <sub>3</sub>	2208 <sub>5</sub>	2208 <sub>22</sub>	2208 <sub>29</sub>	3119-3	3127-1	3127-3	
0	6,35	8,24	6,28	6,65	7,52	7,33	7,84	
10	5,47	6,37	6,17	5,73	5,96	6,38	6,30	
20	5,12	6,35	5,91	5,53	5,88	5,81	6,01	
40	4,45	5,70	5,40	5,11	5,77	5,50	5,48	
80	3,65	4,80	3,95	4,27	5,56	4,63	5,15	
160	3,47	3,95	4,00	3,80	4,85	4,05	4,65	
320	1,50	0,93	3,83	3,70	3,80	2,65	2,93	
640	1,46	0,10	3,49	2,05	3,22	2,23	2,72	
1250	1,40	0,00	2,83	1,83	2,46	2,06	2,27	
2500	0,00	0,00	0,50	0,00	0,35	2,00	1,95	
5000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

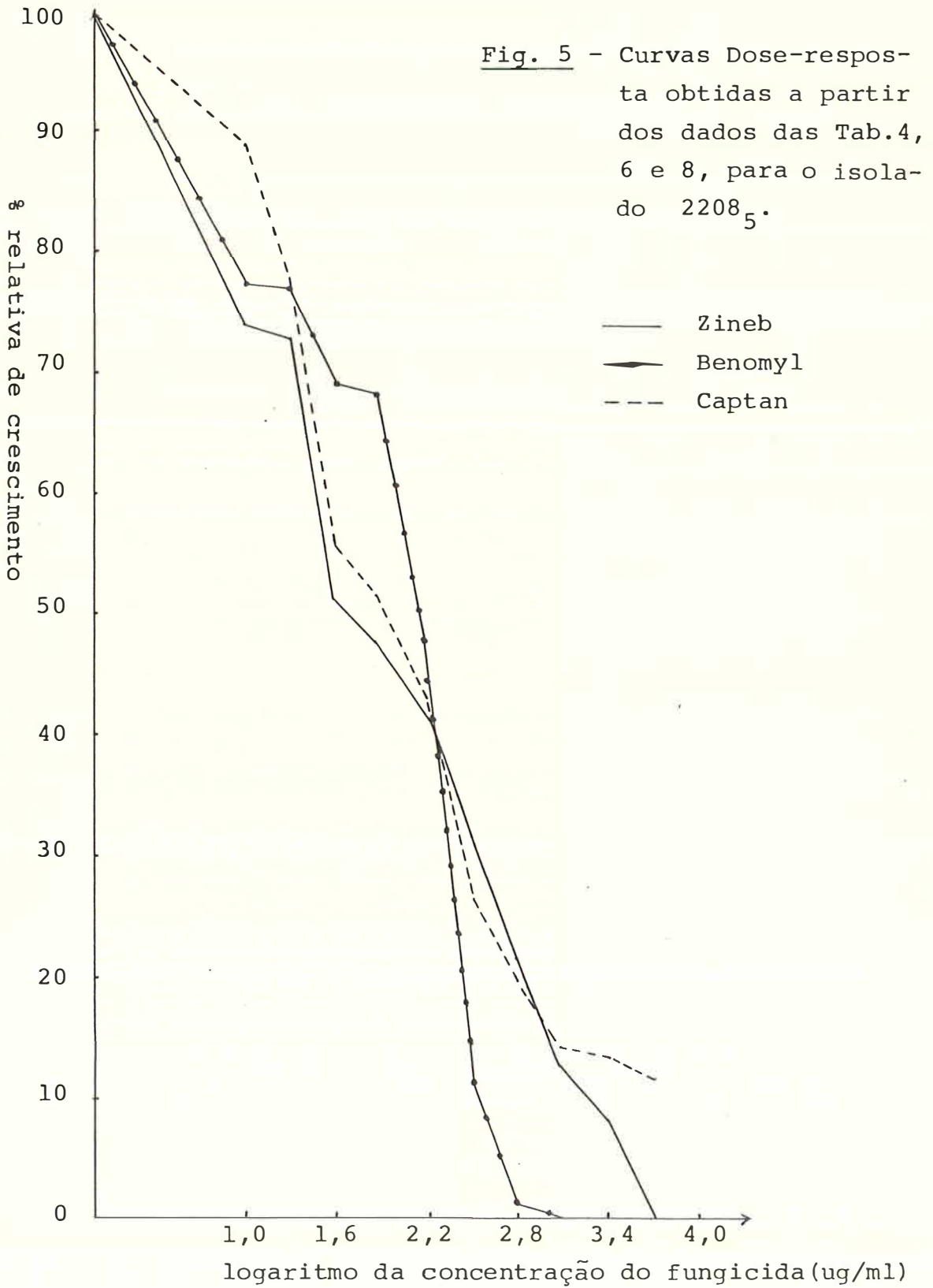
Tabela 8 - Porcentagem de desenvolvimento das colônias de cada isolado, calculada a partir dos dados apresentados na Tabela 7, em meio de BDA mais Benomyl.

