

**DIVERSIDADE ENTRE ISOLADOS DE
ALTERNARIA SOLANI: AVALIAÇÃO
MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E
MOLECULAR**

MARCIANE DA SILVA OLIVEIRA

2007

MARCIANE DA SILVA OLIVEIRA

**DIVERSIDADE ENTRE ISOLADOS DE *Alternaria solani*: AVALIAÇÃO
MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E MOLECULAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como partes das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento de Plantas, para a obtenção do
título de “Doutora”

Orientadora

Profª. Dra. Elaine Aparecida de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Oliveira, Marciane da Silva.

Diversidade entre isolados de *Alternaria solani*: avaliação morfológica, fisiológica e molecular / Marciane da Silva Oliveira. -- Lavras: UFLA, 2007.
99 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Elaine Aparecida de Souza.

Bibliografia.

1. Batata. 2. Resistência a doenças. 3. Pinta-preta. 4. *Alternaria*. 5. Diversidade genética. 6. Compatibilidade vegetativa. 7. Esporulação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.21944

MARCIANE DA SILVA OLIVEIRA

**DIVERSIDADE ENTRE ISOLADOS DE *Alternaria solani*: AVALIAÇÃO
MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E MOLECULAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como partes das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Doutora”

APROVADA em 16 de outubro de 2007

Professor Dr. César Pereira Brasil Pinto	UFLA
Pesquisadora Dra. Magnólia de Araújo Campos	UFLA
Pesquisador Dr. Ailton Reis	EMBRAPA
Pesquisador Dr. Paulo Eduardo Melo	EMBRAPA

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A vovó Geralda (in memória),

Por sempre iluminar o meu caminho, por suas formosas, alegres e memoráveis lembranças;

OFEREÇO

A minha amada *Família*, por serem os meus Olhos, para o que não pude ver; minha Mão, para o que não alcancei; meus Pés quando não consegui caminhar sozinha; minha Voz para quando perdi a fala, a minha Força quando fraquejei. E, principalmente, acreditarem em mim até mesmo quando eu não acreditava!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, principalmente ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do curso de doutorado e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Dra. Elaine Aparecida de Souza, orientadora, pelos ensinamentos transmitidos e pela confiança em mim depositada e ao Professor Dr. César Brasil, pelas importantes contribuições dadas à execução deste trabalho, além da disponibilidade para atender-me quando as dúvidas surgiam e pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso. Agradeço também pela participação na banca examinadora deste trabalho.

À Embrapa Hortaliças, especialmente ao Pesquisador Dr. Ailton Reis, pela oportunidade de estágio e, também, ao Pesquisador Dr. Paulo Eduardo Melo, por ter concedido folhas infectadas para a realização deste trabalho. Agradeço pelas participações na banca examinadora deste trabalho e pelas valiosas sugestões

À Pesquisadora Dra. Magnólia Campos, pela disponibilidade de participação na banca examinadora deste trabalho e pelas valiosas.

Aos professores do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em especial aos professores do curso de Genética e Melhoramento de Plantas: João Bosco, Magno Ramalho e Lisete Davide, pela amizade e conhecimentos transmitidos; à Professora Dra. Flávia Avelar, por indicar as portas para essa longa jornada, além da grande amizade e a toda a sua família.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, por despertarem em mim o interesse pela ciência e ter guiado os meus primeiros passos no mundo acadêmico.

Aos colegas do grupo da batata, principalmente ao Raimundo, por ter colaborado para a realização deste trabalho e aos colegas do laboratório de Genética Molecular, em especial ao Lamartine que, além da amizade, transmitiu-me seus conhecimentos práticos, a partir dos quais foi possível a realização deste trabalho, também, a todos os funcionários do Departamento de Biologia.

Aos companheiros do Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças/UFLA, sobretudo a Thaíssa pela valiosa ajuda e a todos os amigos do GEN pelos ótimos

momentos passados juntos.

Aos inesquecíveis: Mansuêmia, Wel e Juliana e as sempre amigas: Rose, Quélen, Francine e Livia, pela ótima convivência, pelos conselhos e companheirismo.

As eternas amigas: Malu, Ju, Flávia, Adriana, Maria e Mariana, que mesmo que nos encontremos menos que gostaríamos, nunca deixamos nossa amizade enfraquecer.

Aos colegas do Centro Universitário de Caratinga, pelo excelente convívio, principalmente as professoras Lamara e Patrícia, por muitas vezes ter compreendido a minha ausência para que pudesse terminar a minha tese.

A minha mãe por ter que muitas vezes deixar a sua casa e me ajudar a vencer meus fantasmas, ao meu pai, que ficava sozinho torcendo por mim, sem vocês eu não teria conseguido.

Aos meus irmãos Maurinho e Cilo, pelo apoio logístico e principalmente sentimental, pela amizade, companheirismo, torcida e por serem muito mais que exemplos. A minha irmãzinha Mari, que me agüentou nos momentos de tristeza e comemorou comigo as vitórias, por muitas vezes ter cuidado de mim.

Ao meu amado cãozinho Rick, por ter me ensinado o que é o amor incondicional.

Aos meus tios, tias, primos e amigos por todo o carinho e sempre me apoiarem, incentivando-me para que nunca desistisse de alcançar meus objetivos.

“É difícil dizer o que é impossível, pois o sonho de ontem é a esperança de hoje e a realidade de amanhã. Acima de tudo, a melhor forma de prever o amanhã é criá-lo. Chega o momento de parar de sonhar e agir, pois uma visão sem ação é somente um sonho, uma ação sem visão é um passatempo. E uma visão com ação pode transformar o mundo”.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução	2
2 Referencial Teórico.....	4
2.1 A pinta-preta na batata e no tomateiro	4
2.2 O patógeno <i>Alternaria solani</i>	6
2.3 Caracterização morfológica e fisiológica de <i>Alternaria solani</i>	8
2.4 O ciclo parassexual e os passos envolvidos na formação do heterocário em <i>A. solani</i>	11
2.5 Uso de marcadores moleculares no estudo de fitopatógenos.....	15
2.6 Variabilidade genética de <i>Alternaria solani</i>	16
3 Referências Bibliográficas	20
CAPÍTULO 2: Variabilidade morfológica e fisiológica de isolados de <i>Alternaria solani</i>	27
1 Resumo	28
2 Abstract.....	29
3 Introdução	30
4 Material e Métodos	32
4.1 Obtenção e manutenção dos isolados	32
4.2 Avaliação dos caracteres morfológicos	32
4.2.1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)	32
4.2.2 Diâmetro colonial	34
4.2.3 Taxa de esporulação.....	34
4.2.4 Análises estatísticas	35

5 Resultados e Discussão.....	36
6 Conclusões.....	42
7 Referências Bibliográficas.....	43
CAPÍTULO 3: Diversidade genética entre isolados de <i>Alternaria solani</i>	46
1 Resumo.....	47
2 Abstract.....	48
3 Introdução.....	49
4 Material e Métodos.....	52
4.1 Isolados de <i>Alternaria solani</i>	52
4.2 Análises molecular.....	52
4.2.1 Obtenção de massa micelial.....	52
4.2.2 Extração de DNA total.....	55
4.2.3 Reação ISSR.....	56
4.3 Grupos de compatibilidade micelial (GCM).....	58
4.4 Análises estatísticas.....	58
4.4.1 Análises dos grupos de compatibilidade micelial.....	58
4.4.2 Identificação do número ótimo de marcadores.....	59
4.4.3 Estimativa das similaridades genéticas por marcadores ISSR.....	60
5 Resultados e Discussão.....	62
5.1 Análise molecular.....	62
5.1.1 Nível de polimorfismo.....	62
5.1.2 Avaliação da variabilidade genética.....	64
5.2 Grupos de compatibilidade micelial (GCM).....	68
5.3 Considerações finais.....	73
6 Conclusões.....	76
7 Referências Bibliográficas.....	77
ANEXOS.....	81

RESUMO

OLIVEIRA, Marciane da Silva. **Diversidade entre isolados de *Alternaria solani*: avaliação morfológica, fisiológica e molecular.** 2007. 99p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

A pinta-preta da batata e do tomate, causada pelo fungo *Alternaria solani*, é responsável por perdas expressivas na produtividade dessas solanáceas no Brasil. As perdas podem atingir 50% da produção, sob condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença. A estratégia de controle mais eficiente é o emprego da resistência genética. No entanto, o sucesso no desenvolvimento de estratégias para controle da doença requer o entendimento dos níveis de variabilidade genética do patógeno. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de isolados de *A. solani*, coletados em diferentes campos de produtividade de batata e tomate do Brasil, por meio de marcadores morfológicos e fisiológicos, grupos de compatibilidade micelial (GCM) e marcadores ISSR. Na análise morfológica e fisiológica as seguintes características foram avaliadas: diâmetro da colônia, índice de velocidade do crescimento micelial (ICVM), e taxa de esporulação. Os isolados apresentaram ampla variabilidade para todas as características avaliadas. As estimativas de similaridade genética entre os pares de isolados para a compatibilidade micelial variaram de 0,02 a 0,73, com média de 0,23. Foi observada a formação de 36 grupos, sendo que, apenas três grupos foram formados por isolados que apresentam o mesmo comportamento quanto à compatibilidade micelial (GCM). Na análise de marcadores ISSR foram obtidas 85 bandas polimórficas. As estimativas de similaridade genética entre os isolados variaram de 0,14 a 0,97, com média 0,58. Na análise de agrupamento foram formados cinco grupos contendo apenas dois isolados, um grupo com três isolados e dois grupos com mais de 15 isolados. Dez isolados formaram grupos individuais. Em geral houve tendência de formação de grupos por local de coleta. Apesar da ampla variabilidade detectada por ambas as análises de GCM e marcadores ISSR, esta não foi atípica para espécies de fungos de reprodução assexual.

¹ Orientadora: Elaine Aparecida de Souza – UFLA/DBI

ABSTRACT

Oliveira, Marciane da Silva. **Diversity among isolates of *Alternaria solani*: morphological, physiological and molecular evaluations**. 2007. 99p. Thesis (Doctorate in Genetics and Plants Breeding) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Potato and tomato early blight caused by the fungus *Alternaria solani*, is responsible for expressive yield losses of those solanaceous in Brazil. Yield losses can reach up to 50%, under favorable environmental conditions for disease development. The most efficient strategy for its control is the use of genetic resistance. However, the success in developing strategies to control this disease requires the understanding of levels of genetic variability of the pathogen. The objective of this work was to evaluate the diversity of isolates of *A. solani*, collected in different Brazilian potato and tomato crops, through morphological and physiological markers, mycelial compatibility group (MCG) and ISSR markers. The following characteristics were appraised: colony diameter, mycelial growth velocity index (MGVI), and spore production rates. The isolates presented wide variability for all characteristics. The estimates of genetic similarity between pairs of isolates for the MCG varied from 0.02 to 0.73, with 0.23 average. The formation of 36 groups was observed, and, only three groups were formed by isolates that show the same behavior concerning mycelial compatibility. The ISSR markers produced 85 polymorphic bands. The estimates of genetic similarity among the isolates varied from 0.14 to 0.97, with 0.58 average. In the cluster analysis five groups were formed containing two isolates, a group with three isolates and two groups with more than 15 isolates. Ten isolates formed individual groups. In general, there was a tendency of isolates to group accordingly to the collecting place. In spite of the wide variability detected by both analyses of MGC and ISSR markers, this was not atypical for asexual reproduction fungi species.

* Advisor: Elaine Aparecida de Souza - UFLA/DBI.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Alternaria* tem grande importância econômica por abranger vários patógenos de plantas, alguns dos quais causam grandes prejuízos econômicos (Rotem, 1994). Dentre os membros deste gênero, a espécie *Alternaria solani* é uma das mais conhecidas e expressivas economicamente (Bonde, 1929) e causa danos a membros da família *Solanaceae* nas regiões de cultivo de todo mundo, principalmente naquelas de clima tropical. A ocorrência de epidemias severas da doença está associada a temperaturas de 25° a 30°C e elevada umidade (Tofoli, 2004; Tokeshi & Bergamin, 1980). No Brasil, a pinta-preta representa uma doença fúngica muito importante e freqüente nas culturas da batata e do tomate e caracteriza-se por causar intensa redução da área foliar, queda dos frutos e tubérculos e, conseqüentemente, redução do potencial produtivo.

Entre as estratégias de controle da doença, a resistência genética é a mais eficaz, pela redução dos custos de produção e menor impacto ambiental. Existem cultivares e clones oriundos da seleção nos programas de melhoramento que exibem bons níveis de resistência de campo que poderiam ser cultivados sem o emprego de defensivos contra *A. solani* (Stevenson, 1994; Pinto et al., 2002). No entanto, pouco se conhece sobre a variabilidade do patógeno, principalmente no Brasil onde está doença fúngica é a de maior destaque. Portanto, para a identificação de novas fontes de resistência à pinta-preta, torna-se imprescindível o conhecimento da estrutura populacional do patógeno, bem como o seu constante monitoramento.

Dessa forma, torna-se clara a importância de estudar a diversidade genética em isolados de *A. solani* de diferentes campos de produtividade de batata e de tomate, quanto às suas características morfológicas, fisiológicas e sua

variabilidade genética. Essas informações são importantes no desenvolvimento de estratégias de manejo para controle da pinta-preta no Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A pinta-preta na batata e no tomateiro

A pinta-preta, em muitas regiões, inclusive no Brasil, representa uma das mais importantes e freqüentes doenças fúngicas nas culturas da batata e do tomate. Ela ocorre, principalmente, em regiões com alta umidade e temperaturas elevadas (Kuczynska, 1992). Caracteriza-se por causar intensa redução da área foliar, queda do vigor das plantas, depreciação de frutos e tubérculos e conseqüente redução do potencial produtivo, podendo atingir perdas de cerca de 50%. (Tofoli, 2004; Kwasna, 1992).

O patógeno, *A. solani*, danifica ou afeta folhas, caules e frutos dos vegetais. Em alguns casos, raízes ou tubérculos podem ser danificados. Logo que infectado, os tecidos doentes são rapidamente colonizados e as lesões são produzidas quando ocorre a esporulação. Os sintomas da doença são caracterizados por manchas foliares numerosas, necróticas, pardo-escuras, com a presença de anéis concêntricos e bordos bem definidos. Lesões nas hastes e pecíolos podem surgir em plantas adultas e caracterizam-se como pardas, alongadas, deprimidas, podendo ou não apresentar halos concêntricos. O primeiro dano sofrido pela planta é uma severa desfolhação, afetando a produtividade e a qualidade dos frutos (Strandberg, 1992). Os danos na planta são enormes, uma vez que toxinas podem causar a morte da planta em regiões distantes do sítio de infecção (Hooker, 1986).

Em frutos de tomate, os sintomas são caracterizados por manchas escuras, deprimidas e com a presença típica de anéis concêntricos, que, geralmente, se localizam na região do pedúnculo. Lesões em tubérculos de batata são escuras, deprimidas, circulares a irregulares, com bordos de cor

púrpura ou bronzeada. A polpa sob a lesão é seca, coriácea e de cor amarela a castanha. Sintomas de tombamento podem ser verificados em plântulas de tomate afetadas pela doença (Tofoli, 2004; Tokeshi & Bergamin, 1980).

O aumento da suscetibilidade à pinta-preta está, geralmente, associado a tecidos que tenham alcançado a maturidade, ou seja, plantas em período de floração, frutificação ou formação de tubérculos. Durante esta fase, ocorre demanda maior de açúcares e nutrientes para a formação de frutos e tubérculos, em detrimento da folhagem, o que favorece o processo infeccioso em órgãos exportadores. Por este motivo, os sintomas aparecem, primeiramente, nas folhas mais velhas e evoluem, posteriormente, para as partes mais altas da planta (Tofoli, 2004).

Esta doença é de difícil controle porque pode ser amplamente disseminada pelo vento, por distâncias curtas ou para longas distâncias, associadas às sementes. Como as espécies de *Alternaria* têm um ciclo de vida curto, o inóculo secundário (esporos) é produzido nas plantas infectadas muito rapidamente e com grande abundância, e disseminados pelo vento para outras culturas (Strandberg, 1992).

Além da sobrevivência por conídios, existe a possibilidade de o patógeno permanecer viável no solo, na forma de micélio. Os conídios caracterizam-se por serem altamente resistentes a baixos níveis de umidade, podendo permanecer viáveis por até dois anos nestas condições. Uma vez presentes na cultura, são dispersos pela ação da água, vento, trabalhadores, equipamentos, insetos e pelo contato e atrito entre folhas saudáveis e infectadas. Havendo umidade e calor suficientes, os conídios germinam e infectam as plantas rapidamente, podendo o fungo penetrar diretamente pela cutícula ou através de estômatos. A colonização é intracelular, invadindo tecidos do hospedeiro e provoca sintomas. Em condições de campo, as lesões surgem 3 a 5 dias após a inoculação, todavia, em condições controladas, pontuações negras

podem ser verificadas 24 horas após a inoculação (Strandberg, 1992; Tofoli, 2004).

A ocorrência de epidemias severas da doença está associada a temperaturas na faixa de 25° a 32°C e elevada umidade (Tofoli, 2004), agravada pelo fato de que, até recentemente, poucos fungicidas apresentaram resultados efetivos contra essas doenças.

2.2 O patógeno *Alternaria solani*

De acordo com Fancelli (1991), o agente causal da pinta-preta em batata e em tomate foi descrito pela primeira vez por Ellis & Matin (1971), que propuseram a denominação de *Macrosporium solani*. No entanto, Wiltshire verificou que este nome era ambíguo e deveria ser substituído por *Alternaria solani* Sorauer.

Hooker (1986) descreve *Alternaria solani* como um fungo imperfeito que se caracteriza por apresentar conídios isolados, com comprimento entre 150 a 300µm e espessura entre 15 a 19µm, podendo ser retos ou sinuosos, com corpo oblongo ou elipsoidal, sempre afinando em direção ao bico. Normalmente, apresentam coloração parda ou ouro-claro médio e septos transversais que variam entre 9 e 11 µm, com pouco ou nenhum septo longitudinal; possuem bico de comprimento idêntico ou superior ao corpo do conídio, medindo, geralmente, de 2,5 a 5,0µm de espessura, o qual diminui gradualmente, podendo ser, algumas vezes, ramificado.

Os conidióforos, que são estruturas onde ficam inseridos os conídios, são septados, retos ou sinuosos, com 110µm de comprimento e espessura variável entre 6 a 10 µm, de coloração idêntica aos conídios. Os conídios podem germinar entre temperaturas de 1°C a 45°C, com ótimo entre 25°C e 35°C. Esta germinação pode iniciar em 1 a 2 horas após a infecção; a temperatura de 6°C a

34°C. Os sintomas se tornam característicos normalmente em 2 a 3 dias e lesões com 3 mm de diâmetro já apresentam esporulação. Na natureza, os conídios são produzidos continuamente na parte inferior das folhas ou nos restos de cultura (Tokeshi & Bergamin, 1980).

Dentre os Hyphomycetes, o gênero *Alternaria* é o mais comumente encontrado na natureza, com ampla ocorrência entre as plantas, estações e regiões geográficas. Podem ser patógenos, parasitas facultativos ou saprófitas (Kwasna, 1992). Segundo Strandberg (1992), para entender melhor o sucesso deste fungo como um patógeno para a batata e o tomate, é importante considerar seu ciclo de vida, a maneira de reprimi-lo e suas características que favorecem a patogenicidade e a sua ampla ocorrência.

O gênero *Alternaria* é composto por fungos imperfeitos que não apresentam o ciclo sexual ou a organização de estruturas de frutificação. Os conídios são produzidos por conidióforos simples ou ramificados ou podem, também, ser produzidos diretamente da hifa. Os conídios maduros são facilmente destacados e disseminados pelo vento ou pela água. Esses fungos podem persistir como micélio ou conídios que sobrevivem em restos de plantas entulhadas, ou no solo, ou como micélios ou conídios transportados nas sementes infectadas. Na presença de água, os conídios germinam rapidamente (Strandberg, 1992).

Um importante atributo do gênero *Alternaria* é seu curto ciclo de vida. Em *A. solani*, o período entre a infecção e a esporulação, em tomate, é de sete dias. Certamente, um ciclo de vida com curto tempo é vantajoso porque pode promover um rápido desenvolvimento e progresso da doença. Produção freqüente ou contínua de conídios na lesão estabelecida durante condições favoráveis é de igual importância. Um único conidióforo pode formar até quatro gerações de conídios de um em *A. solani* (Strandberg, 1992).

2.3 Caracterização morfológica e fisiológica de *Alternaria solani*

Observa-se variação das características culturais de *A. solani*. Entretanto, Bonde (1929) e Hooker (1986) descreveram as colônias como espalhadas, algodonosas, com a cor variando de marrom-escura para preta, sendo que alguns isolados produzem um pigmento vermelho-amarelado em meio nutriente. Essas características morfológicas das colônias são usadas, freqüentemente, para separar grupos de isolados em diferentes patógenos, indicando a ocorrência de variabilidade fenotípica dentro das espécies.

A variabilidade de 38 isolados de *A. brassicicola*, coletados de cultivos comerciais de crucíferas do estado de Pernambuco, foi estimada com base em variáveis relacionadas ao desenvolvimento da alternariose e à fisiologia do patógeno. As características fisiológicas do patógeno avaliadas foram a taxa de crescimento micelial (TCM), esporulação (ESP), germinação de conídios (GER) e sensibilidade ao fungicida iprodione (ICM). Para as características TCM, ESP e GER não foi observada diferença significativa quanto aos hospedeiros e à origem dos isolados. A maior variabilidade foi observada quanto à resistência ao fungicida (ICM), devido à variação de isolado para isolado, dentro de uma mesma espécie hospedeira. Utilizando o conjunto de variáveis avaliadas, não foi possível a formação de grupos de similaridade, o que reforça a grande variabilidade entre isolados do patógeno com base nas características avaliadas (Michereff et al., 2003). Estes resultados corroboram com análises realizadas pelo emprego de marcadores moleculares RAPD (Verma & Saharam, 1994; Sharma & Tewari, 1998).

Entretanto, com a espécie em questão, poucos estudos foram anteriormente realizados. Bonde (1929) observou que, após serem isoladas de tubérculos de batata, as colônias apresentavam diferentes cromoginidades, com a pigmentação variando de amarelo-claro, em colônias jovens a um vermelho-

tijolo, com o envelhecimento. Entretanto, pouco se conhece sobre a natureza química dos pigmentos de *A. solani* que, quando dissolvidos em água, observam-se pigmentos laranja e amarelos. Os dados sugerem que o fungo aumenta o pH do meio de cultura BDA (batata dextrose ágar), sendo a pigmentação influenciada pelo meio de cultivo, temperatura, luz e quantidade de hidrogênio. Contudo, a temperatura altera a quantidade de pigmento, pois, em temperaturas em torno de 15°C, a produção da cor pode ser inteiramente inibida e, com a temperatura entre 25° e 30°C, uma quantidade máxima de cor é produzida. Quanto à incidência de luz, as colônias crescidas em casa de vegetação foram mais pigmentadas do que aquelas crescidas em câmara escura. Também foi observado que a formação de pigmentos está, geralmente, correlacionada com a taxa de crescimento. Este autor concluiu que isolados de *A. solani* podem ser diferenciados com base na produção de esporos, pigmentação em BDA, tempo de crescimento, aparência do micélio na cultura e formação de lesões nos folíolos destacados e em tubérculos.

Esse patógeno produz relativamente poucos conídios no meio de ágar, sendo importante o estabelecimento de metodologias para a produção de conídios *in vitro*. Diversas metodologias já foram utilizadas, como indução por luz ultravioleta (Charton, 1953; McCallan & Chan, 1944), por luz fluorescente (Charton, 1953; Lukens, 1960) e por iluminação solar (McCallan & Chan, 1944; Padhi & Rath, 1974; Rands, 1917). A esporulação tem sido aumentada por ferimentos no micélio (Charton, 1953; Douglas & Pavek, 1971), no meio desidratado (Charton, 1953; McCallan & Chan, 1944), ou usando aditivos químicos (McCallan & Chan, 1944; Eilers & Baxters, 1974). Porém, além de não produzir número suficiente de esporos para infectar grande número de plantas, muitos desses procedimentos requerem um longo período de esporulação (de 7 a 20 dias).

Para contornar esses problemas, Shahin & Shepard (1979)

desenvolveram uma metodologia na qual, primeiramente, os isolados são mantidos em meio BDA, no escuro e, depois, transferidos para um meio de CaCO_3 e também incubados no escuro. No entanto, nem todos os isolados produzem quantidade suficiente de esporos por essa metodologia.

Há relatos, na literatura, de diversos meios de cultura que favorecem o crescimento micelial e estimulam a esporulação. Entre eles, destacam-se o de batata-dextrose-ágar (Shahin & Shepard, 1979; Cotty & Misaghi, 1985; Strandberg, 1987), o de batata-ágar (Fahim, 1986), o V8A (Strider, 1978; Strandberg, 1987; Simmons, 1992), o de cenoura-ágar (Hotchkiss & Baxter, 1983) e o de folha de cenoura-ágar (Strandberg, 1987). Porém, nenhuma dessas metodologias permitiu a esporulação suficiente para inoculação em um grande número de plantas.

Com a dificuldade na produção de esporos em quantidade suficiente para inoculação em campo, os inóculos para esse fim são produzidos a partir de uma mistura de esporos e micélios de folhas infectadas secas (Pinto et al., 2002; Thirthamallappa & Lohithaswa 2000). Essa metodologia, apesar de prática, não possibilita separar os inóculos quanto à sua virulência, visto que a capacidade de esporulação é uma característica importante não só na análise da diversidade dos isolados, mas também na avaliação da severidade da doença. Pelletier & Fry (1989) e Johnson & Teng (1990) observaram correlação linear entre a produção de esporos e a área da lesão.

Eficiente esporulação pode ser induzida expondo-se as culturas à luz diurna, com as placas parcialmente abertas, depois da remoção de micélios aéreos (Barksdale 1969). Recentemente, foi proposta uma metodologia de esporulação por Rodrigues (2005), na qual os isolados são crescidos em meio V8 líquido com agitação. Posteriormente, os isolados são transferidos para o meio BDA e mantidos sob o regime de luz negra, com fotoperíodo de 12 horas, por 72 horas. Esta metodologia permitiu a produção de uma boa quantidade de

esporos e mostrou-se de fácil execução. Os diferentes isolados testados nesta metodologia mostraram diferentes capacidades de esporulação.

2.4 O ciclo parassexual e os passos envolvidos na formação do heterocário em *A. solani*

Os fungos imperfeitos ou mitospóricos, Deuteromycetes, como os do gênero *Alternaria*, são caracterizados por não apresentarem uma fase sexuada (Loguercio-Leite et al., 2004). Entretanto, é relatada grande variabilidade fenotípica e genética dentro das espécies deste gênero (Gherbawy, 2005, Peever et al., 1999, Pryor & Michailides, 2002, Robert et al., 2000), em *A. solani* (Waals et al., 2004, Martinez, et al., 2004, Petrunak & Christ, 1992, Weir et al., 1998), em *A. brassicicola* (Bock et al., 2005, Bock et al., 2002), em *A. linicola* (McKay et al., 1999), em *A. brassicola* (Michereff et al., 2003) e em *A. alternata* (Morris et al., 2000, Petrunak & Christ, 1992, Weir et al., 1998).

Entre os mecanismos que podem ampliar a variabilidade genética em fungos assexuais, destaca-se a ocorrência do ciclo parassexual. Esse processo foi descrito, pela primeira vez, em 1952, por Pontecorvo & Roper, que descobriram uma alternativa do sexo em *Aspergillus nidulans*, segundo a qual recombinantes eram produzidos sem a ocorrência do processo meiótico ou ciclo sexual. Nesta investigação, o passo decisivo para a descoberta foi o experimento no qual duas linhagens haplóides, mutantes para diferentes deficiências nutricionais, foram postas para germinar, de modo que ocorresse a anastomose de hifas e, conseqüentemente, a formação do heterocário (dois núcleos geneticamente distintos em um mesmo citoplasma). O heterocário formado não apresentava as deficiências nutricionais dos mutantes (Azevedo, 2004).

Portanto, um pré-requisito para a ocorrência da parassexualidade é que diferentes isolados sejam compatíveis vegetativamente, ou seja, é necessário que

ocorra a extensão da ponta da hifa, ramificação e fusão, que poderá levar à formação de um heterocário (Glass et al., 2000).

Uma vez que *A. solani*, assim como a maioria dos fungos, é composto por filamentos tubulares denominados hifas, estas desempenham importantes funções, como a de colonização do substrato, absorvendo água e outros nutrientes. A fusão de hifas e a formação do heterocário são pré-requisitos importantes para a comunicação intra-hifas e a homeostase da colônia durante o crescimento e a reprodução (Glass et al., 2004). O reconhecimento ou não reconhecimento vegetativo parecem ser cruciais nestes organismos, pois eles sofrem espontaneamente fusão das células vegetativas com eles mesmos ou com outros indivíduos. Estas fusões celulares (anastomoses) coordenam a mistura do citoplasma e a formação de heterocários vegetativos, ou seja, células contendo diferentes tipos de núcleos (Saupe, 2000).

Acredita-se que a incompatibilidade vegetativa funcione como um sistema de reconhecimento de genótipos diferentes para limitar a passagem de elementos infecciosos, para prevenir a exploração por núcleos mal adaptados e ou para prevenir que recursos sejam retirados durante a reprodução sexual, sendo, portanto, um mecanismo de autodefesa em fungos filamentosos (Glass et al., 2000). Os mesmos autores sugerem que a seleção atuaria sobre os locos *het* para a manutenção do polimorfismo em populações de fungos. Saupe (2000) comenta que a função dos genes *het* é preservar a individualidade genética.

Embora sejam óbvios os benefícios da formação de heterocário, existem mecanismos genéticos que restringem a sua formação entre indivíduos geneticamente diferentes (Glass et al., 2000). Em fungos filamentosos, existem o reconhecimento sexual, que é controlado por locos *mat* (“mating types”) e o reconhecimento vegetativo, que é controlado por um loco específico denominado *het* (incompatibilidade de heterocário ou também pode ser chamado *vig*, de incompatibilidade vegetativa). Quando dois indivíduos se encontram,

eles podem sofrer a fusão celular. Se os dois indivíduos tiverem o mesmo genótipo *het*, ocorre a heterocariose. Se eles diferem geneticamente para o loco *het*, apesar da fusão de hifas, as células heterocarióticas são rapidamente destruídas ou têm o seu crescimento severamente inibido (Saupe, 2000).

Dois tipos de sistemas genéticos, um alélico e outro não alélico, foram descritos como reguladores da incompatibilidade vegetativa. Em sistemas alélicos, anastomoses entre indivíduos que contêm um único loco *het* diferente provocam a incompatibilidade vegetativa. Em interações não alélicas, uma interação entre alelos específicos em dois locos diferentes provoca a incompatibilidade. O número de genes *het* em uma população determina o número de grupos de compatibilidade vegetativa (GCVs), dentro dos quais heterocários podem ser prontamente formados (Leslie & Zeller, 1996).

Uma vez que o fenótipo da compatibilidade vegetativa tem bases multigênicas, ele pode ser usado como uma alternativa de identificar um conjunto de isolados que compartilham os mesmos alelos desses locos. Como o número de locos que governam esta característica é grande, o número de grupos de compatibilidade vegetativa também é grande (milhares) e a possibilidade de identificação, embora possível, é proporcionalmente pequena em populações de acasalamentos ao acaso (Leslie & Summerell, 2006). Portanto, na prática, confrontos entre isolados selvagens de uma mesma população ou de populações diferentes resultam, freqüentemente, em interações de incompatibilidade (Saupe, 2000).

A classificação de isolados em GCVs pode ser uma importante ferramenta para a análise de populações de fungos. Isso porque, em uma população assexuada, como não ocorre a recombinação sexual, os isolados com patogenicidade similar que surgem como parte de uma linhagem clonal podem ser do mesmo GCV. Nesse sentido, se há uma maneira suficientemente rápida para a identificação destes GCVs, isso poderá reduzir o tempo consumido nos

testes de patogenicidade (Leslie & Summerell, 2006). Muitas pesquisas têm usado o fenômeno natural da rejeição por não reconhecimento, ou compatibilidade vegetativa, como é conhecida em Basidiomicetos e Ascomicetos, como um método para verificar a diversidade genética em várias espécies de fungos (Kerényi et al., 1997, Elena & Paplomatas, 1998, Caten & Newton, 2000, Tsor et al., 2001, Nitzan et al., 2002, Gionannetti et al., 2003, Roca et al., 2004).

Dessa forma, o número de grupos de compatibilidade micelial (GCM) é um marcador fenotípico com o seu sistema de reconhecimento controlado por múltiplos locos, mas o conhecimento do mecanismo genético básico é limitado em muitos fungos filamentosos (Glass & Kaneko, 2003). Quando a hifa de um isolado difere em um ou mais locos que controlam a fusão, a compartimentalização e a lise da célula ocorrem, formando uma zona (linha/barreira) de reação com redução de crescimento entre os dois isolados. Portanto, ocorre uma perfeita zona de interação, característica entre os isolados que são incompatíveis vegetativamente (Kohn et al., 1990).

Entretanto, a classificação dos diferentes isolados em grupos de compatibilidade vegetativa indica a probabilidade de ocorrência de recombinação somática entre os isolados do mesmo grupo (Leslie, 1993). Saupe (2000) comenta que a classificação dos isolados em grupos de compatibilidade vegetativa pode ser uma boa ferramenta para análises de populações de fungos, pois, em muitos casos, nas populações naturais, o número de GCVs é considerável. Na prática, um confronto entre isolados selvagens da mesma ou de diferentes populações frequentemente resulta em interações de incompatibilidade. Em geral, o número de GCV amplia com o aumento do número de isolados e da diversidade de origem geográfica desses (Leslie & Summerell, 2006).

2.5 Uso de marcadores moleculares no estudo de fitopatógenos

Com o advento dos marcadores isoenzimáticos, seguido das técnicas modernas de biologia molecular que possibilitaram o surgimento de métodos variados para a detecção de polimorfismo genético, diretamente no DNA (marcadores de DNA), o número de marcadores genéticos aumentou substancialmente, possibilitando a sua aplicabilidade em diversas espécies (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os marcadores moleculares são utilizados freqüentemente para os estudos genéticos em fungos filamentosos. A estrutura populacional de um patógeno, visando ao estabelecimento de inferências evolutivas, pode ser melhor visualizada se forem utilizados marcadores genéticos seletivamente neutros (RFLP, RAPD, AFLP, etc.), pois eles fornecem informações sobre todo o genoma, permitindo estimar o parentesco, sem sofrerem variações ambientais, tornando, assim, o estudo mais conciso.

No gênero *Alternaria*, diversos tipos de marcadores moleculares são empregados no estudo da diversidade genética. Petrunak & Christ (1992) avaliaram a variabilidade isoenzimática nas espécies *A. alternata* e *A. solani*. Com o emprego de marcadores RFLP, foi analisada a variabilidade de *A. alternata*, por Adachi et al. (1996) e Aradhya et al. (2001). Já os marcadores AFLP foram empregados para o estudo da variabilidade genética em *A. solani* (Martínez et al., 2004) e em *A. brassicicola* (Bock et al., 2002; Bock et al., 2005). Os marcadores RAPD-PCR foram os mais utilizados nos estudos de diversidade em espécies do gênero *Alternaria* (Weir et al. 1998; Sharma & Tewari, 1998; Peever et al. 1999; Morris et al. 2000; Roberts et al. 2000; Martínez et al. 2002; Pryor & Michailides 2002; Gherbawy 2005).

O maior emprego dos marcadores RAPD deve-se ao seu baixo custo e à facilidade, uma vez que elevados níveis de polimorfismo são facilmente obtidos. Entretanto, há a baixa repetibilidade dos resultados, diminuindo a eficácia do

método. Uma alternativa é o uso dos *random amplified microsatellites* (RAMS) ou *Inter-SSR (Simple Sequence Repeats) amplification* (ISSR), que combina a análise RAPD, não sendo necessário um conhecimento prévio de uma seqüência de DNA. Em uma única reação, vários locos polimórficos podem ser encontrados, sendo os RAMS uma técnica promissora para estudo da variação genética. Vegas & Duran (2004) compararam o uso de marcadores RAPD e ISSR na avaliação da variação genética intra e interespecífica de lentilhas. Constataram que os marcadores ISSR produziram mais bandas polimórficas do que os marcadores RAPD. Waals et al. (2004) utilizaram marcadores RAMS para determinar a diversidade genética entre isolados de *A. solani* coletados na África do Sul e observaram grande número de produtos de amplificação.

2.6 Variabilidade genética de *Alternaria solani*

Devido à variabilidade na virulência de isolados de *A. solani*, a existência de raças fisiológicas para este patógeno tem sido proposta por alguns autores. Bonde (1929) encontrou diferenças relativas quanto à patogenicidade entre isolados de *A. solani* de tomate, enquanto Henning & Alexandre (1959) descreveram sete raças fisiológicas distintas de *A. solani*, num campo de produção de batata.

Com base em diferenças culturais, serológicas e eletroforéticas, Fancelli (1991) propôs que a espécie *A. solani* fosse subdividida em dois grupos (tomate e batata). Simmons (2000) propôs uma nova espécie, *A. tomatophila*, como o agente causal da pinta-preta em tomate. No entanto, não há evidências conclusivas sobre a ocorrência de raças fisiológicas. As raças fisiológicas são definidas, de acordo com a especificidade, em cultivares hospedeiras diferenciadoras (Schlegel, 2003) e, segundo Chaerani & Voorrips (2006), o relato da presença de raças fisiológicas de *A. solani* não está de acordo com a

definição. Isso porque ela tem sido descrita em termos de variabilidade em caracteres morfológicos, fisiológicos e ecológicos *in vitro*.

Castro et al. (2000) avaliaram a variabilidade de *A. solani* a partir da inoculação de sete isolados em 14 genótipos de tomateiro e verificaram que todos os isolados diferiram entre si quanto à virulência, mostrando alta variabilidade entre os isolados coletados apenas em tomate.

Petrunak & Christ (1992) investigaram a variabilidade isoenzimática de 52 isolados de *A. solani* e 96 isolados de *A. alternata*, oriundos de diferentes locais nos EUA e hospedeiros. Estes autores encontraram 12 diferentes classes eletroforéticas entre os isolados, o que possibilitou verificar que a diferenciação enzimática ocorreu apenas por espécie, não havendo diferenciação clara dos isolados de acordo com o hospedeiro ou a origem geográfica.

Em estudo realizado por Weir et al. (1998), marcadores RAPD-PCR foram utilizados para medir o grau da variação genética entre isolados de *A. alternata* e *A. solani*, e para determinar se há correlação entre os perfis RAPD e a espécie de fungo, a planta hospedeira ou a origem geográfica. Foram coletados 35 isolados de *A. solani* de tomate ou de batata e 30 isolados de *A. alternata* de tomate, batata, tangerina e limão, em 18 locais diferentes. Cinco *primers* RAPD foram selecionados, sendo encontrados, no total, 26 padrões de bandas polimórficas e uma alta especificidade do padrão de bandas gerado e a espécie do fungo. A análise de agrupamento mostrou uma distinta separação entre as espécies. Dois subagrupamentos distintos, entre o grupo de *A. solani*, foram observados, correspondendo, aproximadamente, a planta hospedeira, tomate ou batata. Os três isolados de citrus de *A. alternata* analisados também formaram um subgrupo, entretanto, não houve um agrupamento aparente com base na origem geográfica. Da variação total encontrada, 66% corresponde à variação dentro da espécie.

Neste mesmo trabalho foi feita uma comparação entre as quatro

populações consideradas estrangeiras e as domésticas. A maior distância genética foi encontrada entre populações de diferentes espécies. As maiores distâncias genéticas foram encontradas entre isolados de diferentes espécies, tendo ocorrido uma tendência ao agrupamento por hospedeiros entre os isolados de *A. solani*, sugerindo a possibilidade de especialização patogênica com hospedeiros solanáceos.