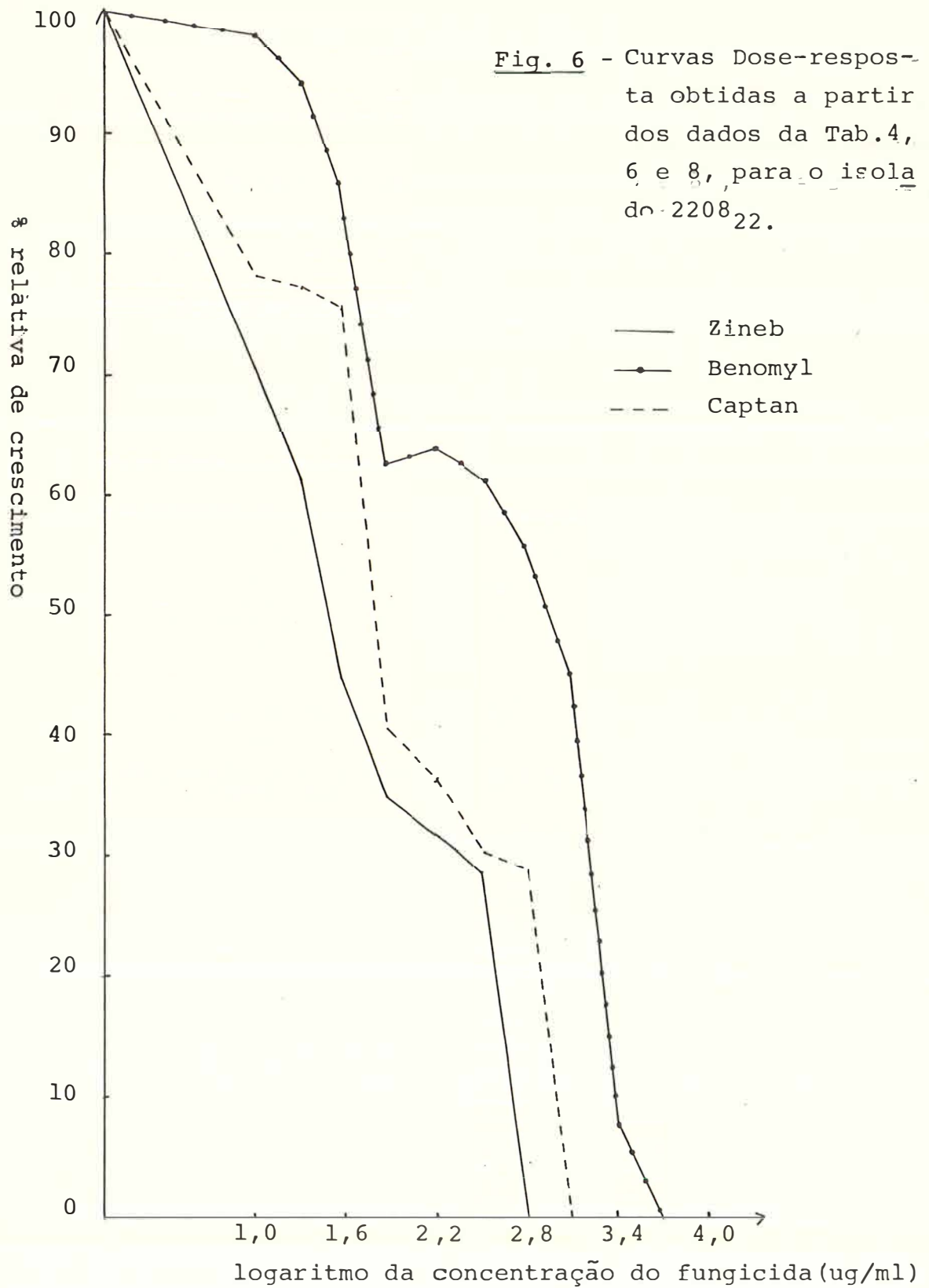
Conc. de Benomyl ug/ml	Porcentagem relativa de crescimento							
	22083	22085	220822	220829	3119-3	3127-1	3127-3	
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
10	86,1	77,3	98,2	86,2	79,2	87,0	80,3	
20	80,7	77,0	94,1	83,1	78,4	79,2	76,6	
40	70,1	69,2	86,0	76,8	76,9	75,0	69,9	
80	57,5	58,2	62,3	64,2	73,9	63,2	65,7	
160	54,6	47,9	63,9	56,5	64,5	55,2	59,3	
320	23,6	11,3	61,0	55,6	50,5	36,1	37,4	
640	23,1	1,2	55,6	30,8	42,8	30,4	34,7	
1250	22,0	0,0	45,1	27,6	32,7	28,1	28,9	
2500	0,0	0,0	7,9	0,0	4,6	27,3	24,9	
5000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