Em outro trabalho, realizado por Martínez et al. (2002), a diversidade patogênica e genética foi analisada em isolados de Cuba e de outros países, entre estes, isolados do Brasil, coletados em Lavras, MG. Foram analisados 112 isolados *A. solani* de batata e de tomate e mais nove de *Alternaria* spp. e um de *Curvalina* sp. Um elevado nível de polimorfismo foi encontrado com o emprego dos marcadores AFLP. A análise de agrupamento das estimativas de similaridades genéticas apresentou dois grupos maiores; no grupo 1 ficaram todos os isolados de *A. solani* e, no outro, os demais isolados. O braço do grupo 1 foi consistentemente formado com 100% das 1.000 simulações *bootstrap*. Este grupo revelou um agrupamento por hospedeiro, ficando a maioria dos isolados de tomate coletados no subgrupo 1 e os de batata no subgrupo 2. Considerando os isolados de batata e de tomate como duas populações diferentes, a distância genética foi de 0,330. Uma especialização patogênica de *A. solani*, por hospedeiro, batata e tomate, ficou evidenciada, como já descrito por outros trabalhos.

Neste trabalho, quando os isolados foram analisados, considerando as populações de acordo com o hospedeiro e a origem geográfica, os resultados revelaram influência da origem geográfica na variabilidade genética entre as populações, sugerindo alta dispersão dos esporos do fungo e fraca seleção por hospedeiro dentro e entre populações.

Análise da estrutura populacional de *A. solani*, por meio marcadores moleculares associados a investigação do número de grupos de compatibilidade

micelial (GCM), tem sido utilizada, por fornecer informações mais completas (Meijer et al., 1994; Walls et al., 2004). A análise de 53 isolados de *A. solani* coletados em regiões produtoras de batata da África do Sul foram agrupados de acordo com a virulência, a compatibilidade vegetativa e os marcadores RAMS (Walls et al., 2004). A análise da virulência mostrou um moderado grau de variação, pois a maioria dos isolados não foi virulenta ou pouco virulenta. Como essa técnica é laboriosa e consome muito tempo, além de ser muito influenciada pelo ambiente e representar uma pequena fração dos genes do genoma do patógeno, os autores comentam que não foi a mais recomendada na avaliação da diversidade genética. Entretanto, grande variabilidade genética foi encontrada com o emprego de grupos de compatibilidade vegetativa e marcadores RAMS. Dos 53 isolados avaliados, 40 foram agrupados, em 6 grupos de compatibilidade vegetativa, com outros isolados. Os demais formaram grupos individuais. Os grupos formados não foram agrupados de acordo com a análise de virulência, marcadores RAMS ou origem geográfica. Com o emprego de marcadores RAMS, foi obtido um alto número de produtos de amplificação. A diversidade genética entre os 46 isolados foi de 0,27 e, no dendrograma formado, não houve tendência a agrupamentos, de acordo com a origem geográfica.

Segundo os autores, isso sugere que as várias subpopulações geográficas não estão geneticamente isoladas, o que pode ser devido à disseminação de esporos por fatores bióticos e abióticos. Os autores comentam que a variabilidade genética encontrada nas análises de compatibilidade vegetativa e RAMS, apesar de ser alta, não foi atípica para espécies que se reproduzem apenas assexuadamente. A provável causa podem ser as mutações naturais, associadas ao grande número de esporos produzidos em um curto período de tempo e, principalmente, a ocorrência do ciclo parassexual.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, Y.; WATANABE, H.; TSUGE, T. Relationships between genetic polymorphisms and fungicide resistance within *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v.86, p.1248–1254, 1996.

ARADHYA, M.K.; CHARN, H.M.; PARFITT, D.E. Genetic variability in the pistachio late blight fungus, *Alternaria alternata*. **Mycological Research**, v.105, p.300-306, 2001.

AZEVEDO, J.L. Genética de fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510p.

BARKSDALE, T.H. Resistance of tomato seedlings to early blight. **Phytopathology**, v.59, p.443–446, 1969.

BOCK, C.H.; THRALL, P.H.; BRUBAKER, C.L.; BURDON, J. Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprinting. **Mycological Research**, v.106, n.4, p.428-434, 2002.

BOCK, C.H.; THRALL, P.H.; BURDON, J.J. Genetic structure of populations of *Alternaria brassicicola* suggests the occurrence of sexual recombination. **Mycological Research**, v.109, n.2, p.227-236, 2005.

BONDE, R. Physiological strains of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v.19, p.533-548, 1929.

CASTRO, M.E.A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVEZ, G.M.; CRUZ, C.D.; MATSUOKA, K. Pathogenic variability of *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.24–28, 2000.

CATEN, C.E.; NEWTON, A.C. Variation in cultural characteristics, pathogenicity, vegetative compatibility and electrophoretic karyotype within field populations of *Stagonospora nodorum*. **Plant Pathology**, v.49, n.2, p.219-226, 2000.

CHAERANI, R.; VOORRIPS, R.E. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. **Journal Gen Plant Pathology**, v.72, p.335–347, 2006.

CHARTON, K.M. The sporulation of *Alternaria solani* in culture. **Trans. Br. Soc.**, v.36, p.349-355, 1953.

COTTY, P.J.; MISAGHI, I.J. Effect of light on the behavior of *Alternaria tagetica* in vitro and in vivo. **Phytopathology**, v.75, p.366-370, 1985.

DOUGLAS, D.R.; PAVEK, J.J. An efficient method of inducing sporulation of *Alternaria solani* in pure culture. **Phytopathology**, v.61, p.239, 1971.

ELENA, K.; PAPLOMATAS, E.J. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahlia* isolates from different hosts in Greece. **Plant Pathology**, v.47, p.635-640, 1998.

ELLERS, K.L.; BAXTERS, L.W. Induced conidial formation in *Alternaria zinniae* on media amended with Morestan. **Proc. American Phytopathology Soc.**, v.1, p.159, 1974. Abstract.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Egham: Commonwealth Mycological Institute, 1971.

FAHIM, M.M. The effect of light and other factors on the sporulation of *Alternaria porri*. **Transaction of the British Mycological Society**, v.49, p.73-78, 1986.

FANCELLI, M.I. **Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *A. solani* F. sp *lycopersici***. 1991. 80p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

GHERBAWY, Y.A.M.H. Genetic variation among isolates of *Alternaria* spp. From select Egyptian crops. **Archives of Phytopathology and Plant**, v.38, n.2, p.77-89, 2005.

GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; STRANI, P.; AGNOLUCCI, M.; RINAUDO, V.; AVIO, L. Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.616–624, 2003.

GLASS, N.L.; JACOBSE, D.; SHIU, P.K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 165-186, 2000.

GLASS, N.L.; KANEKO, I. Fatal attraction: no self recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. **Eukaryotic Cell**, v.2, n.1, p.1–8, 2003.

GLASS, N.L.; RAMUSSEN, C.; ROCA, M.G.; READ, N.D. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. **Trends Microbiology**, v.12, p.135-141, 2004.

HENNING, R.G.; ALEXANDRE, L.J. Evidence of existence of physiologic races of *Alternaria solani*. **Plant disease Rep.**, v.43, p.298-380, 1959.

HOOKER, W.J. **Compendium of potato diseases**. 3.ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1986. 125p.

HOTCHKISS, E.S.; BAXTER, L.W. Pathogenicity of *Alternaria tagetica* on targets. **Plant disease**, v.67, p.1288-1290, 1983.

JOHNSON, K.B.; TENG, P.S. Coupling a disease progress model for early blight to a model of potato growth. **Phytopathology**, v.80, p.416–425, 1990.

KERÉNYI, Z.; TÁBORHEGYI, É.; POMÁZI, A.; HORNOK, L. Variability amongst strains of *Fusarium poae* assessed by vegetative compatibility and RAPD polymorphism. **Plant Pathology**, v.46, n.6, p.882-889, 1997.

KOHN, L.M.; CARBONE, I.; ANDERSON, J.B. Mycelial interactions in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Experimental Mycology**, v.14, p.255-267, 1990.

KUCZYNSKA, J. Early blight of potato in some regions of Eastern Europe. In: CHELKOWSKI, J.; VISCONTI, A. **Alternaria: biology, plant disease and metabolites**. Amsterdam: Elsevier Science, 1992. 573p.

KWASNA, H. Ecology and nomenclature of *Alternaria*. In: CHELKOWSKI, J.; VISCONTI, A. **Alternaria: biology, plant disease and metabolites**. Amsterdam: Elsevier Science, 1992. 573p.

LESLIE, J.F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.127-150, 1993.

LESLIE, J.F.; ZELLER, K.A. Heterokaryon incompatibility in fungi – more than just another way to die. **Journal of Genetics**, v. 75, n. 3, p. 415-424, 1996.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory manual**. Malden, MA: Blackwell, 2006. 420p.

LOGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. p.47-88.

LUKENS, R.J. Conidial production from fitter paper cultures of *Helminthosporium vagas* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v.58, p.867-868, 1960.

MARTINEZ, B.; BERNAL, A.; PÉREZ, S.; MUNIS, Y. Variabilidad patogénica de aislamientos en *Alternaria solani* Sor. **Revista de Protección Vegetal**, v. 17, p. 45-53, 2002.

MARTINEZ, S.P.; SNOWDON, R.; KÜHNEMANN, J.P. Variability of Cuban and international of *Alternaria solani* from different host and localities: AFLP genetic analysis. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.399-409, 2004.

Mc CALLAN, S.E.; CHAN, S.Y. Inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. **Contrib. Boyce Thompson. Inst.**, v.13, p.323-355, 1944.

MCKAY, G. J.; BROWN, A.E.; BJOURSON, A.J.; MERCER, P.C. Molecular characterization of *Alternaria linicola* and its detection in linseed. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.157-166, 1999.

MEIJER, G.; MEGNEGNEAU, B.; LINDERS, E.G.A. Variability and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. **Mycological**, v.98, p.267-276, 1994.

- MICHEREFF, S.J.; NORONHA, M.A.; ROCHA Jr., O.M.; SILVA, J.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.6, p.656-663, 2003.
- MORRIS, P.F.; CONNOLLY, M.S.; CLAIR, A.ST. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs **Mycol. Res.**, v.104, n.3, p.286-292, 2000.
- NITZAN, N.; HAZANOVSKY, M.; TAL, M.; TSOR, L. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of black dot on potato. **Phytopathology**, v.92, n.8, p.827-832, 2002.
- PADHI, N.N.; RATH, G.R. Sporulation of *Alternaria solani* in pure culture. **Indian Phytopathology**, v.26, p. 495-501, 1974.
- PEEVER, T.L.; OLSEN, L.; IBANES, A.; TIMMER, L.W. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of Graperfruit and Tangarina x Grapefruit hybrids in Florida. **Phytopathology**, v.90, p.407-414, 1999.
- PELLETIER, J.R.; FRY, W.E. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: incubation period, lesion expansion rate, and spore production. **Phytopathology**, v.79, p.511-517, 1989.
- PETRUNAK, D.M.; CHRIST, B.J. Isozyme variability in *Alternaria solani* and *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v.82, p. 1343-1347, 1992.
- PINTO, C.A.B.P.; FARIA, C.A.; LAMBERT, E.S. Potato clones resistance to early and late blight. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, n.2, p.189-196, 2002.
- PRYOR, B.M.; MICHAILIDES, T.J. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of Pistachio. **Phytopathology**, v. 92, n.2, p.406-416, 2002.
- RANDS, R.D. The production of spores of *Alternaria solani* in pure culture. **Phytopathology**, v.7, p.316-317, 1917.
- ROBERTS, R.G.; REYMOND, S.T.; ANDERSEN, B. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spore *Alternaria* species and species groups. **Mycological. Res.** v.104, n.2, p.151-160, 2000.

- ROCA, M.M.G.; MACHADO, J.D.C.; VIEIRA, M.G.C.; DAVIDE, L.C.; ROCHA, M.L. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.1, p.16-20, 2004.
- RODRIGUES, T.T.M.S. **Produção *in vitro* de conídios infectivos de *Alternaria solani***. 2005. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2005.
- ROTEM, J. 1994. **The genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity**, APS-press, St. Paul, MN, USA.
- SAUPE, S.J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p. 489-502, 2000.
- SCHLEGEL, R.H.J. **Encyclopedic dictionary of plant breeding and related subjects**. New York: Food Product, 2003. p.320.
- SHAHIN, E.A.; SHEPARD, J.F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. **Phytopathology**, v.69, p. 618-620, 1979.
- SHARMA, T.R.T.; TEWARI, J.P. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. **Mycological Research**, v.102, p.807-814, 1998.
- SIMMONS, E.G. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: CHELKOWSKI, J.; VISCONTI, A. ***Alternaria*: biology, plant disease and metabolites**. Amsterdam: Elsevier Science, 1992. 573p.
- SIMMONS, E.G. *Alternaria* themes and variations (244–286), species on solanaceous. **Mycotaxon**, v.125, p.1–115, 2000.
- STEVENSON, W.R. The potential impact of field resistance to early blight on fungicide inputs. **American Potato Journal**, v.71, n.5, p.317-324. 1994.
- STRANDBERG, J.O. Isolation, storage, and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. **Phytopathology**, v.77, p. 1008-1012, 1987.
- STRANDBERG, J.O. *Alternaria* species that attack vegetable crops: biology and options for disease management: In: CHELKOWSKI, J.; VISCONTI, A. ***Alternaria* biology, plant disease and metabolites**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.175–208.

STRIDER, D.L. *Alternaria* blight of carnation in the greenhouse and its control. **Plant Disease**, v.62, p.24-28, 1978.

THIRTHAMALLAPPA, L.; LOHITHASWA, H.C. Genetics of resistance to early blight (*Alternaria solani* Sorauer) in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Euphytica**, v.113, p.187–193, 2000.

TOFOLI, J.G. **Pinta preta** – uma ameaça constante aos cultivos da batata e do tomate. APTA – Instituto Biológico. (Cultivar Hortaliças e Frutas). 2004. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com>>. Acesso em: 10 jul. 2007.

TOKESHI, H.; BERGAMIN, F.A. Doenças da batata. In: GALLI, F. **Manual de fitopatologia**. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres 1980. Cap.9, v.2, p.102-120.

TSROR, L.; HAZANOVSKY, M.; MORDECHI-LEBIUSH, S.; SIVAN, S. Aggressiveness of *Verticillium dahliae* isolates from different vegetative compatibility groups to potato and tomato. **Plant Pathology**, v.50, p.477-482, 2001.

VEGA, M.P.; DÚRAN, Y. Assessment of genetic variation and species relationships in a collection of "Lens" using RAPD and ISSR. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.971, n.4, p.538-544, 2004.

VERMA, P.R.; SAHRAN, G.S. **Monograph on alternaria disease of crucifers**. Saskatoon: Minister of Supply and Services Canada, 1994.

WAALS, J.E. VAN der; KORSTEN, L.; SLIPPERS, B. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. **Plant Disease**, v.88, p.959–964, 2004.

WEIR, T.L.; HUFF, D.R.; CHRIST, B.J. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. **Mycological**, v.90, p.813-821, 1998.

CAPÍTULO 2

VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE *ALTERNARIA SOLANI*

1 RESUMO

OLIVEIRA, Marciane da Silva. **Variabilidade morfológica e fisiológica de isolados de *Alternaria solani***. In: _____. **Diversidade entre isolados de *Alternaria solani***: avaliação morfológica, fisiológica e molecular. 2007. Cap.2, p.27-45 Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG:

Alternaria solani é um dos principais patógenos de solanáceas do Brasil, e apresenta ampla variabilidade genética. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de isolados de *A. solani* provenientes de lavouras de batata e tomate do Brasil quanto à morfologia e fisiologia. Foram avaliados 39 isolados e as seguintes características foram mensuradas: diâmetro da colônia (DC), índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), e a taxa de esporulação (TE). Todas as características avaliadas apresentaram ampla variabilidade. Quanto à avaliação do crescimento micelial foi observada a ocorrência da interação isolados x tempo indicando que o crescimento dos isolados não foi coincidente ao longo dos dias, no entanto, os isolados apresentaram uma relação linear entre o crescimento da colônia e o tempo de avaliação. O IVCM foi um bom indicador da variabilidade quanto ao crescimento micelial. Quanto à taxa de esporulação, todos os isolados apresentaram taxas de esporulação estatisticamente diferentes, formando quatro grupos pelo teste Scott & Knott. Não foi constatada correlação entre as características IVCM e a taxa de esporulação. Os resultados obtidos indicam que os isolados de *A. solani* possuem ampla variabilidade para as características avaliadas. Não foi observada correlação das características avaliadas com a procedência dos isolados. Contudo, apesar das características utilizadas permitirem diferenciar os isolados, há necessidade de avaliar a correlação dessas características com as características epidemiológicas dos isolados, para que sejam diferenciados quanto a sua patogenicidade.

Orientadora: Elaine Aparecida de Souza - UFLA/DBI.

2 ABSTRACT

Oliveira, Marciane da Silva. **Morphological and Physiological Variability of Isolates of *Alternaria solani***. In: _____. **Diversity among isolates of *Alternaria solani***: morphological, physiological and molecular evaluations 2007. Cap2. p. 27-45. Thesis (Doctorate in Genetics and Plants Breeding) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Alternaria solani it is one of the principal pathogens of solanaceous crops of Brazil, and it presents wide genetic variability. The objective of this work was to evaluate the diversity of *A. solani* isolated approaching of potato and tomato farming of Brazil as the morphology and physiologic characters. 39 isolated were appraised and the following characteristics were mansards: diameter of the colony (dc), index of velocity of growth mycelial (ivgm), and the sporulation capacity (ec). All the appraised characteristics presented wide variability. With relationship to the evaluation of the growth mycelial the occurrence of the interaction was observed isolated x time indicating that the growth of the isolated was not coincident along the days, however, the isolated ones presented a lineal relationship between the growth of the colony and the time of evaluation. Ivgm was a good indicator of the variability with relationship to the growth mycelial. With relationship to the sporulation capacity, all the isolated presented rates of sporulation different statistically, forming four groups for the Scott & knott test. Correlation was not verified among the characteristics ivgm and sporulation capacity. The obtained results indicate that the isolated of *A. solani* possess wide variability for the appraised characteristics. Considering the origin of the isolated ones, correlation was not observed with the appraised characteristics. However, the used characteristics allow differentiating the isolated ones. Though, there is the need to evaluate the correlation of those characteristics with the epidemic characteristics of the isolated ones, so that the isolated ones are differentiated with relationship your pathogenicity.

* Advisor: Elaine Aparecida de Souza - UFLA/DBI.

3 INTRODUÇÃO

No gênero *Alternaria*, a espécie *A. solani* é uma das mais conhecidas e expressivas, economicamente, por causar danos em espécies da família *Solanaceae* nas diversas regiões de cultivo, principalmente em regiões de clima tropical. A ocorrência de epidemias dessa doença está associada a temperaturas de 25° a 30°C e elevada umidade (Tofoli, 2004). No Brasil, a pinta-preta representa uma das mais importantes e freqüentes doenças fúngicas nas culturas da batata e do tomate.

Embora *A. solani* apresente somente a fase assexual, tem sido observada ampla variabilidade nos isolados quanto à sua morfologia, fisiologia e patogenicidade, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Bonde 1929; Henning & Alexander 1959; Hooker, 1986; Weir et al., 1998; Martinez et al., 2004; Waals et al. 2004). As características morfológicas das colônias, tais como velocidade de crescimento e coloração, podem ser utilizadas para separar grupos de isolados, indicando a ocorrência de variabilidade fenotípica dentro da espécie. Entretanto, para *Alternaria solani*, poucos trabalhos foram realizados. Nos trabalhos encontrados, as colônias de *A. solani* são descritas como espalhadas, algodonosas, com a cor variando de marrom-escura à preta e alguns isolados produzem um pigmento vermelho-amarelado em meio de cultura. Observam-se, ainda, diferenças na produção de esporos, pigmentação em BDA (cromogenicidade), tempo de crescimento e a aparência do micélio na cultura (Bonde, 1929; Hooker, 1986).

Devido à baixa esporulação de *A. solani* no cultivo *in vitro*, vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar meios de cultura e condições de cultivo. Diversas metodologias para esporulação já foram utilizadas, tais como indução por luz ultravioleta (McCallan & Chan, 1944,

Charton, 1953), luz fluorescente (Charton, 1953; Lukens, 1960), iluminação solar (Rands, 1917, McCallan & Chan, 1944; Padhi & Rath, 1974), fermentos no micélio (Charton, 1953; Douglas & Pavek, 1971), meio desidratado (McCallan & Chan, 1944, Charton, 1953) ou utilizando aditivos químicos (McCallan & Chan, 1944; Ellers & Baxters, 1974) ou até mesmo, com a transferência dos isolados para um meio de cultura contendo CaCO₃ (Shahin & Shepard, 1979). Porém, nenhuma dessas metodologias permitiu esporulação suficiente para inoculação em um grande número de plantas. Eficiente esporulação foi induzida expondo-se os isolados à luz diurna, com as placas parcialmente abertas, depois da remoção de micélios aéreos (Barksdale 1969). Recentemente, foi proposta uma metodologia de esporulação por Rodrigues (2005), em que os isolados crescem em meio V8 líquido com agitação. Posteriormente, os isolados são transferidos para o meio BDA e mantidos sob o regime de luz negra, com fotoperíodo de 12 horas, por 72 horas. Esta metodologia permitiu a produção de boa quantidade de esporos e mostrou ser de fácil execução.

A taxa de esporulação é uma característica importante não só na análise da diversidade dos isolados, mas também na avaliação da severidade da doença. Pelletier & Fry (1989) e Johnson & Teng (1990) observaram correlação linear entre a taxa de esporulação e o tamanho da lesão.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a diversidade de isolados de *A. solani* por meio de marcadores morfológicos e fisiológica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e manutenção dos isolados

Folhas com lesões características da pinta-preta foram coletadas, durante a safra de 2005, em regiões produtoras de batata e de tomate de Minas Gerais (MG), Goiás (GO), Espírito Santo (ES) e Distrito Federal (DF) (Tabela 1). Os isolados foram obtidos a partir do isolamento de um único conídio de cada lesão e crescidos em BDA, na BOD (incubadora de crescimento), com controle de temperatura de 25°C, no escuro. Os isolados foram armazenados na coleção do Laboratório de Resistência de Plantas, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.2 Avaliação dos caracteres morfológicos

4.2.1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

Isolados de *A. solani* foram colocados para crescer em meio BDA, com fotoperíodo de doze horas, a 25°C, em BOD (câmara de crescimento). O crescimento micelial foi mensurado a cada 72 horas (Nechet 1999), durante 15 dias, a partir do momento da inoculação, utilizando-se duas repetições (placas) por isolado. O índice de velocidade de crescimento micelial foi calculado utilizando-se a fórmula adaptada de Oliveira (1991):

$$IVCM = \sum [(D - D_a) / N]$$

sendo:

IVCM=índice de velocidade de crescimento micelial

D=diâmetro médio da colônia

TABELA 1 Indicação da espécie e ou cultivar (ou clone) hospedeira e origem dos isolados avaliados nos estudos de *Alternaria solani*.

Nº	Isolado	Hospedeiro	Procedência
1	UFLA 1	batata/clones	Ijaci, MG
2	UFLA 2	batata/clones	Ijaci, MG
3	UFLA 3	batata/clones	Ijaci, MG
4	UFLA 4	batata/clones	Ijaci, MG
5	UFLA 5	batata/clones	Ijaci, MG
6	UFLA 6	batata/clones	Ijaci, MG
7	UFLA 7	batata/clones	Ijaci, MG
8	UFLA 12	batata/clones	Carrancas, MG
9	UFLA 13	batata/clones	Carrancas, MG
10	UFLA 14	batata/clones	Carrancas, MG
11	UFLA 18	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
12	UFLA 19	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
13	UFLA 20	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
14	UFLA 21	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
15	UFLA 22	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
16	UFLA 23	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
17	UFLA 24	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
18	UFLA 25	batata/Achat	Embrapa Hortaliças DF
19	UFLA 26	batata/Achat	Embrapa Hortaliças DF
20	UFLA 27	batata/clone 118-08	Embrapa Hortaliças DF
21	UFLA 28	batata/clone 118-08	Embrapa Hortaliças DF
22	UFLA 29	batata/Monalisa	Embrapa Hortaliças DF
23	UFLA 30	batata/Monalisa	Embrapa Hortaliças DF
24	UFLA 31	batata/clone 118-08	Embrapa Hortaliças DF
25	UFLA 32	batata/clone 118-08	Embrapa Hortaliças DF
26	UFLA 33	batata/Delta	Embrapa Hortaliças DF
27	UFLA 34	batata/Delta	Embrapa Hortaliças DF
28	UFLA 51	tomate	Lavras, MG
29	UFLA 52	tomate	Lavras, MG
30	UFLA 53	tomate	Lavras, MG
31	UFLA 54	tomate	Lavras, MG
32	UFLA 55	batata/Ágata	Cristalina, GO
33	UFLA 56	batata/Ágata	Cristalina, GO
34	UFLA 57	batata/Monalisa	São João da Mata, MG
35	UFLA 58	batata/Monalisa	São João da Mata, MG
36	UFLA 59	batata/Monalisa	São João da Mata, MG
37	UFLA 60	batata/Monalisa	São João da Mata, MG
38	UFLA 61	batata	Espírito Santo
39	UFLA 62	batata	Espírito Santo

Da=diâmetro médio da colônia do dia anterior

N=número de dias após a inoculação

4.2.2 Diâmetro colonial

Os diâmetros das colônias foram medidos, a cada 72 horas, por um período de 15 dias. Foram avaliadas duas placas por isolados.

4.2.3 Taxa de esporulação

Foi utilizada a metodologia proposta por Rodrigues (2005) com modificações, em que dois discos de cada isolado foram colocados para crescer em meio líquido V8, em agitação de 110 rpm, a $25\pm 2^\circ\text{C}$ no escuro, por sete dias. Em seguida, foi feita a homogeneização da solução com os micélios, com o auxílio de um misturador, sendo transferidos 10 mL desta solução para uma placa de Petri com 15 mL de meio BDA. Para cada isolado foram mantidas três placas abertas em BOD com luz negra, com fotoperíodo de 12 horas, a $25\pm 2^\circ\text{C}$ por, aproximadamente, 70 horas. Após a incubação, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada, com 0,01% de Tween 20. A superfície da colônia foi escovada com pincel para remover os conídios e obter a suspensão.

Para a quantificação da concentração de conídios, uma gota de 10 μl foi colocada sobre a câmara de Newbayer e a contagem dos conídios foi feita em microscópio ótico. O número de conídios. ml^{-1} foi determinado considerando-se o fator de diluição. O experimento foi realizado com três repetições.

4.2.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos relativos a índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), diâmetro da colônia (DIM) e intensidade de esporulação (ESP) foram analisados em DIC (delineamento inteiramente casualizado). O crescimento micelial foi avaliado em DIC, com parcelas subdivididas no tempo. Foi realizada análise de regressão do crescimento das colônias em função do tempo em dias. As médias de todas as variáveis analisadas foram comparadas pelo teste de Scott & Knott

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados diferiram estatisticamente quanto ao diâmetro das colônias nos diferentes dias e as estimativas dos coeficientes de variação (CV%) variaram de 7,5%, aos três dias a 1,9%, aos 15 dias e 1,7% para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), o que demonstra uma boa precisão ambiental. Pela avaliação do crescimento micelial, as interações isolados x tempo foram significativas ($P \geq 0,01$), indicando que o crescimento dos isolados não foi coincidente ao longo dos dias. As correlações entre o diâmetro das colônias em cada um dos diferentes dias com os resultados do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foram estatisticamente significativas ($P \geq 0,01$), sendo obtida classificação similar dos isolados, tanto pelo diâmetro das colônias nos diferentes dias quanto o IVCM. Portanto, o IVCM é um bom indicador da variabilidade quanto ao crescimento. Essa correlação pode ser exemplificada pelo comportamento do isolado UFLA21, coletado em Paraguaçu, MG, pois foi o que apresentou maior IVCM e sempre esteve no grupo daqueles com maior diâmetro, em todas as medições (Tabela 2).

Como o crescimento micelial é um caráter que pode ser utilizado para diferenciar isolados de *A. solani* (Bonde 1929) e pela boa correlação entre o diâmetro das colônias nos diferentes dias e o IVCM, como demonstrado, foi realizada a comparação entre as médias IVCM, pelo teste de Scott & Knott, que proporcionou a formação de onze grupos diferentes estatisticamente (Tabela 2). Desses grupos, o grupo a, que apresentou maior IVCM, foi formado apenas pelo isolado UFLA21, coletado em Paraguaçu, MG e o grupo k, com menor IVCM, foi formado pelos isolados UFLA14 coletado em Carrancas, MG (isolados de batata), e UFLA52, coletado em Lavras, MG (isolado de tomate). Apesar de alguns isolados, como os coletados em Carrancas, MG, encontrarem-se nos

grupos com menor IVCM, de maneira geral não foi observada a formação dos grupos quanto ao IVCM de acordo com o local de coleta. Quanto ao diâmetro das colônias medido nos diferentes dias, os isolados apresentaram relação linear entre o crescimento da colônia e o tempo, nos 15 dias de avaliação (Figura 1). Esse mesmo comportamento foi observado em *Colletotrichum lindemuthianum*, quando avaliado o diâmetro das colônias por doze dias (Souza et al., 2007).

Pelas equações de regressão podemos observar que tanto o valor da constante a, como, o valor de b sofreram alterações, sendo que, as equações de regressão dos isolados com menores índices de crescimento micelial apresentaram estes valores de a e b menores. De acordo com as equações de regressão o isolado UFLA21 é o que apresentou maior índices de crescimento e o isolado UFLA52 o que apresentou menor índices de crescimento, entretanto, apesar das variações nas equações de regressão, para todos os isolados o crescimento do isolado foi linear (Figura 1).

Pelas comparações entre as médias de diâmetro da colônia, com três, seis, nove, doze e quinze dias após a inoculação, realizadas pelo teste de Scott & Knott (Tabela 1A), nota-se que, com nove dias de crescimento *in vitro*, há a formação de um maior número de grupos de médias similares. Isso indica que, nesta época, a maior divergência no crescimento dos isolados ocorre aos nove dias de crescimento. Comparando-se a contribuição para as interações isolados x tempos de cada um dos isolados (Tabela 1A), pode-se observar que os isolados que mais contribuíram para a interação foram UFLA3, UFLA2 e UFLA4, todos coletados em Ijaci, MG, indicando que, em cada época de avaliação, eles se comportaram de maneira diferente. Portanto, a diversidade no crescimento micelial pode ocorrer entre isolados de uma mesma procedência, indicando que a variabilidade para o caráter avaliado poderá ser elevada tanto entre quanto dentre as populações de isolados coletados em diferentes locais.

TABELA 2 Médias para a esporulação e índice de velocidade de crescimento micelial dos isolados avaliados.

isolados	IVCM* (cm/dia)	Procedência	isolados	Esporu- lação (10 ³)*	Procedência
UFLA21	1,80 a	Paraguaçu, MG	UFLA 55	8,25 a	Paraguaçu, MG
UFLA27	1,74 b	Embrapa Hort.DF	UFLA 60	8,00 a	Embrapa Hort. DF
UFLA05	1,72 b	Ijaci, MG	UFLA 02	7,75 a	Lavras, MG
UFLA04	1,71 b	Ijaci, MG	UFLA 31	7,75 a	S. J. da Mata, MG
UFLA22	1,63 c	Paraguaçu, MG	UFLA 26	7,00 a	Paraguaçu, MG
UFLA06	1,62 c	Ijaci, MG	UFLA 23	6,75 a	Ijaci, MG
UFLA23	1,62 c	Paraguaçu, MG	UFLA 07	6,75 a	Carrancas, MG
UFLA25	1,62 c	Embrapa Hort DF	UFLA 22	6,50 a	Ijaci, MG
UFLA01	1,57 d	Ijaci, MG	UFLA 32	6,25 b	Paraguaçu, MG
UFLA07	1,57 d	Ijaci, MG	UFLA 51	6,25 b	Embrapa Hort. DF
UFLA28	1,55 d	Embrapa Hort. DF	UFLA 61	6,25 b	Embrapa Hort. DF
UFLA62	1,55 d	Espírito Santo	UFLA 62	6,00 b	Paraguaçu, MG
UFLA29	1,53 d	Embrapa Hort.DF	UFLA 21	5,75 b	Ijaci, MG
UFLA26	1,50 e	Embrapa Hort. DF	UFLA 20	5,75 b	Cristalina, GO
UFLA32	1,50 e	Embrapa Hort. DF	UFLA 27	5,50 b	Ijaci, MG
UFLA24	1,48 e	Paraguaçu, MG	UFLA 01	5,50 b	Carrancas, MG
UFLA55	1,48 e	Cristalina, GO	UFLA 56	5,50 b	Embrapa Hort. DF
UFLA18	1,47 e	Paraguaçu, MG	UFLA 30	5,50 b	Lavras, MG
UFLA51	1,45 e	Lavras, MG	UFLA 52	5,50 b	Espírito Santo
UFLA58	1,41 f	S. J. da Mata, MG	UFLA 28	5,25 b	Paraguaçu, MG
UFLA61	1,41 f	Espírito Santo	UFLA 29	5,25 b	Paraguaçu, MG
UFLA60	1,40 f	S. J. da Mata, MG	UFLA 25	5,00 b	Ijaci, MG
UFLA54	1,39 f	Lavras, MG	UFLA 06	5,00 b	Carrancas, MG
UFLA19	1,36 g	Paraguaçu, MG	UFLA 59	5,00 b	Embrapa Hort. DF
UFLA56	1,35 g	Cristalina, GO	UFLA 34	5,00 b	S. J. da Mata, MG
UFLA59	1,35 g	S. J. da Mata, MG	UFLA 54	4,75 c	Embrapa Hort. DF
UFLA03	1,33 g	Ijaci, MG	UFLA 03	4,75 c	Embrapa Hort. DF
UFLA02	1,31 h	Ijaci, MG	UFLA 57	4,75 c	Lavras, MG
UFLA30	1,29 h	Embrapa Hort.DF	UFLA 04	4,50 c	Ijaci, MG
UFLA33	1,28 h	Embrapa Hort. DF	UFLA 05	4,25 c	Ijaci, MG
UFLA13	1,27 h	Carrancas, MG	UFLA 19	4,25 c	Embrapa Hort. DF
UFLA57	1,27 h	S. J. da Mata, MG	UFLA 53	4,25 c	S. J. da Mata, MG
UFLA20	1,25 i	Paraguaçu, MG	UFLA 24	3,75 c	Paraguaçu, MG
UFLA34	1,23 i	Embrapa Hort./DF	UFLA 18	3,75 c	Embrapa Hort. DF
UFLA12	1,22 i	Carrancas, MG	UFLA 58	3,75 c	Embrapa Hort. DF
UFLA31	1,18 j	Embrapa Hort. DF	UFLA 14	3,75 c	Espírito Santo
UFLA53	1,16 j	Lavras, MG	UFLA 33	3,25 c	Lavras, MG
UFLA14	1,01 k	Carrancas, MG	UFLA 12	0,50 d	S. J. da Mata, MG
UFLA52	1,00 k	Lavras, MG	UFLA 13	0,25 d	Cristalina, GO

*médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5%.

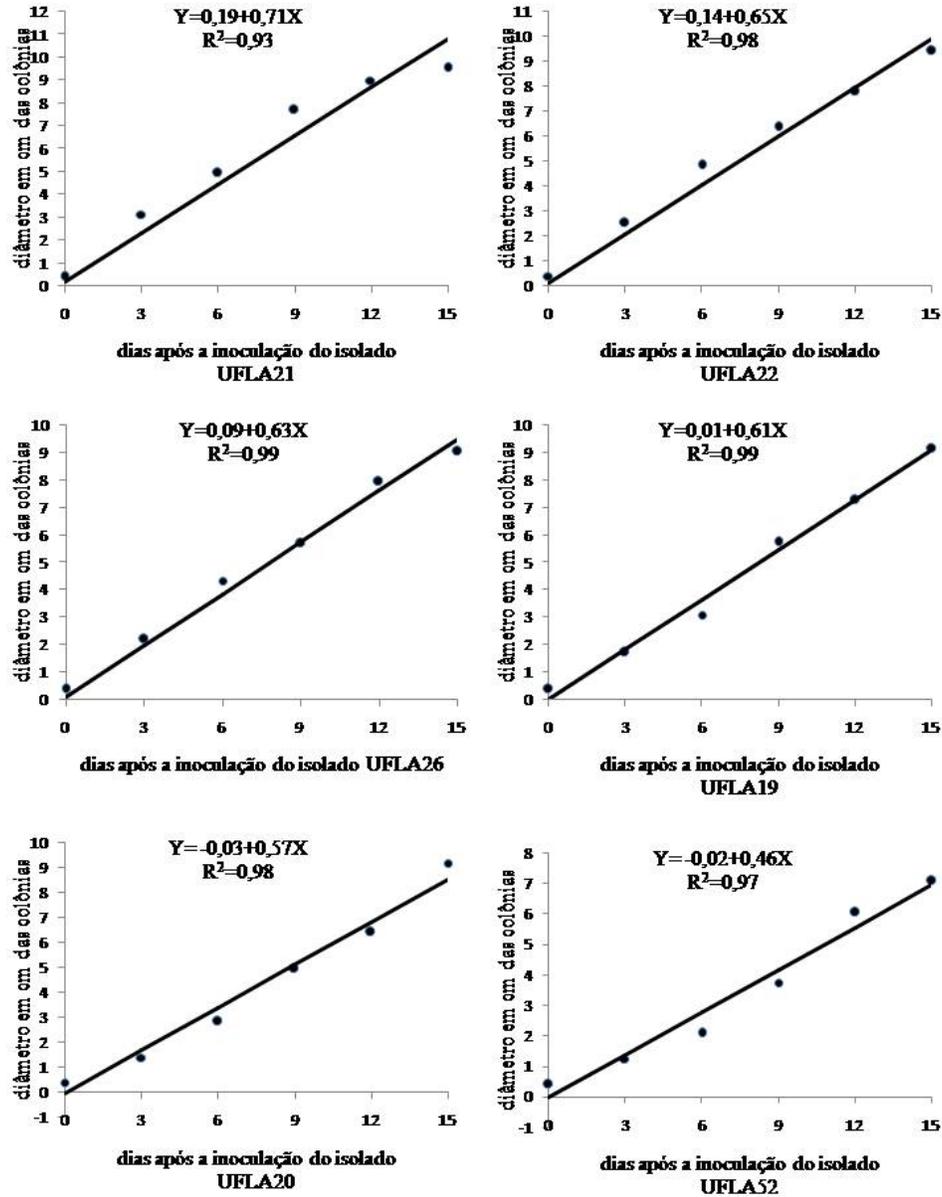


FIGURA1 Equação e gráficos de regressão para o crescimento micelial de alguns isolados de *Alternaria solani* representativos de cada grupo.

Diferenças nas intensidades de crescimento micelial também foram observados entre isolados de *A. brassicicola* (Michereff et al., 2003) e entre isolados de diferentes espécies de *Alternaria*, patogênicas de *Senna obtusifolia* (Mello et al., 2001). Diversos trabalhos demonstraram que as características morfológicas das colônias podem ser usadas para separar grupos de isolados, indicando a ocorrência de variabilidade fenotípica dentro da espécie. Entretanto, poucos estudos com *Alternaria solani* foram realizados. Um deles foi realizado por Bonde (1929) que observou que isolados de tubérculos de batata podem ser diferenciados com base na produção de esporos, pigmentação em BDA, tempo de crescimento e aparência do micélio na cultura. Entretanto, a importância do presente estudo está em comprovar que isolados de *A. solani* coletados de diferentes regiões podem ser diferenciados quanto ao crescimento micelial, apesar da formação dos grupos não corresponder à origem geográfica.