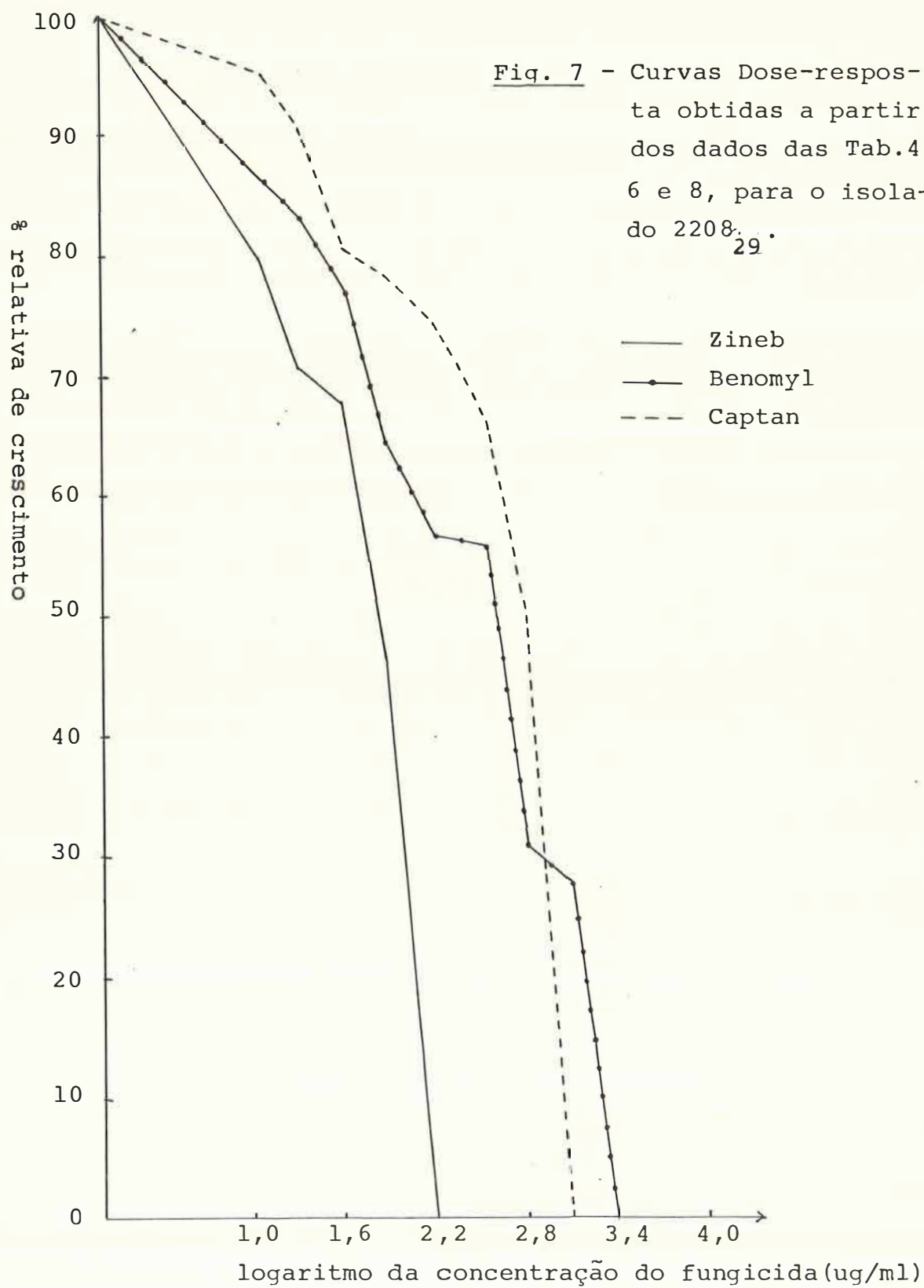


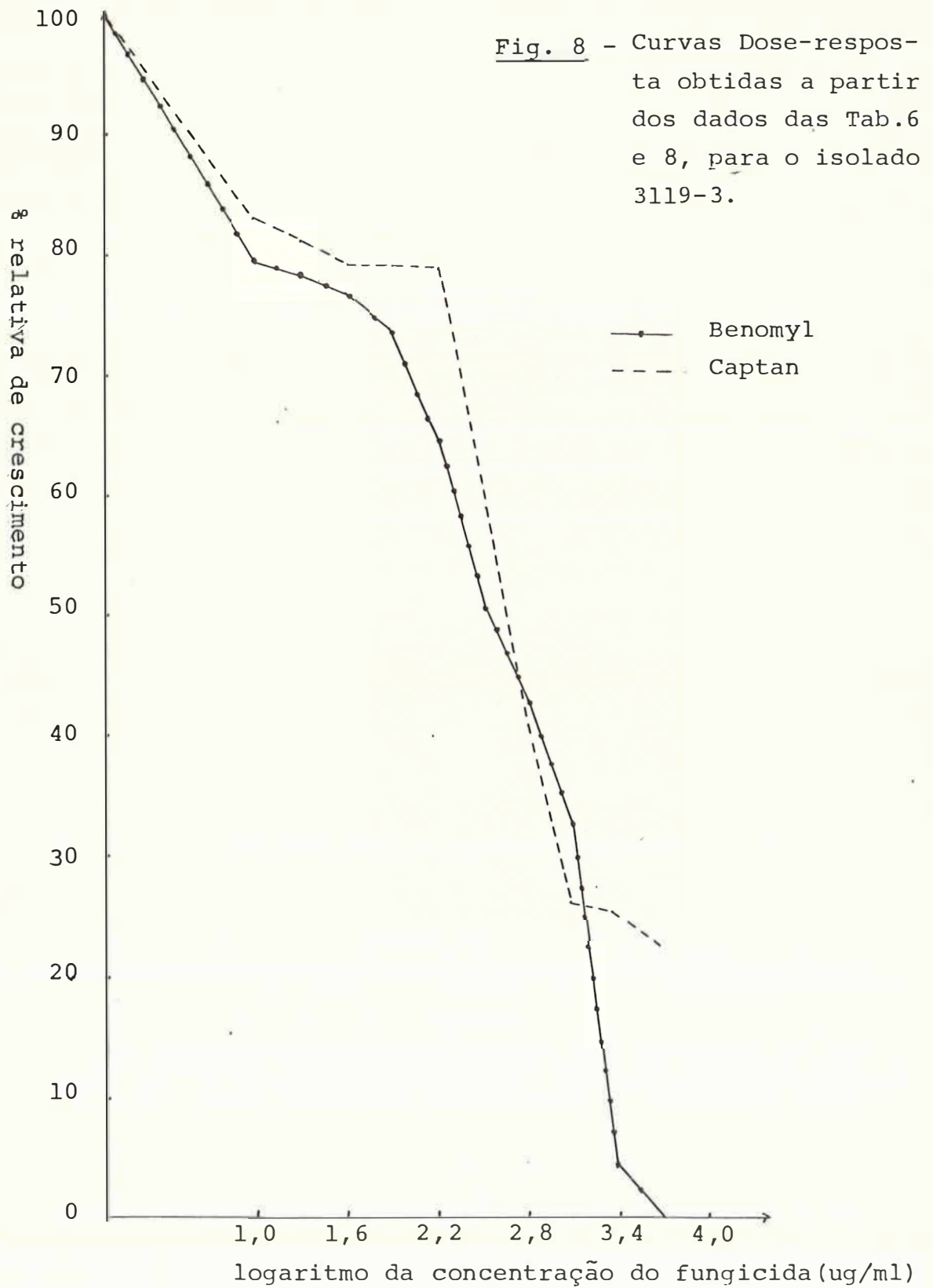


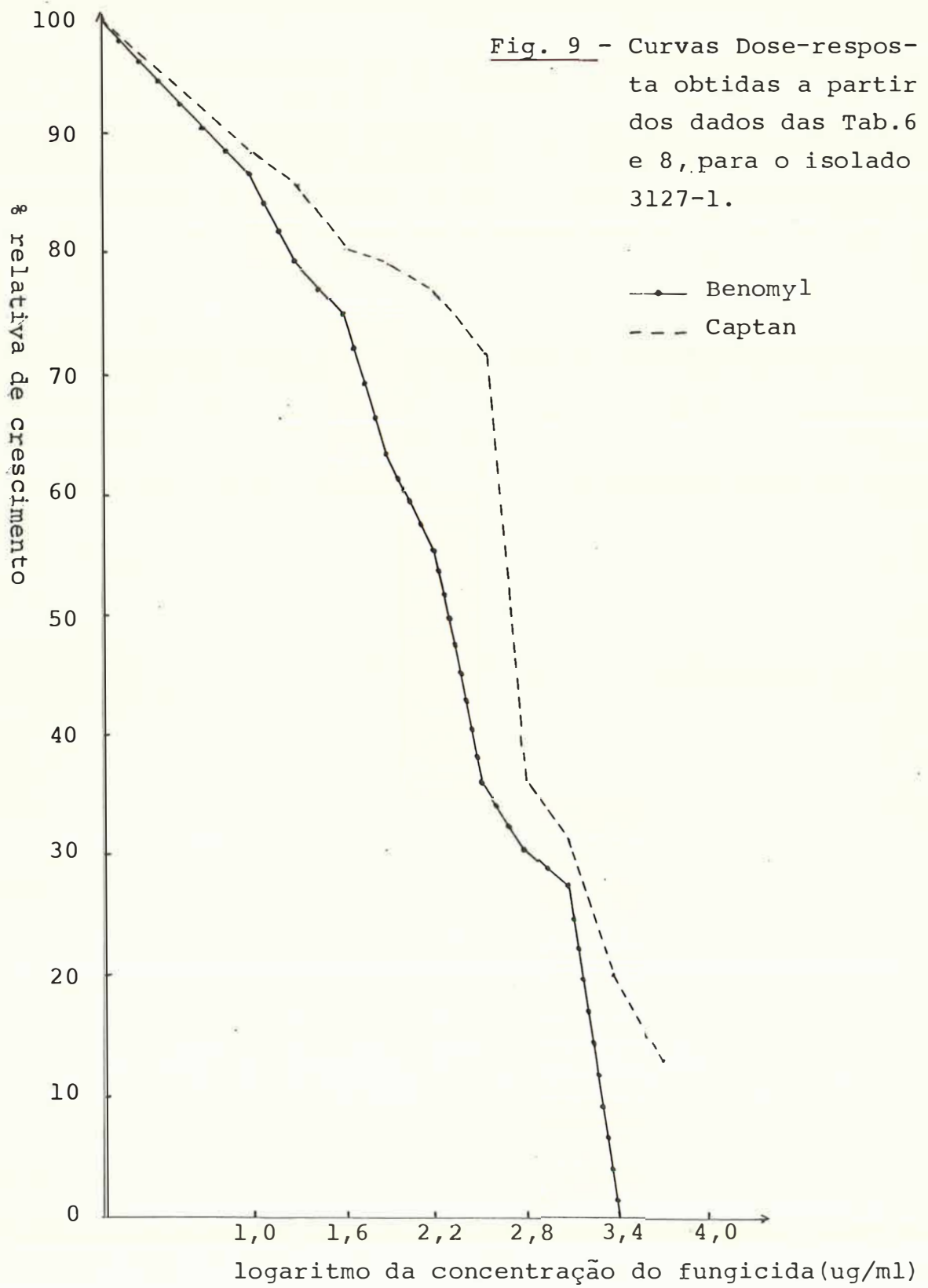


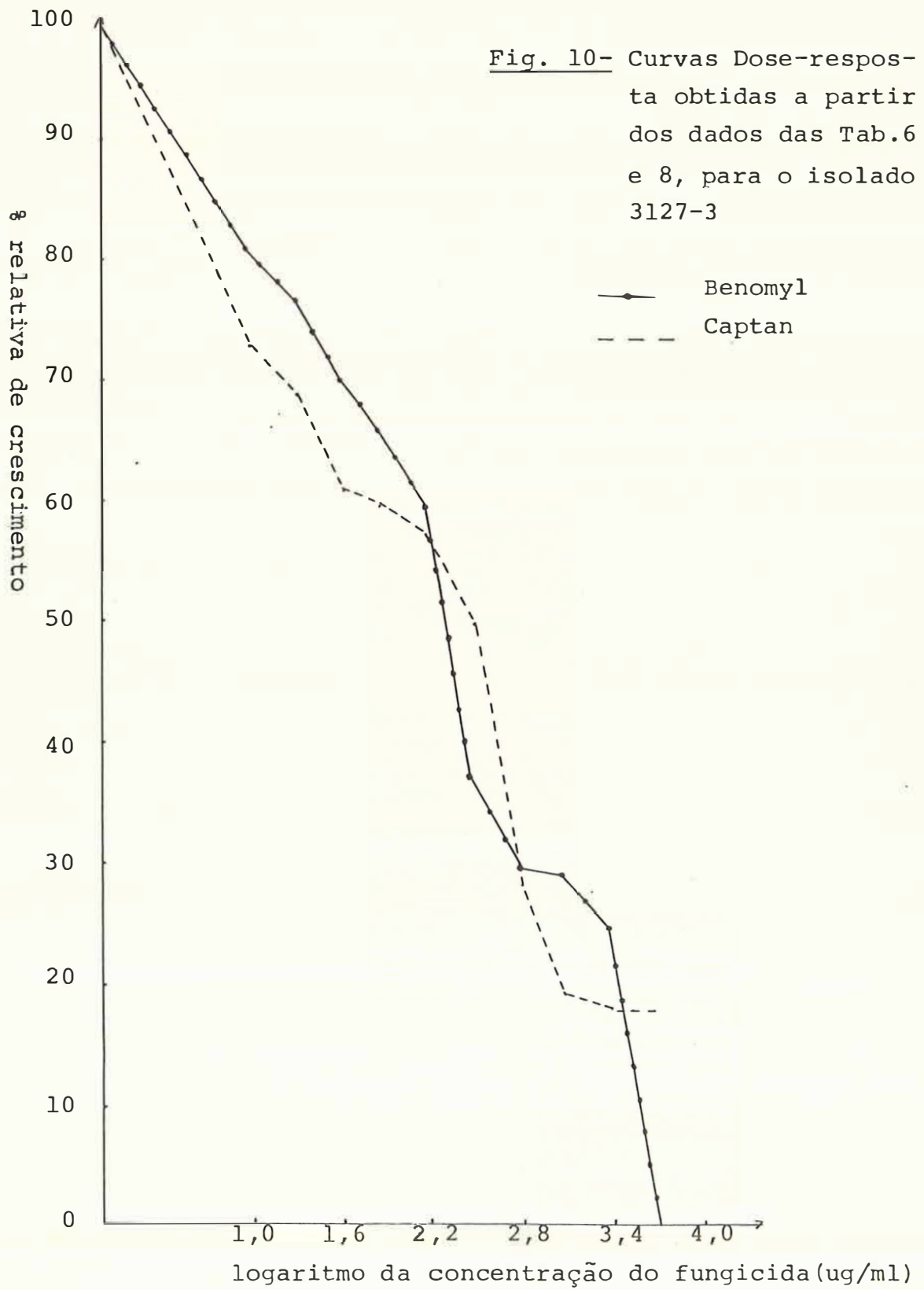












#### 4.3.3. Benomyl

Nenhum dos isolados ensaiados conseguiu desenvolver-se na concentração de 5.000 ug/ml deste fungicida, ao contrário do que aconteceu com o Captan. O Benomyl mostrou-se realmente efetivo somente para o isolado 2208<sub>5</sub>, em que a dosagem de 640 ug/ml reduziu a porcentagem de crescimento para 1,2%, sendo que, com 160 ug/ml, o desenvolvimento da colônia sofreu uma queda brusca, passando de 47,9 para 11,3% quando a dose aumentava de 160 para 320 ug/ml, já tendo apresentado um decréscimo acentuado quando se adicionou 10 ug/ml do princípio ativo do fungicida ao meio de cultura.

Para o isolado 2208<sub>22</sub>, esse decréscimo acentuado ocorreu quando se aumentava a dose de 1.250 para 2.500ug/ml, o mesmo acontecendo para os isolados 3119-3 e 2208<sub>3</sub>. Para os isolados 3127-1 e 3127-3, a maior queda aconteceu na adição de 5.000 ug/ml, em que não mais ocorreu crescimento das colônias. Os isolados 2208<sub>3</sub>, 2208<sub>5</sub> e 3127-3 tiveram essa queda de 160 para 320 ug/ml.

Foi notado, ainda, que alguns isolados mantiveram o seu desenvolvimento praticamente estável quando se dobravam algumas concentrações. Observou-se este fato no isolado 2208<sub>3</sub>, nas dosagens de 320 até 1.250 ug/ml; no 2208<sub>22</sub>, entre 80 e 320 ug/ml; no 2208<sub>29</sub>, entre 160 e 320 ug/ml e no 3119-3, entre 10 e 80 ug/ml, apesar da queda relativamente acentuada quando se passou do meio sem fungicida para um contendo 10 ug/ml (Tabelas 7 e 8, Figuras 3,4,6,7 e 8).