Com uma espécie relacionada, *A. brassicicola*, as características fisiológicas do patógeno, como intensidade de crescimento micelial, esporulação, germinação de conídios e sensibilidade ao fungicida iprodione, foram usadas como ferramentas para estimar a variabilidade dos isolados coletados de cultivos comerciais de crucíferas do estado de Pernambuco. Foi observada grande variabilidade entre os isolados, com base nas características avaliadas (Michereff et al., 2003). Estes resultados corroboram análises realizadas pelo emprego de marcadores moleculares RAPD (Verma & Saharam, 1994; Sharma & Tewari, 1998). Neste sentido, para uma melhor diferenciação dos isolados e obter resultados mais fidedignos, foi medida a intensidade de esporulação desses isolados.

Todos os isolados apresentaram taxas de esporulação que diferiram estatisticamente ($P \geq 0,05$). O coeficiente de variação (13,95%) para este caráter foi um pouco elevado, provavelmente devido a diferenças na intensidade de luz negra sobre as placas. Ao ser empregado o teste de Scott & Knot, foi possível

observar a formação de quatro grupos diferentes estatisticamente ($P \geq 0,01$) (Tabela 2). Os isolados UFLA55 e UFLA26, coletados em Paraguaçu, MG; UFLA60, coletado na Embrapa Hortaliças/DF; UFLA02, coletado em Lavras, MG; UFLA31, coletado em São João da Mata, MG; UFLA26 e UFLA23, coletados em Ijaci, MG e UFLA07, coletado em Carrancas, MG, foram os que apresentaram maiores intensidades de esporulação. Os isolados UFLA13, coletado em São João da Mata, MG e UFLA12, de Cristalina, GO, os que tiveram as menores intensidades de esporulação. Essas diferentes intensidades de esporulação também foram observadas por Rodrigues (2005), ao testar e propor o protocolo utilizado para esporulação. Entretanto, não ocorreu a formação de grupos de acordo com a origem geográfica.

A partir das características morfológicas das colônias e da intensidade de esporulação de isolados de *Alternaria* de pistache, foram formados grupos idênticos ou muito similares, de acordo com as espécies, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, ou *A. infectoria* (Pryor & Michailides, 2002), indicando que essas características formam grupos divergentes. Entretanto, como observado por Michereff et al. (2003), no presente trabalho também não foi constatada correlação entre as características IVCN e taxa de esporulação, o que pode ser devido à hipótese de que essas características podem ser controladas por diferentes genes.

6 CONCLUSÕES

Os isolados de *A. solani* apresentaram ampla variabilidade tanto para índice de crescimento micelial quanto para a taxa de esporulação.

Não houve correlação entre o índice de crescimento micelial e a taxa de esporulação dos isolados.

Não houve correlação das características avaliadas com a procedência dos isolado.

As características utilizadas permitiram diferenciar os isolados. Entretanto, há necessidade de avaliar a correlação dessas características com as características epidemiológicas dos isolados, para que sejam diferenciados quanto a sua patogenicidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARKSDALE, T.H. Resistance of tomato seedlings to early blight. **Phytopathology**, v.59, p.443–446, 1969.
- BONDE, R. Physiological strains of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v.19, p.533-548., 1929.
- CHARTON, K.M. The sporulation of *Alternaria solani* in culture. **Trans. Br. Soc.**, v.36, p.349-355, 1953.
- DOUGLAS, D.R.; PAVEK, J.J. An efficient method of inducing sporulation of *Alternaria solani* in pure culture. **Phytopathology**. v.61, p.239, 1971.
- ELLERS, K.L.; BAXTERS, L.W. Induced conidial formation in *Alternaria zinniae* on media amended with Morestan. **Proc. Am. Phytopathology. Sociedade**, v.1, p.159, 1974. Abstract.
- HENNING, R.G.; ALEXANDRE, L.J. Evidence of existence of physiologic races of *Alternaria solani*. **Plant disease Rep.**, v.43, p.298-380, 1959.
- HOOKER, W.J. Early blight. In: COMPEDIUM of Potato Diseases. 3.ed. 1986. 125p.
- JOHNSON, K.B.; TENG, P.S. Coupling a disease progress model for early blight to a model of potato growth. **Phytopathology**, v.80, p.416–425, 1990.
- LUKENS, R.J. Conidial production from filter paper cultures of *Helminthosporium vagas* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v.58, p.867-868, 1960.
- MARTINEZ, S.P.; SNOWDON, R.; KÜHNEMANN, J.P. Variability of Cuban and international of *Alternaria solani* from different host and localities: AFLP genetic analysis. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.399-409, 2004.
- Mc CALLAN, S.E.; CHAN, S.Y. Inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. **Contrib. Boyce Thompson. Inst.**, v.13, p.323-355, 1944.

MELO, S.C.M.; RIBEIRO, Z.M.A.; SOUSA, G.R.; TIGANO, M.; NACHTIGAL, G.F.N.; FONTES, E.M. Padrões isoenzimáticos e morfologia de isolados de *Alternaria* spp. Patogênicos a *Senna obtusifolia*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.3, p.667-669, 2001.

MICHEREFF, S.J.; NORONHA, M.A.; ROCHA Jr., O.M.; SILVA, J.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.6, p.656-663, 2003.

NECHET, K.L. **Caracterização biológica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum* sp. em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 73p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PADHI, N.N.; RATH, G.R. Sporulation of *Alternaria solani* in pure culture. **Indian Phytopathology**, v.26, p. 495-501, 1974.

PELLETIER, JR.; FRY, WE. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: incubation period, lesion expansion rate, and spore production. **Phytopathology**, v.79, p.511–517, 1989.

PRYOR, B.M.; MICHAILIDES, T.J. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of Pistachio. **Phytopathology**, v. 92, n.2, p. 406-416, 2002.

RANDS, R.D. The production of spores of *Alternaria solani* in pure culture. **Phytopathology**, v.7, p.316-317, 1917.

ROCHA, M.L.M. Compatibilidade sexual e vegetative do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.1, p.16-20, 2004.

RODRIGUES, T.T.M.S. **Produção *in vitro* de conídios infectivos de *Alternaria solani***. 2005. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SHAHIN, E.A.; SHEPARD, J.F. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. **Phytopathology**, v.69, p. 618-620, 1979.
SHARMA, T.R.T.; TEWARI, J.P. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. **Mycological Research**, v.102, p.807-814, 1998.

SOUZA, B.O.; SOUZA, E.A.; MENDES-COSTA, M.C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum Lindemuthianum* por meio de marcadores Morfológicos e culturais Ciênc. agrotecnica., Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, jul./ago., 2007

TOFOLI, J.G. **Pinta-preta** – uma ameaça constante aos cultivos da batata e do tomate. APTA – Instituto biológico. (Cultivar Hortaliças e Frutas). 2004.
Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com>>. Acesso em: 10 jul. 2007.

VERMA P.R.; SAHRAN G.S. **Monograph on alternaria disease of crucifers**. Saskatoon. Minister of Supply and Services Canada, 1994.

WAALS, J.E. VAN der; KORSTEN, L.; SLIPPERS, B. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. **Plant Disease**, v.88, p.959–964, 2004.

WEIR, T.L.; HUFF, D.R.; CHRIST, B.J. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. **Mycological**, v.90, p.813-821, 1998.

CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE *ALTERNARIA* *SOLANI*

1 RESUMO

OLIVEIRA, Marciane da Silva. Diversidade genética entre isolados de *Alternaria solani*. In: _____. **Diversidade entre isolados de *Alternaria solani***: avaliação morfológica, fisiológica e molecular. 2007. Cap.3, p.46-80. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A pinta preta, causada pelo fungo *Alternaria solani*, é uma das doenças mais importantes em solanáceas no Brasil. O desenvolvimento de estratégias para controle da doença requer um conhecimento prévio da variabilidade genética do patógeno. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a diversidade genética entre isolados de *A. solani* coletados em regiões de produção de batata e tomate. Foram avaliados 60 isolados de *A. solani*, os quais foram caracterizados por meios de marcadores ISSR e a diferenciação em grupos de compatibilidade micelial (GCM). Todos os isolados evidenciaram a sua capacidade de serem compatíveis micelialmente com os demais. As estimativas de similaridade genética, obtidas pelo coeficiente de Russel e Rao, entre os pares de isolados para a compatibilidade micelial variaram de 0,02 a 0,73, com média de 0,23. Foi observada a formação de 36 grupos, sendo que, apenas três grupos foram formados por isolados que apresentaram o mesmo comportamento quanto à compatibilidade micelial (GCM). A partir de 18 *primers* ISSR foram obtidas 85 bandas polimórficas. As estimativas de similaridade genética, obtidas pelo coeficiente de Nei e Li, entre os isolados variaram de 0,14 a 0,97, com média 0,58. A partir análise de agrupamento, pelo método UPGMA, foram formados cinco grupos contendo apenas dois isolados, um grupo com três isolados e dois grupos com mais de 15 isolados. Dez isolados formaram grupos individuais. Em geral, não houve tendência de formação de grupos por hospedeiro, como observado pela análise dos dados de GCM. Apesar da ampla variabilidade detectada por ambas as análises de GCM e marcadores ISSR, esta não foi atípica para espécies de fungos de reprodução assexual.

*Orientadora: Elaine Aparecida de Souza.

2 ABSTRACT

Oliveira, Marciane da Silva. **Genetic diversity among isolates of *Alternaria solani***. In: _____. **Diversity among isolates of *Alternaria solani*: morphological, physiological and molecular evaluations 2007**. Cap3. p. 46-80. Thesis (Doctorate in Genetics and Plants Breeding) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Early blight caused by the fungus *Alternaria solani*, is one of the most important diseases in solanaceous in Brazil. Development of strategies to control this disease requires a previous knowledge of the genetic variability of the pathogen. The objective of this study was to investigate the genetic diversity among isolates of *A. solani* collected in areas of potato and tomato production. Sixty isolates of *A. solani* were appraised, which were characterized by means of ISSR markers and differentiation in mycelial compatibility groups (MCG). All isolates presented mycelial compatibility with the others. The estimates of genetic similarity by the coefficient of Russeo and Rao, among pairs of isolates for the compatibility mycelial varied from 0.02 to 0.73, with 0.23 average. The formation of 36 groups was observed, and, only three groups were formed by isolates that presented the same behavior concerning mycelial compatibility. From eighteen ISSR primers 85 polymorphic bands were obtained. The estimates of genetic similarity among the isolates varied from 0.14 to 0.97, with 0.58 average. In the cluster analysis five groups were formed containing two isolates, a group with three isolates and two groups with more than 15 isolates. Ten isolates formed individual groups. In general, there was a tendency of isolates to group accordingly to the collecting place. In spite of the wide variability detected by both analyses of MGC and ISSR markers, this was not atypical for asexual reproduction fungi species.

*Advisor: Elaine Aparecida de Souza - UFLA/DBI.

3 INTRODUÇÃO

O fungo *Alternaria solani* é um dos patógenos mais importantes e freqüentes nas culturas da batata e do tomate no Brasil e em várias regiões de cultivo de clima tropical. A ocorrência de epidemias da doença está associada a temperaturas de 25° a 30°C e elevada umidade (Bonde, 1929). Entre as estratégias de controle da doença, a resistência genética é a mais eficaz, pois reduz os custos da produção e o impacto ambiental.

Existem cultivares e clones oriundos da seleção nos programas de melhoramento que exibem bons níveis de resistência de campo e que poderiam ser cultivados sem o emprego de defensivos contra *A. solani* (Stevenson, 1994, Pinto et al., 2002). No entanto, pouco se conhece sobre a variabilidade do patógeno, principalmente no Brasil, onde esta doença fúngica é a de grande destaque. Portanto, para a identificação de novas fontes de resistência, bem como a seleção de clones promissores nos programas de melhoramento visando resistência à pinta-preta, torna-se importante o conhecimento da estrutura populacional do patógeno e o seu constante monitoramento.

A variabilidade de isolados de *A. solani* tem sido avaliada por meio de patogenicidade, marcadores morfológicos, fisiológicas (Bonde, 1929; Henning & Alexandre, 1959; Fancelli, 1991; Simmons, 2000), moleculares (isoenzimáticos, RAPD, RAMs e AFLP) e grupos de compatibilidade micelial (Petrunak & Christ, 1992, Weir et al., 1998; Martínez et al., 2004; Waals et al., 2004). Nesses trabalhos têm sido evidenciada ampla variabilidade genética entre os isolados e, em alguns relatos, a existência de especificidade por hospedeiro ou origem geográfica. No entanto, não há evidências conclusivas sobre a ocorrência de raças fisiológicas.

O termo raça fisiológica é definido de acordo com a especificidade em

cultivares hospedeiras diferenciadoras (Schlegel, 2003). Segundo Chaerani & Voorrips (2006), o relato da presença de raças fisiológicas de *A. solani* não está de acordo com a definição, pois, elas têm sido descritas em termos de variabilidade em caracteres morfológicos, fisiológicos e ecológicos *in vitro* (Bonde, 1929). Henning & Alexander (1959) reconheceram sete raças fisiológicas distintas de *A. solani* em campo de produção de batata a partir de diferenças culturais e uma aparente especificidade por hospedeiro, mas o padrão de infecção não foi consistente entre os experimentos.

A grande variabilidade fenotípica e genética relatada dentro das espécies do gênero *Alternaria* sugere a ocorrência de recombinação. Entretanto, os fungos imperfeitos ou mitospóricos, como os deste gênero, são caracterizados por não apresentarem a fase sexuada (Loguercio-Leite, 2004). Portanto, é provável que algum mecanismo de recombinação assexual esteja ocorrendo, como, por exemplo, o ciclo parassexual que envolve a ocorrência de permuta mitótica (Azevedo, 2004). Um pré-requisito para a ocorrência da parassexualidade é que diferentes isolados sejam compatíveis micelialmente, ou seja, é necessário que ocorra a extensão da ponta das hifas, ramificação e fusão, o que poderá levar à formação de um heterocário (Leslie & Zeller, 1996; Glass et al., 2000; 2004).

A classificação dos diferentes isolados em grupos de compatibilidade micelial (GCM) indica a probabilidade de ocorrência de recombinação somática entre estes grupos (Leslie, 1993). Saupe (2000) comenta que a classificação de diferentes isolados em grupos de compatibilidade micelial pode ser uma boa ferramenta para análises de populações de fungos de reprodução assexual. Em muitos casos, nas populações naturais, o número de GCMs é considerável.

Nesse sentido, a análise de *A. solani*, por meio de marcadores moleculares, associado à investigação do número de grupos de compatibilidade micelial, tem sido utilizada por fornecer informações mais completas sobre as

populações deste fungo (Meijer et al., 1994; Walls et al., 2004). A variabilidade genética encontrada por Walls et al. (2004), com o emprego de grupos de compatibilidade micelial (GCM) e marcadores RAMS, foi alta e não foi atípica para espécies que se reproduzem apenas assexuadamente. A provável causa podem ser mutações naturais, associadas ao grande número de esporos produzidos em um curto período de tempo e, principalmente, a ocorrência do ciclo parassexual.

Outros trabalhos têm usado o fenômeno natural da compatibilidade micelial como um método para verificar a diversidade genética em várias espécies de fungos (Kerényi et al., 1997, Elena & Paplomatas, 1998, Caten & Newton, 2000, Tsor et al., 2001, Nitzan et al., 2002, Gionannetti et al., 2003, Roca et al., 2004).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a variabilidade genética de isolados de *A. solani* coletados em diferentes campos de produção de batata e tomate, em relação à compatibilidade micelial e à diversidade de perfis moleculares, visando obter informações sobre a estrutura populacional deste patógeno

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados de *Alternaria solani*

Foram avaliados 60 isolados de *A. solani* (Tabela 1), sendo 49 provenientes de Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Bahia e Espírito Santo, no Brasil e os demais, provenientes de Cuba. Os isolados foram crescidos a partir de um único conídio da lesão, colocados em BDA, em BOD (incubadora de crescimento) com controle de temperatura de 25°C, no escuro e armazenados na coleção do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os isolados coletados em Ijaci, MG apresentam dados complementares quanto à planta (1,2 ou 3), à folha (A, B ou C) e à lesão (i ou ii) em que cada conídio foi coletado (Tabela 2).

4.2 Análises molecular

4.2.1 Obtenção de massa micelial

A massa micelial foi obtida por meio do crescimento de discos de micélios do fungo retirados das bordas das colônias de cada um dos 60 isolados (Tabela 1) e transferidos para frascos de Erlenmeyer com 250 mL de meio líquido V8 e mantidos, a 25°C, em incubadora (Shaker) com agitação, na rotação de 110 RPM, por sete dias. Após o crescimento da massa micelial, a umidade foi retirada parcialmente, por meio de bomba a vácuo e, posteriormente, realizou-se a extração.

TABELA 1 Identificação da espécie e ou cultivar hospedeira e procedência dos isolados de *A. solani* armazenados na coleção do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, Departamento de Biologia, UFLA.

Nº	Isolado	Hospedeiro	Procedência
1	UFLA 1	batata/clones	Ijaci, MG
2	UFLA 2	batata/clones	Ijaci, MG
3	UFLA 3	batata/clones	Ijaci, MG
4	UFLA 4	batata/clones	Ijaci, MG
5	UFLA 5	batata/clones	Ijaci, MG
6	UFLA 6	batata/clones	Ijaci, MG
7	UFLA 7	batata/clones	Ijaci, MG
8	UFLA 8	tomate	Manhuaçu, MG
9	UFLA 9	tomate	Manhuaçu, MG
10	UFLA 10	tomate	Piracicaba, SP
11	UFLA 11	tomate	Piracicaba, SP
12	UFLA 12	batata/clones	Carrancas, MG
13	UFLA 13	batata/clones	Carrancas, MG
14	UFLA 14	batata/clones	Carrancas, MG
15	UFLA 18	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
16	UFLA 19	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
17	UFLA 20	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
18	UFLA 21	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
19	UFLA 22	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
20	UFLA 23	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
21	UFLA 24	batata/Atlantic	Paraguaçu, MG
22	UFLA 25	batata/Achat	CNPH/DF
23	UFLA 26	batata/Achat	CNPH/DF
24	UFLA 27	batata/clone 118-08	CNPH/DF
25	UFLA 28	batata/clone 118-08	CNPH/DF
26	UFLA 29	batata/ Monalisa	CNPH/DF
27	UFLA 30	batata/Monalisa	CNPH/DF
28	UFLA 31	Batata/clone 118-08	CNPH/DF
29	UFLA 32	Batata/clone 118-08	CNPH/DF

“...continua...”

“TABELA 1, Cont.”

Nº	Isolado	Hospedeiro	Procedência
30	UFLA 33	batata/Delta	CNPH/DF
31	UFLA 34	batata/Delta	CNPH/DF
32	UFLA 51	Tomate	Lavras, MG
33	UFLA 52	Tomate	Lavras, MG
34	UFLA 53	Tomate	Lavras, MG
35	UFLA 54	Tomate	Lavras, MG
36	UFLA 55	batata/Ágata	Cristalina, GO
37	UFLA 56	batata/Ágata	Cristalina, GO
38	UFLA 57	batata/Monalisa	São João da Mata, MG
39	UFLA 58	batata/Monalisa	São João da Mata, MG
40	UFLA 59	batata/Monalisa	São João da Mata, MG
41	UFLA 60	batata/Monalisa	São João da Mata, MG
42	UFLA 61	Batata	Espírito Santo
43	UFLA 62	Batata	Espírito Santo
44	BR – 4	batata/ano ind.	Lavras, MG
45	BR – 8	batata/2000 ¹	Lavras, MG
46	BR – 12	batata/2000 ¹	Lavras, MG
47	BR – 13	batata/2000 ¹	Lavras, MG
48	C – 114	batata/1997 ¹	Pinar del Rio, Cuba
49	C – 119	batata/1997 ¹	Havana, Cuba
50	C – 128	batata/1997 ¹	Villa Clara, Cuba
51	C – 150	batata/1998 ¹	Tonas, Cuba
52	C – 154	batata/1998 ¹	Tonas, Cuba
53	C – 156	batata/1998 ¹	Tonas, Cuba
54	C – 187	batata/1998 ¹	Tonas, Cuba
55	C – 251	batata/1999 ¹	Pinar del Rio, Cuba
56	C – 255	batata/1999 ¹	Camagüey, Cuba
57	C – 258	batata/1999 ¹	Camagüey, Cuba
58	EH – 725	batata/clones	CNPH/DF
59	EH – 769	Tomate	Crisópolis, BA
60	EH – 929	Tomate	J. Dourado, BA

¹Ano de coleta: nos isolados em que não está indicado, a coleta foi realizada em 2005.