#### 4.4. Promoção de esporulação e desenvolvimento das colônias

##### 4.4.1. Recuperação da capacidade de esporular

Como se pode observar através da Tabela 9, a influência da adição ou não de extrato de folhas de girassol foi variável entre os isolados testados, resultando em que, para o 2208<sub>3</sub>, essa adição teve influência positiva no desenvolvimento da colônia; para o 2208<sub>22</sub> foi indiferente e, para o 2208<sub>29</sub>,



foi negativa, isto é, prejudicou o crescimento.

Porém, no tocante à conidiação, essa adição foi favorável, pois as colônias, as quais não mais estavam esporulando, voltaram a fazê-lo normalmente. O grau de esporulação não foi determinado por não ter sido este o objetivo do ensaio e, sim, recuperar a esporulação de nossos isolados.

Tabela 9- Medida dos diâmetros das colônias de três isolados de *Alternaria alternata*, 7 dias após a inoculação em meio de BDA, com ou sem a adição de extrato de folhas de girassol. A temperatura de incubação foi mantida constante, igual a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Isolado	Diâmetro das colônias (média de 3 repetições) (cm)	
	testemunha	com adição de extrato
2208 <sub>3</sub>	$5,87 \pm 0,84$	$6,40 \pm 0,50$
2208 <sub>22</sub>	$5,62 \pm 0,07$	$5,80 \pm 0,20$
2208 <sub>29</sub>	$6,37 \pm 0,14$	$5,98 \pm 0,41$

C.V. = 7,59%

A análise estatística dos dados, através do teste F, não mostrou significância, ao nível de 5% de probabilidade, quanto à adição de extrato de folhas de girassol, dentro de cada isolado, assim como o fatorial 2x3 também não acusou significância nos componentes linear e quadrático de isolados e nem de tratamentos (com e sem a adição de extrato de folhas de girassol ao meio de BDA).

#### 4.4.2. Alteração das condições de cultivo

No teste de qual seria o melhor regime de luz, com ou sem a adoção de injúria ao micélio, visando incentivar a esporulação, foi verificado que, quando as colônias eram mantidas sempre no escuro, com ou sem injúria ao micélio, obtinha-se uma esporulação abundante, ao redor de  $10^6$  esporos/ml (Tabela 10).

Tabela 10- Grau de esporulação dos isolados quando submetidos a diferentes regimes de luz e injúria ao micélio 7 dias após inoculação em meio de BDA.

Isolado	Tratamentos (média de 3 repetições)					
	A	B	C	D	E	F
2208 <sub>3</sub>	5	5	4	5	2	1
2208 <sub>5</sub>	5	5	5	4	5	5
2208 <sub>29</sub>	5	5	2	3	2	3

Tratamentos: A- isolados mantidos sempre no escuro, após inoculação em BDA. Sem injúria ao micélio. B- isolados mantidos sempre no escuro, sendo feita injúria ao micélio no 7º dia após a inoculação em BDA. C- mantidos sempre no claro, em estufa com iluminação fluorescente. Sem injúria ao micélio. D- sempre no claro. Injúria ao micélio no 7º dia após a inoculação. E- colônias mantidas no escuro até o 6º dia após a inoculação após o que, permaneceram por 4 dias em estufa iluminada. Sem injúria ao micélio. F- [dem tratamento E, somente diferenciando a realização de injúria no 7º dia após inoculação.

Quesitos: 1- micélio iniciando ou mesmo sem diferenciação. 2- micélio diferenciado. 3- pequena esporulação ( $< 10^4$  esporos/ml). 4- esporulação média (entre  $10^4$  e  $10^6$  esporos/ml). 5- abundante esporulação ( $> 10^6$  esporos/ml).

Para o isolado 2208<sub>29</sub>, o tratamento B foi ligeiramente melhor que o tratamento A; para o isolado 2208<sub>5</sub>, o tratamento F mostrou-se satisfatório, apesar da esporulação ter sido ligeiramente inferior aos dois primeiros tratamentos, A e B. O tratamento D foi o que deu resultados menos satisfatórios para o isolado 2208<sub>5</sub>. O tratamento E praticamente não foi efetivo tanto para o isolado 2208<sub>3</sub> quanto para o 2208<sub>29</sub> e o F, para o isolado 2208<sub>3</sub>. O isolado menos sensível aos tratamentos foi o 2208<sub>5</sub>, como pode ser verificado pelos dados da Tabela 10.

Tabela 11- Crescimento das colônias submetidas a diferentes regimes de luz e injúria ao micélio, 7 dias após inoculação em meio de BDA (medida dos diâmetros das colônias em cm).

Isolados	Tratamentos (média de três repetições)					
	A	B	C	D	E	F
2208 <sub>3</sub>	9,0	9,0	3,1	2,9	6,9	7,2
2208 <sub>5</sub>	9,0	9,0	6,0	4,2	7,3	8,1
2208 <sub>29</sub>	8,7	9,0	4,8	4,0	7,6	8,4

Tratamentos: A- isolados mantidos sempre no escuro, após inoculação em BDA. Sem injúria ao micélio. B- isolados mantidos sempre no escuro, sendo feita injúria ao micélio no 7º dia após a inoculação em BDA. C- mantidos sempre no claro, em estufa com iluminação fluorescente. Sem injúria ao micélio. D- sempre no claro. Injúria ao micélio no 7º dia após a inoculação. E- colônias mantidas no escuro até o 6º dia depois da inoculação após o que, permaneceram por 4 dias em estufa iluminada. Sem injúria ao micélio. F- idem tratamento E, somente diferenciando a realização de injúria no 7º dia após a inoculação.

Da mesma forma que para a esporulação, os tratamentos A e B foram os melhores também para o crescimento das colônias (Tabela 11). O isolado 2208<sub>29</sub> também se desenvolveu satisfatoriamente no tratamento F, sendo que o melhor resultado foi o do tratamento B.

Os tratamentos C e D foram os que mostraram piores desenvolvimentos sendo que, de uma maneira geral, o tratamento E mostrou um desenvolvimento intermediário, como apresentado na Tabela 11.

#### 4.4.3. Alteração do meio de cultura

O uso de meio de BDA sobre papel de filtro embebido em V-8 deu bons resultados para o isolado ensaiado, porém, como não foi notada nenhuma vantagem sobre o meio que vinha sendo utilizado (BDA), tornou-se indiferente o uso de qualquer um dos dois, por isso, continuou-se com o BDA pois, aparentemente, as colônias apresentavam o mesmo crescimento e a mesma esporulação e esse meio era muito mais simples e de fácil manuseio.

Já o meio de batata-água não se apresentou bom para o crescimento e esporulação de *A. alternata*, resultando em um crescimento incipiente das colônias e uma total ausência de esporulação, mesmo quando este meio era colocado sobre papel de filtro embebido em V-8.

## 5. DISCUSSÃO

Apesar de, no Brasil, sô ter sido descrito, até o momento, a ocorrência de uma única espécie de *Alternaria*, a *A. helianthi* (AQUINO et alii, 1971 e RIBEIRO et alii, 1974) os isolados, de origem brasileira, mostraram, também, a ocorrência de *A. alternata*. Possivelmente, a *A. alternata* foi trazida através de sementes, visto que o material de onde se isolou o fungo havia sido introduzido no Instituto Agrônomo de Campinas há apenas alguns anos. A terceira espécie, *A. zinniae*, que é citada como atacando o girassol em outros países (MCDONALD e MARTENS, 1963; NATRASS, 1950 e MUNTANOLA, 1948) não foi detectada nos isolamentos realizados.

No entanto, a diferenciação das espécies de *Alternaria* realizada no presente trabalho baseou-se, somente, no ataque ao girassol e na aparência dos conídios e das colônias, tendo em vista que os isolados apresentaram uma alta variabilidade tanto no tocante às suas colorações quando em meio de cultura com ou sem a adição de fungicidas, como no tamanho das colônias desenvolvidas a temperatura constante, em meio de BDA. Assim, ocorreram isolados que sofreram modificação de coloração tanto em Zineb quanto em Captan, como foi o caso do 2208<sub>5</sub>, e um isolado, o 3119-3, que não se alterou, no tocante à coloração, quando desenvolvido em meio de cultura com qualquer dos dois fungicidas com ele ensaiados.

No que se refere ao tamanho das colônias,

cada uma delas apresentou uma média diferente, como mostrado na Tabela 2, sendo que algumas, segundo o teste de Duncan, não diferiram significativamente entre si.

Quanto à sobrevivência aos fungicidas ensaiados, cada linhagem mostrou uma reação diferente. Aliás, isso já havia sido notado entre as espécies de *Alternaria*, sendo que GALLI et alii (1968) propõe a heterocariose como responsável pela grande variabilidade do gênero.

Como era esperado, tanto no tocante ao tipo de fungicida, pouco específico, quanto aos dados experimentais, obtidos por outros pesquisadores citados na revisão, que dão o Zineb como o mais efetivo no controle das mais diferentes espécies de *Alternaria*, o mesmo parece ter ocorrido nos testes, sendo este fungicida o que, dentre os ensaiados, melhor controlou os isolados de *A. alternata* estudados (Tabelas 4, 6 e 8 e Figuras 1 a 10).

Aliás, isso já tinha sido verificado em diversas espécies de *Alternaria*, como *A. solani* (GERHOLD, 1957; LODHA, 1977; *Alternaria* atacando trigo (DICKINSON e WALLACE, 1976; EKBOTE e MORE, 1977; AGRAWAL et alii, 1978); *A. zinniae* (PROTA, 1960); *A. dianthi* (STRIDER, 1978) e *A. cucumerina* (CHOPRA e JHOOTY, 1975).

O Captan, por outro lado, foi muito menos usado em *Alternaria*, tendo sido considerado eficiente no controle de *A. solani* (KO et alii, 1976) e *A. dianthi* (STRIDER, 1978). No presente estudo, três das linhagens foram controladas praticamente na mesma dosagem usada por STRIDER (1978); por outro lado, os outros quatro isolados mostraram-se tolerantes a este fungicida (Tabelas 5 e 6 e Figuras 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10). Como ele é, provavelmente, pouco ou nada utilizado no controle de *Alternaria*, os dados obtidos devem refletir somente a resistência natural da espécie.

Já para o caso do Benomyl, a literatura mostrou-se conflitante. Assim, LEYENDECKER (1954) obteve resultados sa

tisfatórios no controle de diferentes espécies de *Alternaria* com somente 880 ug/ml do princípio ativo, enquanto ENGLEHARD (1972) e STRIDER (1978), em *A. dianthi*, DICKINSON e WALLACE (1976) e BARNETT e LUKE (1976) em *A. sp* e *A. alternata* não conseguiram controle satisfatório. Alguns destes casos de controle deficiente podem ser explicados pela baixa concentração utilizada, como é o caso de STRIDER (1978), que utilizou somente 300 ug/ml; porém, os demais casos poderiam ser explicados através da resistência natural ou, mesmo, induzida.

Da comparação destes dados fornecidos pela bibliografia consultada e os do presente trabalho, pode-se observar uma discrepância, visto que a resistência ou tolerância parece diminuir, segundo uma norma geral, do mais específico para o menos específico dos fungicidas, não se tendo comportado assim o presente material, tendo em vista que, de uma maneira geral, o Benomyl, de maior especificidade, controlou melhor que o Captan, tido como menos específico (Tabelas 6 e 8 e Figuras 2 e 3). Como, para o girassol, não há citações na literatura quanto ao uso de fungicidas para o controle da alternariose (LUCIANO e DAVREAUX, 1971; VRANCEANU, 1974 e CARTER, 1978), a resistência mostrada por nossos isolados deve ser, tanto no caso do Captan quanto do Benomyl, de origem natural.

Um fato interessante observado foi que alguns isolados apresentaram quase que "platôs" em alguns intervalos de variação nas dosagens dos fungicidas. No entanto, isto só foi notado para o Captan e o Benomyl, não tendo ocorrido para o Zineb, talvez devido à maior eficiência deste no controle do crescimento dos isolados (Figuras 1 a 10), o que está de acordo com os dados encontrados na literatura.

De uma maneira geral, os isolados crescem melhor quando mantidas sempre no escuro, independente da realização ou não de injúria ao micélio, contradizendo dados de alguns autores que citam a injúria como favorecendo a esporula-

ção (RANDS, 1917; FAHIM, 1966); porém, concorda com os dados de CHARLTON (1953), que encontrou que a realização ou não de injúria não influenciava a quantidade de esporos formados.

O que parece ter tido maior influência no crescimento e esporulação das colônias ensaiadas foi a luz. No presente estudo, a ausência de luz foi importante (Tabelas 10 e 11), o que vai indo de acordo com o verificado por CHARLTON (1953); LUKENS (1960); LLOYD (1968); VAN DEN HENVAL (1970) e MISAGHI et alii (1978). Já outros autores citam que a necessidade de ausência ou presença de luz é função da temperatura como é o caso de ARAGAKI (1961); PRASAD et alii (1973) e GAMBOGI et alii (1976), o que, no presente trabalho, não foi ensaiado porque a temperatura foi mantida constante.

Outros autores citam a necessidade de alternância de luz e escuro, como GUPTA e PUSHKARNATH (1962); ARAGAKI (1964); FAHIM (1966); JIMENEZ e MILLER (1966); LUKENS e HORSFALL (1969) e GAMBOGI et alii (1976), o que deu resultados satisfatórios, tanto para a esporulação quanto para o crescimento, somente para o isolado 2208<sub>5</sub>, acontecendo o mesmo para o 2208<sub>29</sub> no tocante ao crescimento da colônia; porém, para o isolado 2208<sub>3</sub>, a alternância de luz não foi satisfatória nem para o crescimento nem para a esporulação. No geral, a alternância de luz e escuro não foi necessária para qualquer dos isolados ensaiados (Tabelas 10 e 11).