TABELA 2 Identificação dos isolados DE *Alternaria solani* de Ijaci, MG, quanto a planta, folha e lesão de coleta.

Isolado	Planta	Folha	Lesão
UFLA 1	1 ¹	A ²	I ³
UFLA 2	2	B	iii
UFLA 3	2	C	iv
UFLA 4	1	A	i ¹
UFLA 5	3	D	v
UFLA 6	1	A	ii ¹
UFLA 7	3	E	vi

¹Números iguais indicam a mesma planta;

²Folhas representadas pela mesma letra foram coletadas na mesma planta;

³Lesões representadas pela mesma letra foram coletadas na mesma folha da mesma planta.

4.2.2 Extração de DNA total

A extração de DNA foi efetuada de acordo com a metodologia desenvolvida por Raeder & Broda (1985) modificada. A massa micelial foi transferida para almofariz de porcelana e macerada em 10 ml de tampão de extração com CTAB a 65°C, juntamente com 30 µl de b-mercaptoetanol, com auxílio de areia esterilizada e nitrogênio líquido. O tampão de extração continha 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH = 8,0), 20 mM de EDTA (pH = 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidona).

O macerado foi mantido em banho-maria, a 65°C, por 30 minutos, sendo agitado, por suaves inversões, a cada 10 minutos; logo após, as amostras foram submetidas a resfriamento durante cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 10 mL da solução clorofórmio:álcool isoamil (24:1), seguindo-se homogeneização e centrifugação, durante 10 minutos, a 4.000 rpm. O sobrenadante foi misturado a 30 mL da solução álcool etílico a 95% acetato de

amônio 7,5M (6:1) e levado ao freezer (-20°C). por seis horas, no mínimo. Ao DNA coletado foram adicionados 300 µL de TE (Tris 1 mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,7). O DNA dissolvido foi submetido a uma segunda extração com clorofórmio álcool isoamil, sendo o sobrenadante coletado e misturado com o triplo de seu volume com álcool a 95%:acetato de sódio 3M (20:1) e mantido no freezer (-20°C), por seis horas, no mínimo. A solução de álcool acetato de sódio foi eliminada e o DNA dissolvido em 50-100 µL de TE.

Após este processo, o material foi quantificado usando-se o fluorímetro Hoeffler Scientific TKO100. Para isso, foram utilizados 2 µL da solução de DNA em 2 mL de tampão (Tris 10 mM, EDTA 1,0 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4), juntamente com 0,1 µL.mL⁻¹ do corante H32258. As amostras foram diluídas em TE para uma concentração de 10 ng.mL⁻¹, para as reações ISSR.

4.2.3 Reação ISSR

Primers degenerados foram sintetizados a partir dos utilizados por Walls et al. (2004) para possibilitar a amplificação isoladamente de seqüências específicas. Cada seqüência foi sintetizada separadamente. A partir de teste preliminar, foram escolhidas as seqüências que apresentaram produtos de amplificação (Tabela 3). As amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de ISSR. Cada reação de amplificação de 12 µL continha 4,74 µL de água, 2,5 µl de DNA (aong.ml⁻¹), 0,66 µl de dNTP (mistura equitativa de dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 µl de um dos oligonucleotídeos iniciadores (*primer*), indicados na tabela 5, 1,0 µl de tampão de reação e 0,6 unidades de enzima Taq polimerase.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf MasterCycler Gradient 5331. Os ciclos de amplificação foram subdivididos em dois programas: 1) nos oito primeiros ciclos, a desnaturação do

DNA foi feita a 94°C, por dois minutos; o anelamento, a 40°C, por 20 segundos e a elongação, a 72°C, por 20 segundos e 2) adicionalmente, mais 24 ciclos diferiram apenas no tempo de desnaturação (20 segundos). Após 30 ciclos, procedeu-se a extensão final, por 4 minutos, a 72°C.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% imerso em tampão TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M EDTA), a 60 volts, durante 4 horas. Logo após, foram corados com brometo de etídio a uma concentração de 0,5 µg.mL⁻¹ e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados com a câmara fotográfica EDA - 290 da KODAK.

TABELA 3 *Primers* de ISSR que detectaram polimorfismo nos isolados de *Alternaria solani*, com suas respectivas seqüências de bases.

Primers	Seqüências
CA1	5' ACCACACACACACACACA3'
CA2	5' ATCACACACACACACACA3'
CA3	5' TACACACACACACACACA3'
CA4	5' GCCACACACACACACACA3'
CA5	5' AGCACACACACACACACA3'
CA6	5' GGCACACACACACACACA3'
CA7	5' GTCACACACACACACACA3'
CA8	5' TCCACACACACACACACA3'
CA9	5' TTCACACACACACACACA3'
CAC1	5' ACGCACCACCACCACCAC3'
CAC4	5' ACACACCACCACCACCAC3'
CAC5	5' ACTCACCACCACCACCAC3'
CAC6	5' AGTCACCACCACCACCAC3'
CAC7	5' ATGCACCACCACCACCAC3'
CAC10	5' GGACACCACCACCACCAC3'
CAC11	5' GGGCACCACCACCACCAC3'
CAC12	5' GTCCACCACCACCACCAC3'
CAC13	5' GTTCACCACCACCACCAC3'

4.3 Grupos de compatibilidade micelial (GCM)

Para a avaliação dos grupos de compatibilidade micelial (GCM) foi utilizada a metodologia de Waals et al. (2004), com modificações. Discos miceliais de 3mm de diâmetro foram transferidos para placas com BDA, em um arranjo de seis discos distanciados a 2cm por placa e mantidas em câmara de crescimento (BOD), a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, por quinze dias.

Os pares de isolados confrontados foram considerados como incompatíveis quando alguma das situações a seguir foi observada: uma região de contato, entre os isolados, com micélios escassos ou ausentes ou uma linha escura fina, com micélios pigmentados, chamada de linha de contato ou zona de reação. Por conseguinte, entre os pares de isolados nos quais não foi possível verificar uma região de contato, indicando que os micélios dos isolados se misturaram uniformemente, estes foram considerados compatíveis micelialmente. Foram realizadas duas repetições para cada par de combinações.

4.4 Análises estatísticas

4.4.1 Análises dos grupos de compatibilidade micelial

Após a avaliação foi construída uma matriz binária, em que 0 (zero) corresponde a isolados não compatíveis e 1 (um) a isolados compatíveis vegetativamente. Dessa forma, com esses dados, foi gerada uma matriz.

Para estimar a similaridade, foi utilizado o coeficiente de Russel & Rao (1940) por meio da expressão:

$$sg_{ij} = a / (a + b + c + d)$$

Sendo,

- a*: compatibilidade para ambos os isolados *i* e *j*,
- b*: compatível apenas para o isolado *i*,
- c*: apenas para o isolado *j* e
- d*: incompatível para ambos isolados *i* e *j*.

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS.pc 2.1 (Rohlf, 2000).

O dendrograma foi obtido a partir da matriz de similaridade genética gerada por meio de análises de agrupamento de similaridade, utilizando o método de média das similaridades (UPGMA). Os erros associados a cada similaridade foram estimados utilizando-se a expressão:

$$s_{gs} = \{sg_{ij}[(1 - sg_{ij})/(n-1)]\}^{0.5}$$

Em que,

n é a soma de *a*, *b*, *c* e *d* para cada par de isolados.

Os isolados pertencentes a diferentes grupos de compatibilidade micelial foram identificados no dendrograma a partir da estimativa do valor máximo significativo (sg_m). O sg_m foi estimado por meio do teste *t*, utilizando-se a expressão:

$$sg_m = 1 - (t \cdot s_{sg})$$

Em que,

t é o valor tabelado da distribuição de *t* de Student, a 1% de probabilidade, com *n*-2 graus de liberdade e

s_{sg} o erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

4.4.2 Identificação do número ótimo de marcadores

Com a finalidade de verificar se o número de bandas polimórficas geradas pelos 18 *primers* de ISSR (Tabela 5) foi suficiente para determinar com precisão as estimativas de similaridades genéticas entre isolados, foi realizada a

análise de *bootstrap*.

Para cada par de isolados, a similaridade genética foi estimada a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos (5, 15, 25, 35,..., 85 bandas), sendo cada uma repetida 10.000 vezes por meio do software GQMOL (Cruz & Schuster, 2004). Neste aplicativo, obtêm-se as estimativas de correlação de valores da matriz de similaridade original com os de outras matrizes de similaridade, as quais são obtidas levando-se em consideração diferentes números de bandas. O programa disponibiliza também dois outros parâmetros: a soma de quadrados dos desvios em relação às reamostragens e o valor de estresse (E), que indica o ajuste entre a matriz original e a matriz amostral, por meio da expressão:

$$E = \left\{ \frac{\sum (s_{ij}^* - s_{ij})^2}{\sum s_{ij}^{*2}} \right\}^{0,5}$$

em que:

E: estresse;

s_{ij}^* : similaridade genética média entre todos os pares de acessos estimada para cada amostragem;

s_{ij} : similaridade genética média entre todos os pares de acessos estimada a partir do total de bandas polimórficas.

O número ideal de bandas polimórficas foi considerado quando o estresse assumiu valor menor que 0,05 (Kruskal, 1964).

4.4.3 Estimativa das similaridades genéticas por marcadores ISSR

Ao avaliar os géis, constou-se que cada banda polimórfica foi tratada como um caráter único. Foi gerada uma matriz de dados 0 e 1 (Tabela 1A), a partir da codificação da presença (1) e da ausência (0) das bandas polimórficas presentes nos 60 isolados. A estimativa da similaridade genética, entre cada par de isolados, foi efetuada pelo coeficiente de Nei e Li, por meio da expressão

(Rohlf, 2000).

$$Sg_{ij} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

Em que:

a: presença de bandas no indivíduo *i* e *j*;

b: presença de bandas no indivíduo *i* e ausência no indivíduo *j*;

c: ausência de bandas no indivíduo *i* e presença no indivíduo *j*;

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000). A matriz de similaridade genética gerada foi, então, usada para produzir um dendrograma pelo método da média das similaridades (UPGMA).

Os erros associados a cada similaridade e os isolados geneticamente diferentes foram identificados no dendrograma e estimados como demonstrado no item 1.4.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise molecular

5.1.1 Nível de polimorfismo

As reações efetuadas com os 18 *primers* selecionados para a análise da diversidade genética (Tabela 4) proporcionaram 85 produtos de amplificação, os quais forneceram uma média de 4,7 bandas por *primer*. Tanto os *primers* da família CA (Figura 1A) quanto os da família CAC amplificaram, em média, o mesmo número de bandas polimórficas.

Waals et al. (2004) avaliaram isolados de *A. solani* utilizando os *primers* ISSR [*Inter-SSR (Simple Sequence Repeats) amplification*] chamados por ele de RAMS (*Random Amplified Microsatellites*). Entretanto, estes autores utilizaram os *primers* de forma degenerada. Além disso, também usaram as combinações destes *primers*, GACA₄-CAC₅ e CA₈-CAC₅, sendo obtido um total de 47 bandas polimórficas. No entanto, há dúvidas se estes *primers* gerariam um número de bandas polimórficas capaz de representar a diversidade existente entre os isolados. Para constatar este fato, foram realizadas análises de reamostragens (*bootstrap*), empregando-se as 85 bandas geradas nos 60 acessos (Figura 1).

Verifica-se que houve relação direta entre o número de bandas e a magnitude da correlação dos valores da matriz de similaridade original com os das outras matrizes de similaridade geradas a partir das amostras dos diferentes números de bandas. Contudo, somente a partir de 45 bandas, a estimativa de correlação apresentou alta magnitude ($r=0,94$). Mesmo assim, para este número de bandas, a soma dos quadrados dos desvios em relação às reamostragens e ao valor do estresse ainda foram altos (SQd=11,7 e estresse=0,09), sugerindo baixa

consistência na associação das matrizes, segundo Kruskal (1964).

O número ótimo foi considerado quando se atingiu 75 bandas, pois, neste valor, houve um bom ajuste entre os valores da matriz de similaridade original com os das outras matrizes de similaridade geradas. Para este número de bandas, a magnitude da correlação foi bem próxima do valor máximo ($r=0,99$), apresentando alta confiabilidade, uma vez que cada reamostragem foi repetida 10.000 vezes. A soma de quadrados dos desvios (SQd) e o valor do estresse (E) atingiram valores baixos, isto é, 0,0966 e 0,0383, respectivamente. Para Kruskal (1964), valores de estresse inferiores a 0,05 representam um excelente indicativo de precisão, pois este valor indica um ajustamento do gráfico (dendrograma) em relação à matriz de similaridade original.

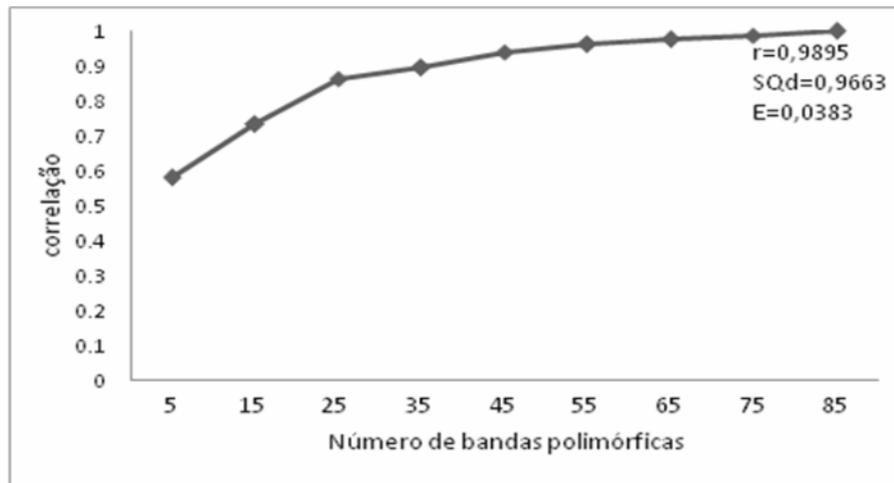


FIGURA 1 Resumo da análise *bootstrap* contendo as correlações obtidas para diferentes números de bandas polimórficas do marcador ISSR na determinação do número ideal de bandas para a análise de isolados de *Alternaria solani*.

5.1.2 Avaliação da variabilidade genética

A partir das 85 bandas polimórficas geradas (Tabela 3A), foi construída uma matriz de similaridades genéticas. As estimativas de similaridade genética entre os isolados variaram de 0,14 a 0,97, com média de 0,58, valor este similar ao encontrado (0,423) por Petrunak & Christ (1992), na avaliação da diversidade genética entre isolados de *A. solani*, dos Estados Unidos. Todavia, Waals et al. (2004) relatam uma similaridade genética média de 0,27. Com relação à distribuição de frequência das similaridades obtidas entre os pares formados na matriz genética, verificou-se que 82% dos pares variaram de 0,38 a 0,78. Estes resultados reforçam a possibilidade de os isolados avaliados possuírem ampla diversidade genética e fornecem indícios de que a amostra analisada represente bem a variabilidade dessa espécie, pelo menos entre os isolados mais distintos geneticamente. Apesar de terem sido encontradas valores de similaridades genéticas baixos, a maioria destes valores é maior, sendo a média considerada alta quando comparada com resultados dos trabalhos anteriormente mencionados.

Para melhor visualização da divergência genética entre os isolados, foi construído um dendrograma a partir das similaridades (Figura 2). Pela análise do dendrograma foi possível verificar a formação de oito grupos, todos com elevados valores de *bootstrap* ($bootstrap \geq 90\%$).

Dos grupos formados, cinco grupos contêm apenas dois isolados, um grupo foi formado por três isolados e dois grupos foram formados por mais de quinze isolados. Entretanto, dez isolados não formaram grupos dentro do intervalo estabelecido. Os grupos formados são apresentados na Tabela 7, com seus hospedeiros e locais de coleta. Como se pode observar, nesta tabela, os isolados do grupo 1 e do grupo 2 foram coletados de batata em Ijaci, MG. Dos sete isolados coletados neste local, cinco encontram-se nestes dois grupos.

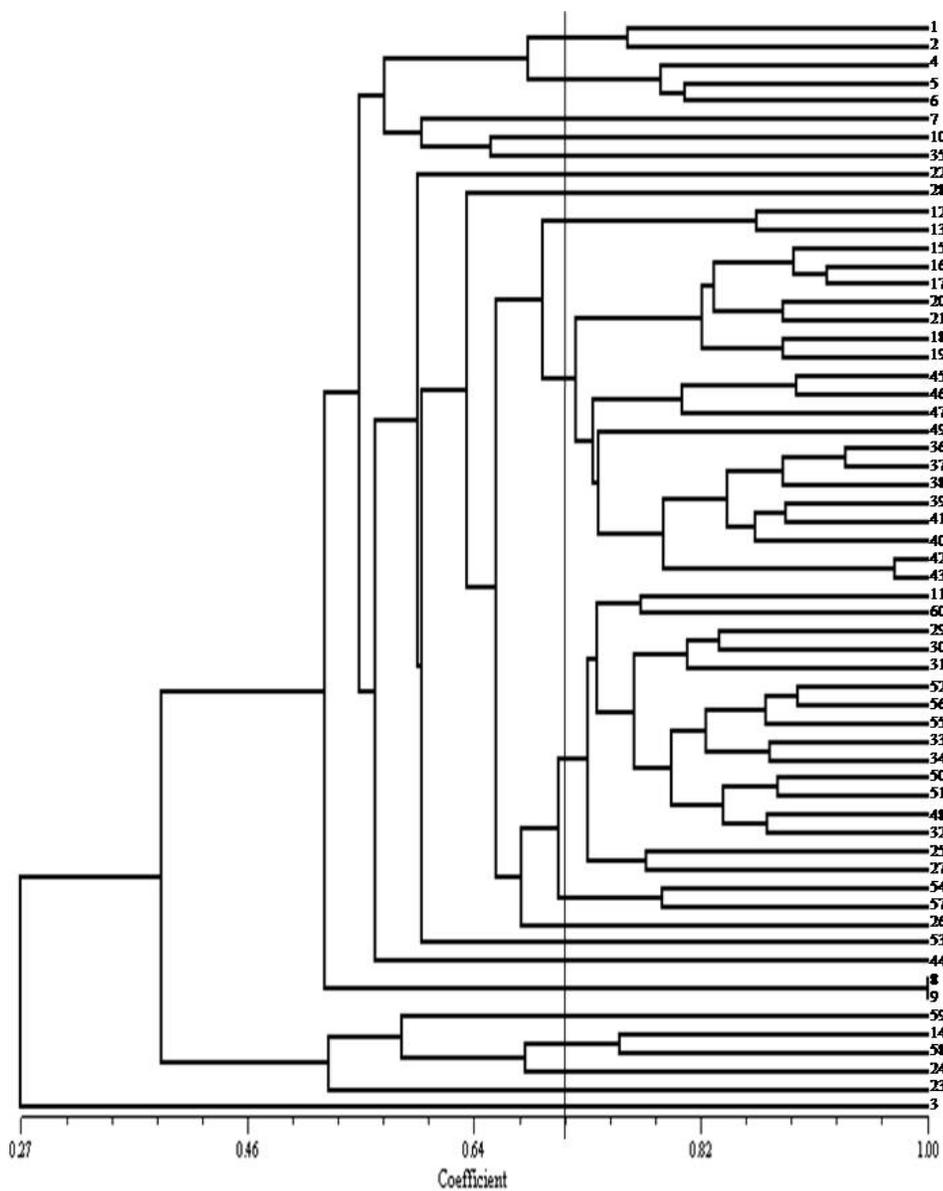


FIGURA 2 Dendrograma dos isolados de *Alternaria solani* agrupados de acordo com a estimativas de similaridades genéticas, com base em 85 bandas polimórficas de ISSR geradas (UPGMA) A linha de corte representa o valor máximo de similaridade (sgm), à direita da qual os isolados apresentaram o mesmo comportamento. O sgm a 1% de probabilidade foi de 0,71.

O grupo 3 é formado por dois dos três isolados coletados em Carrancas, MG. Do mesmo modo, o grupo 7 é formado pelos dois isolados coletados em Manhuaçu, MG. Entretanto, apesar dos dois isolados do grupo 6 terem vindo de Cuba, eles foram coletados em locais diferentes. De modo semelhante, os isolados do grupo 8 foram coletados em Carrancas, MG e no CNPH/DF.

A tendência de agrupamentos dos isolados de *A. solani* por origem geográfica e hospedeiro foi observada por Martínez et al. (2004). Alguns isolados utilizados por estes autores também foram avaliados no presente trabalho, os quais mostraram coincidência nos agrupamentos dos dois trabalhos. No trabalho realizado por Martínez et al. (2004), os isolados de *A. solani* formaram dois grupos, grupo 1 e grupo 2. Entre os isolados do grupo 1 encontram-se C-114, C-128, C-255, C-150 e C-154 que, no presente trabalho, ficaram no grupo 5 e, também, os isolados C-187, C-251, C-258 que, no presente trabalho, encontram-se no grupo 6. Entre os isolados do grupo 2 de Martínez et al. (2004) encontram-se C-119, BR-12, BR-13, BR-8 e BR4 que, no presente trabalho, encontram-se no grupo 4; somente o isolado BR-4 não formou grupo. Os isolados BR-12, BR-13 e BR-8, em ambos os trabalhos, formaram um grupo menor.

Apesar da formação de grupos com isolados do mesmo local de origem, não se pode inferir sobre a tendência de formação de grupos por hospedeiro, devido ao baixo número de isolados coletados de tomate. Esses agrupamentos por hospedeiro foram observados por Petrunak & Christ (1998), Weir et al. (1998), Waals et al. (2004) e Martínez et al. (2004). Contudo, nestes trabalhos, não ocorreu formação de grupos de acordo com a origem geográfica. Os resultados desses trabalhos sugerem que as várias subpopulações de diferentes regiões geográficas não são geneticamente isoladas, o que não foi observado no presente trabalho.

TABELA 4 Grupos de isolados considerando os resultados do UPGMA e do dendrograma, referentes aos 60 isolados (Figura 3).

G	Isolado	Local	Hospedeiro
1	UFLA 1, UFLA 2	Ijaci/MG	batata
2	UFLA 4, UFLA 5, UFLA 6	Ijaci/MG	batata
3	UFLA 12, UFLA 13	Carrancas/MG	batata
	UFLA18, UFLA19, UFLA20		
	UFLA23, UFLA24, UFLA21, UFLA22	Paraguaçu/MG	batata
4	BR – 8, BR – 12, BR – 13	Lavras/MG	batata
	C – 119	Havana, Cuba	batata
	UFLA 55, UFLA 56	Cristalina/GO	batata
	UFLA57, UFLA 58, UFLA59, UFLA60	S. J. da Mata/MG	batata
	UFLA 61, UFLA62	Espírito Santo	tomate
	UFLA 11	Piracicaba/SP	tomate
	EH – 929	J. Dourado/BA	tomate
	UFLA28, UFLA30, UFLA32, UFLA33, UFLA34	CNPH/DF	batata
5	C – 154, C – 150	Tonas/Cuba	batata
	C – 251, C – 114	Pinar D. Rio/Cuba	batata
	C – 255	Camgüey/Cuba	batata
	C – 128	Villa Clara, Cuba	batata
6	C – 187,	Tonas, Cuba	batata
	C – 258	Camagüey, Cuba	batata
7	UFLA 8, UFLA 9	Manhuaçu/MG	tomate
8	UFLA 14	Carrancas/MG	batata
	EH – 725	CNPH/DF	batata
	UFLA 3, UFLA 7	Ijaci/MG	batata
	UFLA 10	Piracicaba/SP	tomate
Isolados que não formaram grupos	UFLA25, UFLA26,UFLA27, UFLA31,	CNPH/DF	batata
	UFLA 54, UFLA 59,	Lavras/MG	batata
	BR - 4	Lavras/MG	tomate

5.2 Grupos de compatibilidade micelial (GCM)

Todos os isolados evidenciaram a sua capacidade de serem compatíveis micelialmente com os demais (Tabela 2A). Os diferentes tipos de reações de compatibilidade micelial podem ser observados na Figura 3. A reação de compatibilidade micelial envolve a ocorrência de vários eventos anteriores que foram descritos por diferentes autores (Leslie & Zeller, 1996; Glass et al., 2000; 2004). Um estágio inicial de pré-contato leva ao crescimento das hifas de um isolado em direção às hifas do outro isolado (Glass et al., 2004). Quando esta etapa não ocorre, observamos uma região de contato entre os isolados com micélios escassos ou ausentes (Figura 2(a)). Entretanto, em muitos casos, as etapas de pré-contato e fusão das hifas ocorrem, contudo, as células heterocarióticas resultantes são rapidamente destruídas por uma reação degenerativa e lítica, ficando escuras, sendo possível observar a linha de contato (Figura 2(b)) (Leslie, 1996).

Os isolados que apresentaram maior percentual de reações compatíveis (75%) foram UFLA57 e UFLA59, ambos coletados de batata, em São João da Mata, MG. Quando se comparam as reações destes isolados com os demais isolados, estas foram diferentes, ou seja, o isolado UFLA57 foi compatível micelialmente com o UFLA31 e o isolado UFLA59 não foi, o que, provavelmente, indica que eles apresentam genótipos diferentes para os locos envolvidos no controle do caráter. Já o isolado que apresentou maior percentual (78%) de reações incompatíveis foi o UFLA31, coletado de batata, na Embrapa Hortaliças/DF.

Confrontando-se os isolados de uma mesma região dois a dois, observaram-se reações de incompatibilidade entre eles, o que corrobora o relato de Saupe (2000), de que interações incompatíveis podem ocorrer frequentemente entre os isolados de uma mesma população, bem como de populações distintas.

De acordo com Glass et al. (2000), as reações de incompatibilidade podem estar relacionadas a um sistema de autodefesa. Já a compatibilidade micelial possibilita a formação do heterocário, o que poderá originar variação genética na população do patógeno.

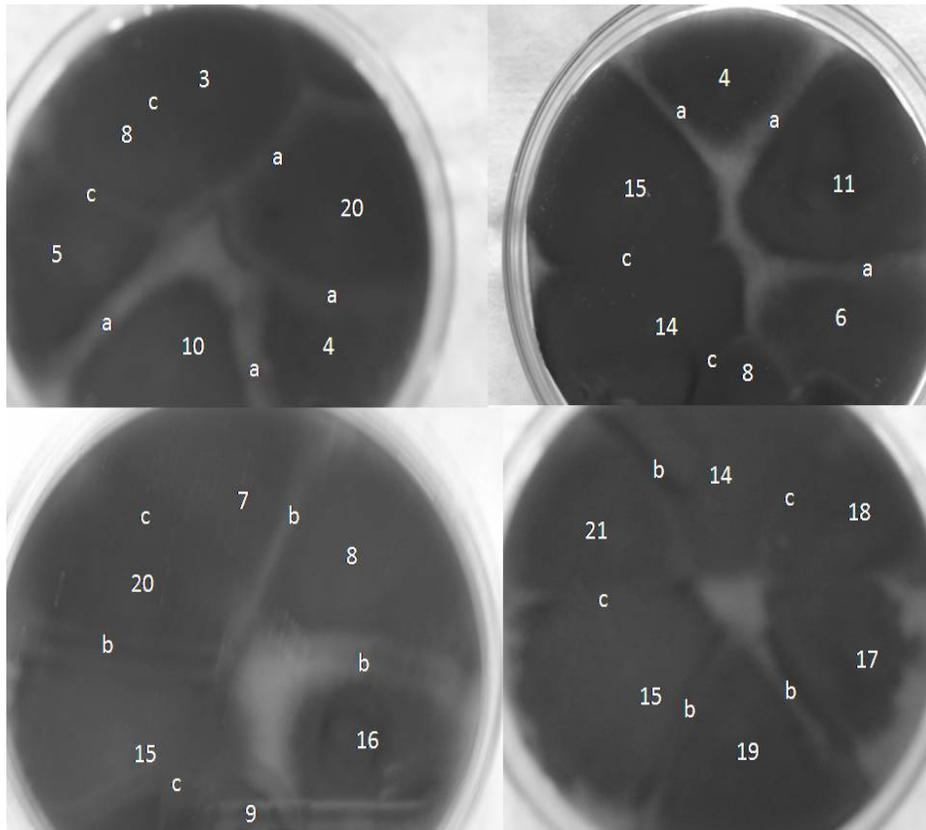


FIGURA 3 Visualização dos confrontos entre isolados de *Alternaria solani*. Em cada placa foram confrontados seis isolados. Os números indicam o isolado e as letras: (a) região de contato entre os isolados com micélios escassos ou ausentes, (b) linha de contato ou zona de reação formada por uma linha escura fina, com micélios pigmentados, indicam reação de incompatibilidade micelial e (c) reação de compatibilidade com os micélios dos isolados se misturando livremente.

A compatibilidade micelial é um requisito para a ocorrência do ciclo parassexual, que é um mecanismo de recombinação genética em fungos assexuados, como os do gênero *Alternaria* (Loguercio-Leite, 2004), que poderá ampliar a variabilidade genética da população. A partir dos dados de compatibilidade micelial do confronto dos isolados dois a dois (Tabela 2A) não foi possível a formação de grupos, pois vários isolados seriam compatíveis com isolados de diferentes grupos de compatibilidade micelial. Evolutivamente, este comportamento é vantajoso, por permitir a troca de informações entre grupos de compatibilidade diferentes. A incompatibilidade é um mecanismo de autodefesa em fungos filamentosos, limitando a passagem de elementos infecciosos e ou prevenindo a exploração por núcleos mal adaptados (Glass & Kaneco, 2003).

As estimativas de similaridade genética para a compatibilidade micelial entre os pares de isolados variaram de 0,02 a 0,73, com média de 0,23. Ishikawa (2006), a partir de dados de grupos de anastomoses em *Colletotrichum lindemuthianum*, encontrou estimativas de similaridade entre 0,28 e 0,85 e Silva (2007), também a partir de dados de grupos de anastomoses em *Phaeoisariopsis griseola*, encontrou estimativas de diversidade entre 0,15 e 0,85. Como no presente estudo, esses trabalhos demonstraram grande variação nas estimativas de similaridades genética para a compatibilidade micelial. Entretanto, as estimativas para *A. solani* encontradas foram baixas; a maioria, 78%, encontra-se entre 0,12 a 0,33 e somente 5% das similaridades foram superiores a 0,4, indicando diferentes padrões de comportamento dos isolados quanto às reações de compatibilidade micelial

Para melhor visualização da análise das estimativas de similaridade genética entre os isolados, foi construído um dendrograma que está apresentado na Figura 4. A linha de corte representa o valor máximo de similaridade (sgm), à direita da qual os isolados apresentaram o mesmo comportamento. O sgm, a 1% de probabilidade, foi de 0,45.

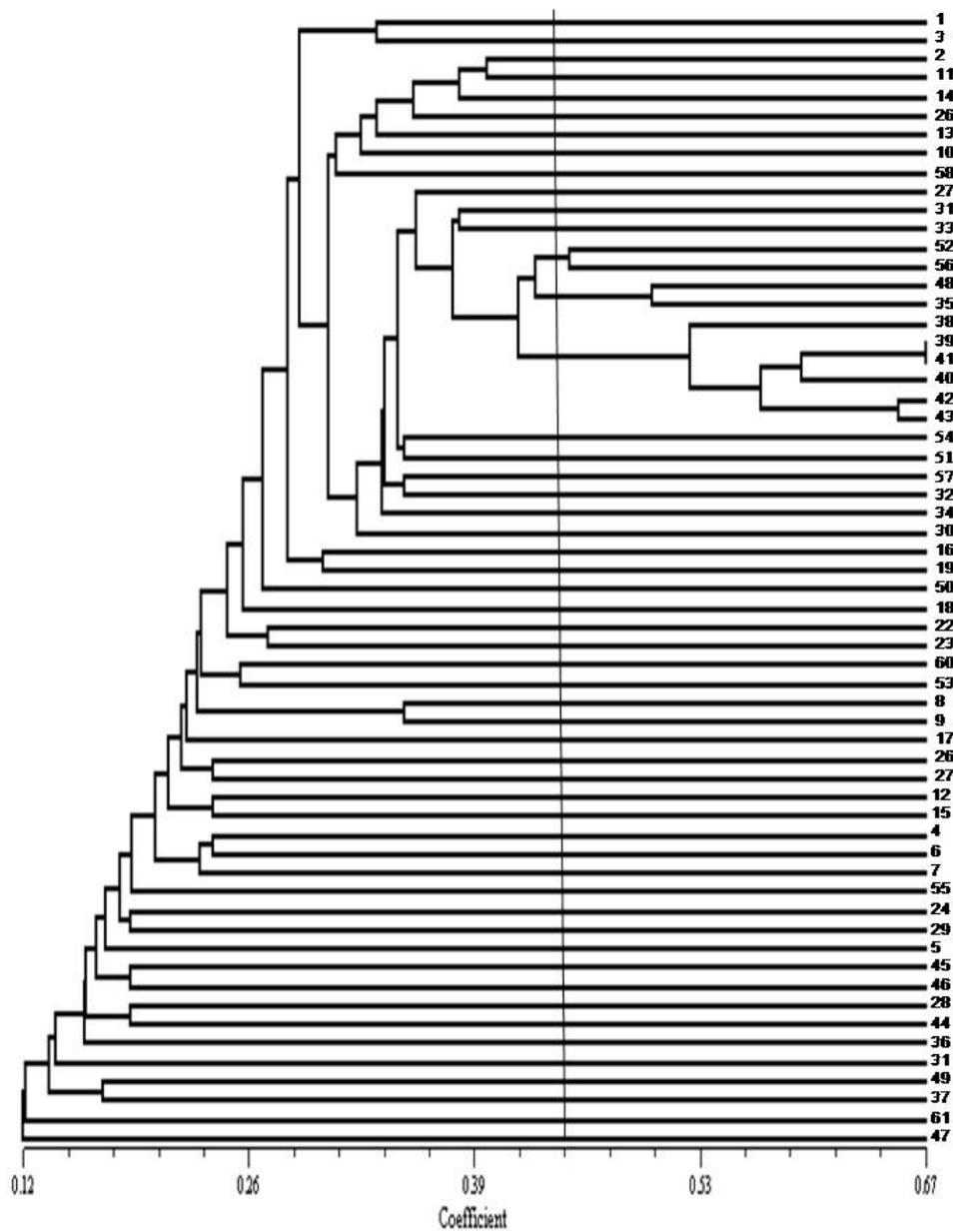


FIGURA 4 Dendrograma dos isolados de *A. solani* agrupados de acordo com o comportamento de compatibilidade micelial com os demais isolados (UPGMA) A linha de corte representa o valor máximo de similaridade (sgm), à direita da qual os isolados apresentaram o mesmo comportamento. O sgm, a 1% de probabilidade, foi de 0,45.

Pela análise do dendrograma, verifica-se a formação de 36 grupos, dos quais apenas três foram formados por isolados que apresentam o mesmo comportamento quanto à compatibilidade micelial (GCM). Desses, dois grupos foram formados por dois isolados (grupo 1: C154 e C-255, grupo 2: UFLA54 e C-114) e um grupo foi formado por cinco isolados (grupo 3: UFLA57, UFLA58, UFLA59, UFLA60, UFLA61 e UFLA 62).

Walls et al. (2004), ao analisarem os grupos de compatibilidade micelial de 53 isolados de *A. solani*, observaram a formação de 6 grupos contendo vários isolados e 13 isolados não formaram grupos. Já Silva (2007), avaliando grupos de anastomoses em *P. griseola*, verificou que apenas cinco isolados formaram um único grupo; os remanescentes ficaram agrupados isoladamente. A formação de poucos grupos também foi observada por Ishikawa (2006), com grupos de anastomoses em isolados de *C. lindemuthianum*, em que, dos 11 grupos formados, apenas um continha três isolados. Estas observações estão de acordo com o que foi comentado por Rodrigues-Guerra (2003) de que, em populações naturais, vários grupos de anastomoses podem ser identificados, uma vez que o confronto entre isolados de uma mesma população ou de populações distintas resulta, freqüentemente, em interações de incompatibilidade (Saupe, 2000).

Pode-se observar uma tendência a agrupamento de acordo com o local de coleta. O grupo 1 é formado pelos isolados, C-154 e C-255, coletados de batata provenientes de Cuba, assim como todos os isolados do grupo 3 foram coletados de batata, sendo quatro isolados, UFLA57, UFLA58, UFLA59, UFLA60, provenientes de São João da Mata, MG e dois, UFLA61 e UFLA62, do Espírito Santo. Já o grupo 2 é formado por isolados de hospedeiros e locais de coleta diferentes, o isolado UFLA54 foi coletado de tomate em Lavras, MG e o isolado C-114 foi coletado de batata em Cuba. Esta disposição dos grupos de compatibilidade de acordo com a origem geográfica não foi observada por Waals et al. (2004).

Todos os isolados coletados em São João da Mata, MG mostraram-se similares quando avaliados por meio da compatibilidade micelial, indicando baixa variabilidade genética entre estes isolados e sugerindo o isolamento desta população em relação às demais.

5.3 Considerações finais

Comparando-se os grupos formados pelos marcadores ISSR com os formados pelas reações de compatibilidade micelial (GCM), observa-se que, pelos dados de GCM, o número de grupos formados foi inferior ao que se formou pelos dados de marcadores ISSR. Estas observações corroboram com as apresentadas por Waals et al. (2004), que não observaram correlação entre os grupos de compatibilidade vegetativa (GCV) e os padrões moleculares.

A correlação entre as matrizes de similaridades de GCM e marcadores ISSR foi muito baixa (0,3), o que é esperado, uma vez que a diversidade genética medida por marcadores moleculares baseia-se na análise aleatória de todo o genoma do fungo e os locos responsáveis pela reação de compatibilidade são em menor quantidade e podem estar em diferentes regiões do genoma.

A reação de compatibilidade é controlada por diferentes locos que podem ter diferentes alelos (Glass et al., 2000; Leslie & Zeller, 1996). Contudo, apesar de ser relativamente elevada, a divergência genética encontrada usando tanto marcadores moleculares quanto GCM, de acordo com os diversos trabalhos realizados com o gênero *Alternaria*, não é atípica para espécies de reprodução assexuada (Petrunak & Christ, 1992; Weir et al., 1998; Morris et al., 2000, Martínez et al., 2004; Waals et al., 2004). Este fato sugere que as variações encontradas podem ser devido a mutações e, possivelmente, à recombinação parassexual.

Entretanto, os isolados UFLA18, UFLA19, UFLA20 UFLA23,

UFLA24, UFLA21 e UFLA22, coletados em Paraguaçu, MG, apresentaram o mesmo padrão de agrupamentos, tanto para dados de GCM quanto para os dados de marcadores ISSR, sugerindo o isolamento geográfico desta população em relação às demais.

Os isolados de Ijaci, MG, foram coletados tomando-se os dados de planta, folha e lesão de cada esporo. Foi realizada a análise de similaridades genéticas desses isolados. As similaridades variaram de 0,54 a 0,82, com média de 0,68. Os isolados mais divergentes geneticamente foram UFLA3 e UFLA4, que foram coletados de plantas diferentes. Quanto aos isolados coletados numa mesma lesão, como o UFLA1 e UFLA4, estes apresentaram similaridade de 0,76. Os isolados coletados na planta 1, UFLA1, UFLA4 e UFLA6, apresentaram similaridades entre 0,75 e 0,76. Já os isolados coletados na planta 2, UFLA2 e UFLA3, apresentaram similaridade de 0,80.