O problema apresentado por alguns dos isolados de não mais esporular, daí a tentativa de adição de extrato de folhas de girassol, parece relacionar-se a que, no ambiente artificial, os requisitos básicos para a realização do ciclo completo do fungo nem sempre estão presentes. Neste caso, como a esporulação está ligada a condições de nutrição e ambiente adequado, a falta de qualquer destes requisitos poderia levar o fungo a não mais esporular. A volta da esporulação com a adição do extrato talvez tenha sido devida a algum fator nele contido que estava fazendo falta no ambiente arti-



ficial. A análise estatística do desenvolvimento dos três isolados em meio de BDA, com ou sem a adição de extrato de folhas de girassol, só mostrou haver variação na interação entre tratamentos e isolados, salientando, com esta análise, que a adição só foi realmente importante para a promoção da esporulação.

Verificou-se, ainda, para *A. alternata*, o que já havia sido observado em *Cercospora arachidicola* (MORAES, 1977), que havia variação entre os isolados em um mesmo meio de cultura; neste caso, para a rapidez de crescimento do fungo, foi observado que o isolado 2208<sub>3</sub> crescia mais depressa em meio com adição do extrato; o 2208<sub>29</sub>, em meio sem a adição de extrato e o 2208<sub>22</sub>, a adição não tinha nenhuma influência no crescimento da colônia.

## LITERATURA CITADA

- ABDOU, Y.A., 1966. The source and nature of resistance in *Arachis* L species to *Mycosphaerella arachidicola* Jenk and *Mycosphaerella berkeleyi* Jenk , and factors influencing sporulation of these fungi. North Carolina University, Raleigh, U.S.A., 118 p. (PhD Thesis).
- AGRAWAL, H.S.; N.K. GUPTA; V.K. PRASAD e S.L. VISHWAKARMA, 1978. Studies on the control of *Alternaria* and brown rust in wheat. Indian Journal of Agricultural Research, 10:233-237.
- AQUINO, M.L.N.; J.L. BEZERRA e M.A. LIRA, 1971. Ocorrência do crestamento do girassol (*Helianthus annuus*, L) em Pernambuco. Revista de Agricultura, 46:151-156.
- ARAGAKI, M., 1961. Radiation and temperature on the sporulation of *Alternaria tomato*. Phytopathology, 51:803-805.
- ARAGAKI, M., 1964. Relation of radiation and temperature on the sporulation of *Alternaria tomato* and other fungi. Phytopathology, 54:565-569.
- ARAGAKI, M.; K.M. NISHIMOTO e J.W. HYLIN, 1973. Vegetative reversion of conidiophores of *Alternaria tomato*. Mycologia, 65:1205-1209.

- ASHIDA, J., 1965. Adaptation of fungi to metal toxicants. Annual Review of Phytopathology, 3:153-174.
- AZEVEDO, J.L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos . Summa Phytopatologica, 2:3-15.
- BARNETT, R.D. e H.H. LUKE, 1976. The effects of fungicides on development, seed contamination, and grain yield of wheat. Plant Disease Reporter, 60:117-119.
- BYRDE, R.J.W., 1970. The new systemic fungicides and their potential uses in the Tropics. Tropical Science, 12:105-111.
- BONDE, R., 1929. Physiological strains of *A. solani*. Phytopathology, 19:533-548.
- CARTER, J.F., 1978. Sunflower Science and Technology. Agronomy, a series of monograph , nº19. American Society of Agronomy Inc., Madison, U.S.A. 505 p.
- CHARLTON, K.M., 1953. The sporulation of *Alternaria solani* in culture. Transactions of the British Mycological Society , 36:349-355.
- CHOPRA, B.L. e J.S. JHOOTY, 1975. Antagonism between zineb and water soluble leachates on spore of *Alternaria cucumerina*. Indian Phytopathology, 27:208-214.
- DICKINSON, C.H. e B. WALLACE, 1976. Effect of late application of foliar fungicides on activity of micro-organism on winter-wheat flag leaves. Transactions of the British Mycological Society, 76:103-112.
- DIMOCK, A.W. e J.H. OSBORN, 1943. An *Alternaria* disease of zinnia. Phytopathology, 33:372-381.

- EKBOTE, M.V. e B.B. MORE, 1977. Studies on the efficacy of different fungicides on the control of *Alternaria*, leaf blight of wheat under artificial epiphytotic conditions. Journal of the Maharashtra Agricultural University, 1:33-35.
- ENGLEHARD, A.W., 1972. Chemical control of *Alternaria* and *Botrytis* on carnations under epiphytotic conditions. Phytopathology, 62:11 (Abstr.).
- ERWIN, D.C., 1973. Systemic fungicides diseases control, translocation, and mode of action. Annual Review of Phytopathology, 11:389-422.
- FAHIM, M.M., 1966. The effect of light and other factors on the sporulation of *Alternaria porri*. Transactions of the British Mycological Society, 49:73-78.
- GALLI, F.; H. TOKESHI; P.C.T. CARVALHO; E. BALMER; H. KIMATI ; C.O.N. CARDOSO e C.L. SALGADO, 1968. Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas e seu controle. Biblioteca Agrônô mica Ceres, São Paulo. 640 p.
- GAMBOGI, P.; E. TRIOLO e G. VANNACCI, 1976. Experiments on the behaviour of the seedborne fungus *Alternaria zinniae*. Seed and Science Tecnology, 4:333-340.
- GATTANI, M.L., 1954. The agar plate spore germination method for testing fungicides. Phytopathology, 44:113-115.
- GEORGOPOULOS, S.G., 1969. The problem of fungicide resistance. BioScience, 19:971-973.
- GEORGOPOULOS, S.G. e C. ZARACOVITIS, 1967. Tolerance of fungi to organic fungicides. Annual Review of Phytopathology, 5: 109-130.

- GERHOLD, N.R., 1957. Artificial field inoculation of potatoes with *Alternaria solani*. Plant Disease Reporter, 41: 135-136.
- GUPTA, S.K. e PUSHKARNATH, 1962. Inducing sporulation in artificial culture of *Alternaria solani* (Ell. & Martin) Jones & Grout. Mycopathologia, 17:82-88.
- HARTMAN, G.C., 1966. The cytology of *Alternaria tenuis*. Mycologia, 58:694-701.
- HEDJAROUDE, G.A., 1973. La maladie des taches brunes du tournesol (*Helianthus annuus*, L) en Iran. Phytopathologie Zentckeler, 78:274-277.
- HOCHSTEIN P.E. e C.F. COX, 1956. Studies on the fungicidal action of N(trichloromethylthio)-4-cyclohexane-1,2-dicarboximide (Captan). American Journal of Botany, 43:437-441.
- IONNAIDIS, N.M. e C.E. MAIN, 1973. Effect of culture medium on production and pathogenicity of *Alternaria alternata* conidia. Plant Disease Reporter, 57:39-42.
- JIMENEZ, M.F. e C.R. MILLER, 1966. Effect of light on the sporulation of *Alternaria tenuis*. Phytopathology, 56:883.
- JOLY, P., 1967. Key for the determination of the most common species of the genus *Alternaria* (Nees) Wiltsh, Emend. Joly. Plant Disease Reporter, 51:296-298.
- KO, W.H.; J.Y. KLIEJUNAS e J.T. SHIMOOKA, 1976. Effect of agar on inhibition of spore germination by chemicals. Phytopathology, 66:363-366.

- LAMBERT, D.H. e P.J. WEST, 1975. Increased sensitivity to zineb for *Verticillium malthousei* strain tolerant to benomyl. Phytopathology, 65:637-638.
- LEYENDECKER, P.J., Jr., 1954. Effect of fungicides and spraying schedules upon internal mold of Chili. Plant Disease Reporter, 38:32-34.
- LLHOYD, H.L., 1968. Pathogenic stability of *Alternaria longipes* (Ell. & Ev.) Mason subjected to different methods of isolation, storage, and inoculum production. Mycopathologia et Mycologia applicata, 38:33-39.
- LODHA, P.C., 1977. Note on the chemical control of early-blight of potato. Indian Journal of Agricultural Science, 46:605-606.
- LUCIANO, A e M. DAVREUX, 1967. Produccion de girasol en Argentina. Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária. Boletim tecnico nº37, 53 p.
- LUKENS, R.J., 1960. Conidial production from filter paper cultures of *Helminthosporium vagans* and *Alternaria solani*. Phytopathology, 50:867-868.
- LUKENS, R.J. e J.G. HORSFALL, 1969. Spore initiation in *Alternaria solani*. Phytopathology, 59:1039 (Ann. Meet. APS).
- LUKENS, R.J. e J.G. HORSFALL, 1973. Process of sporulation in *Alternaria solani* and their response to metabolic inhibitors. Phytopathology, 63:176-182.
- MCDONALD, W.C. e J.W. MARTENS, 1963. Leaf and stem spot of sunflower caused by *Alternaria zinniae* Pape. Phytopathology, 53:93-96.

- MILLER, P.M., 1955. V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. Phytopathology, 45:461.
- MISAGHI, I.J.; R.G. GROGAN; J.M. DUMIWAY e K.A. KIMBLE. Influence of environment and culture media on spore morphology of *A. alternata*. Phytopathology, 68:29-34.
- MORAES, S.A., 1977. *Cercospora arachidicola* Hori: obtenção de inóculo, inoculação e avaliação da resistência em amendoim (*Arachis hypogaea*, L). Tese de mestrado. ESALQ. Piracicaba, S.P., 116 p.
- MUNTANOLA, M., 1948. Description de una nueva enfermedad del girasol. Revista de Investigaciones Agrícolas, 2:205-211.
- NATRASS, R.M., 1950. Annual report of the senior plant pathologist, 1948. Review of Applied Mycology, 30:308-309(abstr.)
- NETZER, D. e R.G. KENNETH, 1970. Apparent heterokaryosis in *Alternaria dauci*. Canadian Journal of Botany, 48:831-835.
- PARRY, K:E. e R.K.S. WOOD, 1959. The adaptation of fungi to fungicides: adaptation to Captan. Annals of applied Biology, 47:1-9.
- PARTRIDGE, A.D. e A.E. RICH, 1962. Induced tolerance to fungicides in three species of fungi. Phytopathology, 52:1000-1004.
- PRASAD, B.; B.L. DUTT e B.B. NAGAICH, 1973. Inducing sporulation in *Alternaria solani*. 1. Effect of water treatment. Mycopathologia et Mycologia applicata, 49:141-146.
- PROTA, V., 1960. Esperienze intorno alla trasmissione di *Alternaria zinniae* Pape mediante i semi di zinnia e saggi

- di desinfezione dei medesimi. Notez. Malatt., 52(n.s.31 ): 119-130.
- RANDS, R.D., 1917. The production of spore by *Alternaria solani* in pure culture. Phytopathology, 7:316-317.
- RICHMOND, D.V. e R.J. PRING, 1980. A comparison between isolation of *Botrytis cinerea* sensitive and insensitive to benzimidazole fungicides. Annals of applied Biology, 94:306-308.
- RIBEIRO, I.J.A.; O. PARADELA FILHO; J. SOAVE e G.S. CERVELLINI, 1974. Ocorrência de *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki et Nishihara sobre girassol (*Helianthus annuus*, L). Bragantia, 33:LXXXI.
- SEILER, J.P., 1975. Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds. Mutation Research, 32:151-168.
- SIMMONS, E.G., 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphyllium* and *Ulocladium*. Mycologia, 59:67-92.
- SLIFKIN, M.K., 1973. Apparent induction of mutants and enhancement of conidial formation by fungicides in *Alternaria mali*. Mycopathologia et Mycologia applicata, 50:233-240.
- SMITH, D.H., 1971. A simple method for producing *Cercospora arachidicola* conidial inoculum. Phytopathology, 61:1414 (Abstract).
- STALL, R.E., 1958. An investigation of nuclear number in *Alternaria solani*. American Journal of Botany, 45:657-659.
- STRIDER, D.L., 1978. *Alternaria* blight of carnation in the greenhouse and its control. Plant Disease Reporter, 62: 24-28.



- SVETOV, V.G., 1975. *Alternaria* blight of sunflower along the Kuban River. Review of Plant Pathology, 55:nº 1397, Abstr.
- TOLEDO, A.C.D., 1974. Resistência a fungicidas. O Biológico, 40:163-170
- VAN DEN HENVAI, J., 1970. The influence of light and dark on *Alternaria zinniae*. Netherland Journal of Plant Pathology, 76:192-195.
- VAN TUYL, J.M., 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. Meded Landbounhogesh, 77:1-136.
- VERMA, R.A.B. e N.K. JHa PRASAD, 1977. Investigation on the *Alternaria* rot of akhrot (*Juglans regia*, L). Sydowia Annals of Mycology, 28:158-161.
- VERONA, O e T. BENEDEK, 1959. Iconographia Mycologica ( Gen. *Alternaria* Nees). Mycopathologia et Mycologia applicata (suplemento).
- VRANCEANU, A.V., 1974. Florea-Soarelui. Editura Academiei Socialiste Romania, Bucureste, 321 p.
- WHITE, G.A. e A.N. STARRAT, 1967. The production of a phytotoxic substance by *Alternaria zinniae*. Canadian Journal of Botany, 45:2087-2090.