A variabilidade genética entre esporos de *A. alternata* por lesão foi avaliada por Morris et al. (2000). Todos os isolados de uma mesma lesão puderam ser claramente distinguidos dos isolados das outras lesões. Entretanto, a co-infecção de uma mesma lesão por isolados de *A. alternata* diferentes, em folhas de pêra japonesa, foi encontrada por Adachi & Tsuge (1994). No presente trabalho, os isolados de uma mesma lesão, UFLA1 e UFLA4, ficaram em grupos separados, indicando haver divergência entre os isolados de uma mesma lesão. Entretanto, pelos resultados observados, para o monitoramento das populações do patógeno, o mais interessante é retirar amostras o mais distante possível e em diferentes campos de produção.

As análises de GCM e marcadores ISSR mostraram ampla variabilidade em *Alternaria solani* no Brasil e, de acordo com McDonald & Linde (2002), populações de patógeno com alta diversidade genética tornam-se um grande risco na quebra de resistência do hospedeiro. Estes autores sugerem que, nestes casos, os esforços no melhoramento deveriam se concentrar na resistência

quantitativa que poderia ser combinada com outras formas de controle. Pelos resultados obtidos neste trabalho, na seleção de clones resistentes deve ser utilizado o maior número possível de isolados, procurando representar, o mais possível, a ampla variabilidade detectada, sendo estes isolados coletados do maior número possível de campos de produção.

O entendimento da diversidade genética em *A. solani* em batata no Brasil auxiliará sobremaneira nas estratégias de manejo da pinta-preta. A quantidade e a distribuição da variação entre e dentro das populações indicam a adaptabilidade do patógeno em vencer os estresses naturais ou artificiais a que população está submetida e, portanto, a neutralizar as medidas de controle da doença (McDonald & Linde, 2002; McDonald et al. 1989). Esse resultado torna explícita a necessidade de que novos estudos sejam realizados para a melhor compreensão da dinâmica populacional deste patógeno no Brasil.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho comprovou-se a ampla variabilidade genética entre os isolados de *A. solani*, tanto pelo emprego de grupos de compatibilidade micelial quanto por marcadores ISSR.

Houve a formação de um número maior de grupos a partir dos dados de compatibilidade micelial do que os gerados pelos marcadores ISSR.

O maior grupo de similaridade quanto a compatibilidade micelial foi formado pelos isolados coletados em São João da Mata, MG.

Tanto os grupos formados pelas análises de compatibilidade micelial quanto pelos marcadores ISSR apresentaram uma tendência a agruparem-se por local de coleta.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, Y.; TSUGE, T. Coinfection by different isolates of *Alternaria alternata* in single black spot lesions of Japanese pear leaves. **Phytopathology**, v.84, p. 447-451, 1994.
- AZEVEDO, J.L. Genética de fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2004. v.01, p.173-211.
- BONDE, R. Physiological strains of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v.19, p.533-548., 1929.
- CATEN, C.E.; NEWTON, A.C. Variation in physiological characteristics, pathogenicity, vegetative compatibility and electrophoretic karyotype within field populations of *Stagonospora nodorum*. **Plant Pathology**, v.49, n.2, p.219-226, 2000.
- CHAERANI, R.; VOORRIPS, R.E. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. **Journal Gen Plant Pathology**, v.72, p.335–347, 2006.
- CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **GQMOL** – aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 2004. 2.1. Viçosa, MG: UFV, 2004. Software.
- ELENA, K.; PAPLOMATAS, E.J. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahlia* isolates from different hosts in Greece. **Plant Pathology**, v.47, p.635-640, 1998.
- FANCELLI, M.I. **Comparação patogênica, fisiológica, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *A. solani* F. sp *lycopersici* N. F.** 1991. 80p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; STRANI, P.; AGNOLUCCI, M.; RINAUDO, V.; AVIO, L. Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.616–624, 2003.

GLASS, N.L.; RAMUSSEN, C.; ROCA, M.G.; READ, N.D. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. **Trends Microbiology**, v.12, p.135-141, 2004.

GLASS, N.L.; JACOBSE, D.; SHIU, P.K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, v.34, p.165-186, 2000.

GLASS, N.L.; KANEKO, I. Fatal attraction: no self recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. **Eukaryotic Cell**, v.2, n.1, p.1–8, 2003.

HENNING, R.G.; ALEXANDRE, L.J. Evidence of existence of physiologic races of *Alternaria solani*. **Plant Disease Rep.**, v.43, p.298-380, 1959.

ISHIKAWA, F.H. **Variabilidade genética dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores RAPD e grupos de anastomoses.** 2006. 52p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

KERÉNYI, Z.; TÁBORHEGYI, É.; POMÁZI, A.; HORNOK, L. Variability Amongst strains of *Fusarium poae* assessed by vegetative compatibility and RAPD polymorphism. **Plant Pathology**, v.46, n.6, p.882-889, 1997

KRUSKAL, J.B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. **Psychometrika**, Williamsburg, v.29, n.1, p.1-27, 1964.

LESLIE, J.F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.127-150, 1993.

LESLIE, J.F.; ZELLER, K.A. Heterokaryon incompatibility in fungi – more than just another way to die. **Journal of Genetics**, v.75, n.3, p.415-424, 1996.

LOGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: Educs, 2004. p.47-88.

MARTINEZ, S.P.; SNOWDON, R.; KÜHNEMANN, J.P. Variability of Cuban and international of *Alternaria solani* from different host and localities: AFLP genetic analysis. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.399-409, 2004.

McDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Rev. Phytopathology**, v.40, p.349-379, 2002.

McDONALD, B.A.; McDERMOTT, J.M.; GOODWIN, S.B.; ALLARD, R.W. The population biology of host-pathogen interactions. **Annual Rev. Phytopathology**, v.27, p.77-94, 1989.

MEIJER, G.; MEGNEGNEAU, B.; LINDERS, E.G.A. Variability and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. **Mycology**, v.98, p.267-276, 1994.

MORRIS, P.F.; CONNOLLY, M.S.; CLAIR, A.S.T. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs **Mycology Res.**, v.104, n.3, p.286-292, 2000.

NITZAN, N.; HAZANOVSKY, M.; TAL, M.; TSOR, L. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of black dot on potato. **Phytopathology**, v.92, n.8, p.827-832, 2002.

PETRUNAK, D.M.; CHRIST, B.J. Isozyme variability in *Alternaria solani* and *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v.82, p.1343-1347, 1992.

PINTO, C.A.B.P.; FARIA, C.A.; LAMBERT, E.S. Potato clones resistance to early and late blight. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, n.2, p.189-196, 2002.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters Applied Microbiology**, v.1, n.1, p.17-20, 1985.

ROCA, M.M.G.; MACHADO, J.D.C.; VIEIRA, M.G.C.; DAVIDE, L.C.; ROCHA, M.L. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.1, p.16-20, 2004.

RODRIGUES-GUERRA, R.; RAMIREZ-RUEDA, M.T.; MARTINEZ, O.; SOMPSON, J. Variation in genotype, pathotype and anastomosis fusion between *Colletotrichum* spp. **Plant Pathology**, v.52, n.2, p.228-235, 2003.

RHOLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. VERSÃO 2.10. New York, 2000. 470p.

RUSSEL, P.F.; RAO, T.R. On habitat and association of species of anopheline larvae in south-eastern Madras. **Journal of. Malaria Institute India**, v.3, p.153-178, 1940.

SAUPE, S.J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p. 489-502, 2000.

SCHLEGE, L.R.H.J. **Encyclopedic dictionary of plant breeding and related subjects**. New York: Food Product, 2003. 320p.

SILVA, K.J.D. **Variabilidade entre isolados de *Phasaeoisariopsis griseola***. 2007. 153p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SIMMONS, E.G. *Alternaria* themes and variations (244–286), species on solanaceae. **Mycotaxon**, v.125, p.1–115, 2000.

STEVENSON, W.R. The potential impact of field resistance to early blight on fungicide inputs. **American Potato Journal**, v.71, n.5, p.317-324. 1994.

TSROR, L.; HAZANOVSKY M.; MORDECHI-LEBIUSH S.; SIVAN S. Aggressiveness of *Verticillium dahliae* isolates from different vegetative compatibility groups to potato and tomato. **Plant Pathology**, v.50, p.477-482, 2001.

WAALS, J.E. VAN der; KORSTEN, L.; SLIPPERS, B. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. **Plant Disease**, v.88, p.959–964, 2004.

WEIR, T.L.; HUFF D.R.; CHRIST, B.J. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. **Mycological**, v.90, p.813-821, 1998.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Médias dos isolados quanto à esporulação, os diâmetros das colônias em cada dia de medição e o índice de velocidade de crescimento micelial calculado.....	82
TABELA 2A	Matriz de 1 e 0 obtida pelas reações de compatibilidade micelial do confronto dos isolados de <i>A. solani</i> , dois a dois.....	84
TABELA 3A	Matriz de 1 e 0 obtida pelos padrões de bandas dos <i>primer</i> ISSR dos 60 isolados de <i>A. solani</i>	90

TABELA 1A Médias dos isolados quanto à esporulação, aos diâmetros das colônias em cada dia de medição e ao índice de velocidade de crescimento micelial calculado.

isolados	diâmetro da colônia				
	3dias	6dias	9dias	12dias	15dias
UFLA 01	2,60 b	3,85 c	6,35 d	8,40 b	9,15 B
UFLA 02	1,85 d	3,30 e	4,35 i	6,55 g	8,80 C
UFLA 03	1,80 d	2,65 g	5,90 e	6,95 f	9,05 B
UFLA 04	3,00 a	5,05 a	6,90 c	8,60 b	8,85 c
UFLA 05	3,15 a	4,60 b	5,95 e	7,45 e	9,70 a
UFLA 06	3,10 a	4,05 c	6,80 c	7,80 d	8,35 c
UFLA 07	2,85 a	3,45 e	5,90 e	8,15 c	9,05 b
UFLA 12	1,55 d	2,10 h	4,35 i	7,80 d	8,85 c
UFLA 13	1,80 d	2,75 g	4,15 i	7,25 e	8,70 c
UFLA 14	1,55 d	2,80 g	3,30 k	4,35 j	6,45 e
UFLA 18	2,25 c	3,55 d	6,00 e	7,45 e	9,15 b
UFLA 19	1,75 d	3,10 f	5,75 e	7,30 e	9,15 b
UFLA 20	1,40 e	2,85 g	4,95 g	6,45 g	9,20 b
UFLA 21	3,15 a	4,95 a	7,70 a	9,00 a	9,55 a
UFLA 22	2,55 b	4,85 a	6,40 d	7,80 d	9,45 a
UFLA 23	3,05 a	4,10 c	5,85 e	8,05 c	8,80 c
UFLA 24	2,50 b	3,15 f	5,45 f	6,45 g	9,40 a
UFLA 25	3,05 a	3,60 d	5,70 e	6,75 f	9,65 a
UFLA 26	2,20 c	4,35 b	5,70 e	7,95 c	9,05 b
UFLA 27	3,05 a	4,40 b	7,05 b	8,80 a	9,65 a
UFLA 28	2,80 a	3,65 d	6,35 d	7,15 e	8,80 c
UFLA 29	2,55 b	3,65 d	6,55 d	8,00 c	8,85 c
UFLA 30	1,85 d	2,50 g	3,60 j	6,55 g	9,55 a
UFLA 31	1,55 d	2,20 h	3,30 k	6,85 f	8,85 c
UFLA 32	2,50 b	3,35 e	5,35 f	6,40 g	9,65 a
UFLA 33	1,15 e	3,10 f	6,45 d	7,95 c	9,10 b
UFLA 34	1,05 e	2,45 g	5,50 f	8,00 c	9,55 a
UFLA 51	2,35 c	4,25 b	5,30 f	6,40 g	8,55 c
UFLA 52	1,25 e	2,10 h	3,75 j	6,05 h	7,10 d
UFLA 53	1,00 e	2,55 g	4,55 h	7,00 f	9,05 b

“...continua...”

“TABELA 1A, Cont.”

isolados	diâmetro da colônia				
	3dias	6dias	9dias	12dias	15dias
UFLA 54	2,15 c	3,80 c	4,60 h	5,65 i	8,95 b
UFLA 55	2,55 b	3,80 c	4,75 g	6,70 f	9,05 b
UFLA 56	2,00 d	2,65 g	4,95 g	8,05 c	8,90 c
UFLA 57	1,55 d	2,80 g	5,85 e	6,45 g	8,85 c
UFLA 58	1,80 d	3,85 c	6,20 e	7,45 e	9,05 b
UFLA 59	1,65 d	3,15 f	5,70 e	7,60 d	9,15 b
UFLA 60	2,25 c	2,95 f	5,45 f	6,40 g	9,10 b
UFLA 61	2,20 c	3,45 e	5,85 e	6,60 g	8,75 c
UFLA 62	2,35 c	4,80 a	5,90 e	7,25 e	9,05 b

*médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott & Knott, a 5%.

TABELA 2A Matriz de 1 e 0, obtida pelas reações de compatibilidade micelial do confronto dos isolados de *A. solani* dois a dois.

Isolados	1																			2
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	0
1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
2	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
3	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1
4	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
5	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
6	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
7	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
8	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1
9	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1
10	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
11	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
12	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
13	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
14	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1
15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1
16	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
17	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
18	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
19	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
21	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
22	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
23	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
24	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
27	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
30	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
31	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
32	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
33	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
34	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
35	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
37	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1
38	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
41	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
43	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
49	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
51	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
52	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
53	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
54	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
55	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0
57	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
58	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

Isolado	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1
4	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
6	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
10	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
11	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
12	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
13	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
14	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
18	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1
19	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
21	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1
22	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
23	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
24	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
25	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1
26	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
28	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
29	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
30	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

Isolado	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
31	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
32	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
33	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
34	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1
35	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
36	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
37	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
38	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
39	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
40	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
41	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
42	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
43	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
44	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
45	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
46	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
47	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
48	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
49	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
50	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
51	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
52	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
54	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
55	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
56	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
57	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
58	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
59	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
60	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

Isol.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
4	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
6	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
7	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
8	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
9	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
10	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
11	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1
12	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
13	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
14	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1
15	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
16	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0
17	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
18	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
19	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
20	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
21	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
22	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
24	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
25	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
26	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
27	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1
28	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
29	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
30	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0

“...continua...”

“TABELA 2A, Cont.”

Isol.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
31	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
33	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
34	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
36	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0
37	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
38	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
39	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
40	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
41	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
42	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
43	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
44	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
45	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
46	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
47	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
48	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0
49	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0
50	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
51	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
52	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
53	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
54	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0
55	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
56	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
57	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
58	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1
59	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1

TABELA 3A. Matriz de 1 e 0 obtida pelos padrões de bandas dos *primer* ISSR, dos 60 isolados de *A. solani*.

<i>prime</i> <i>r</i>	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
CA 1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CA 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
CA 3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
CA 4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
CA 5	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0
	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0

“...continua...”

“TABELA 3A, Cont.”

<i>p</i>	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	
CA 1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
CA 2	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
CA 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
CA 4	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
CA 5	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	
CA 5	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	
	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	
	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	

“...continua...”

“TABELA 3A, Cont.”

<i>p</i>	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
CA6	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0		
	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	
	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
CA7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	
	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1		
	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	
	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	
CA8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0		
	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
CA9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	
	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	
	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	
	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	

“...continua...”

“TABELA 3A, Cont.”

<i>p</i>	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	
CA6	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	
	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
CA7	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	
	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	
	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
CA8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	
	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	
	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	
	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
CA9	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

“...continua...”

“TABELA 3A, Cont.”

<i>P</i>	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
CAC 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	
CAC 4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	
	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	
	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
CAC 5	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	
	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
CAC 6	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1

“...continua...”

“TABELA 3A, Cont.”

<i>P</i>	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	
CAC 1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
CAC 4	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
CAC 5	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAC 6	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	
	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	
	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	
	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	

“...continua...”

“TABELA 3A, Cont.”

<i>P</i>	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
CAC6	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
CAC 7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	
	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
CAC 10	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
CAC 11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
CAC 12	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAC 13	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

“...continua...”

“TABELA 3A, Cont.”

<i>P</i>	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	
CAC 7	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAC 10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
CAC 11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
CAC 12	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAC 13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ANEXO B	Página
FIGURA 1B Padrão de bandas ISSR com o <i>primer</i> CAC6. Nas 20 colunas estão os isolados de 1 a 20 e, nas linhas, os produtos de amplificação desses isolados de <i>Alternaria solani</i>	99

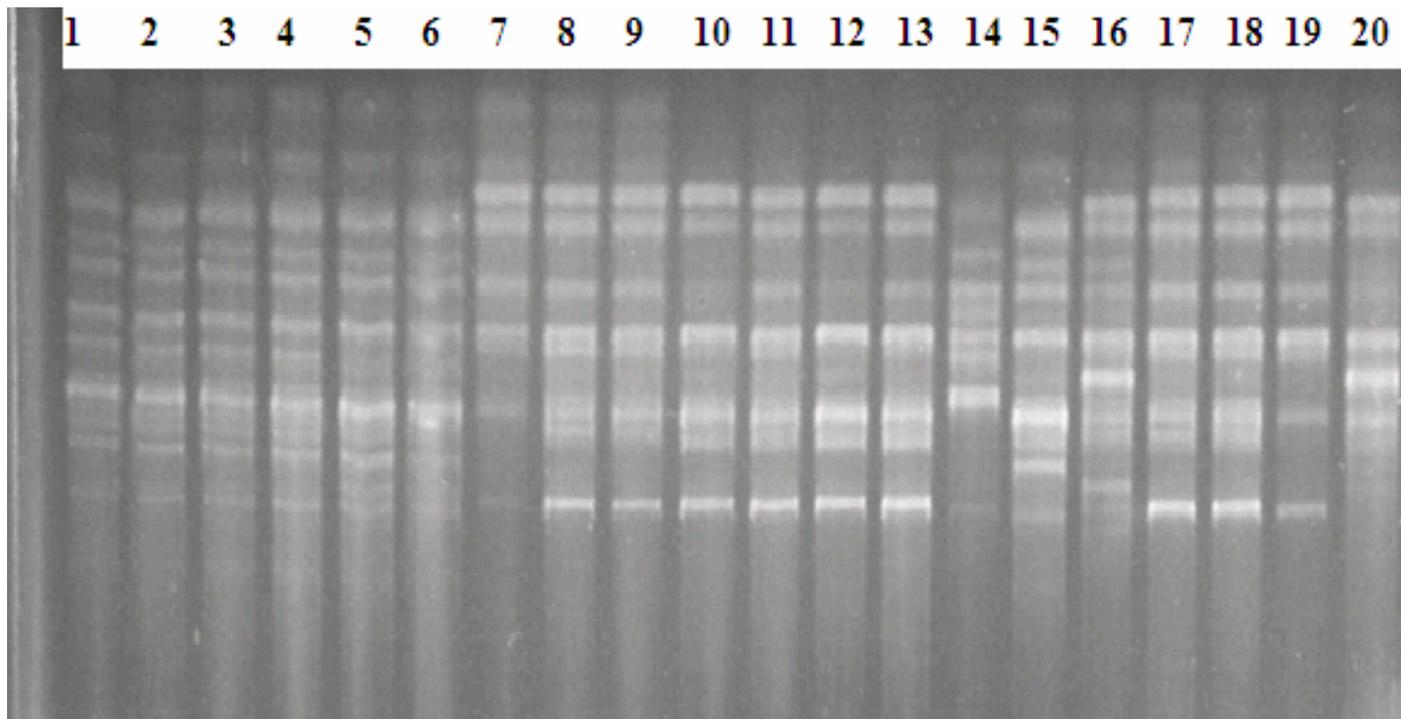


FIGURA 1B Padrão de bandas ISSR com o *primer* CAC6. Nas 20 colunas estão os isolados de 1 a 20 e, nas linhas, os produtos de amplificação desses isolados de *Alternaria solani*.