



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPALOGIA**

**DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Alternaria* spp. ASSOCIADOS AO
GÊNERO *Allium* NO BRASIL**

MAÍRA TEIXEIRA DE ANDRADE

Brasília – DF

2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Alternaria* spp. ASSOCIADOS
AO GÊNERO *Allium* NO BRASIL**

MAÍRA TEIXEIRA DE ANDRADE
ORIENTADOR: AILTON REIS

Dissertação apresentada ao
Departamento de Fitopatologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília, como
requisito para obtenção do grau de
Mestre em Fitopatologia

Brasília – DF
2011

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Pesquisador Dr. Ailton Reis. Apoio institucional da Embrapa Hortaliças e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca examinadora:

Dr. Ailton Reis (Orientador)

Universidade de Brasília - UnB

Embrapa Hortaliças CNPH

Dr. Helson Mário Martins do Vale

Universidade de Brasília - UnB

Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

"Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça." (Cora Coralina)

Aos meus pais Ana Maria e José Carlos, à
minha irmã Mariana e ao meu namorado
Thiago,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está acima de todas as coisas, pelo dom da vida.

Ao pesquisador Ailton Reis pela orientação, pelos grandes ensinamentos, pelas críticas construtivas e por acreditar na minha capacidade de executar o projeto.

À pesquisadora Maria Esther pela enorme paciência, amizade e pelos valiosos ensinamentos e explicações e ao pesquisador Leonardo Boiteux pelas ideias fornecidas ao trabalho.

Às instituições Embrapa Hortaliças e Universidade de Brasília pelo espaço e pela infraestrutura para o desenvolvimento do projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos professores do departamento de Fitopatologia: Alice Nagata, Carlos Uesugi, Mariza Ferreira, Mariza Sanches, José Carmine Dianese, Luís Eduardo Blum, Helson do Vale, Rita de Cássia, Renato Resende, Cleber Furlaneto pela contribuição na minha formação profissional, em especial ao Professor Café que me encaminhou para este projeto.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Fitopatologia, especialmente, César, Kamila, Ribamar e Silene.

Aos meus colegas de curso Andressa, Ana Paula, Cecília, Érica, Claudênia, Jessica, Justino, Liamar, Mônica, Mikhail, Kamila, Natália, Nara, Daniel, Esdras Henrique, Sandro, William, Eugênio, Marcelo, Fernanda, Ana Cristina, Gláucia, pelos momentos bons que passamos juntos e pelo apoio principalmente nos momentos difíceis de até altas horas no laboratório.

À amiga Maria do Desterro pela bondade, por passar muitos sábados comigo até tarde no laboratório, por sempre me ajudar a desvendar os mistérios das técnicas moleculares e pela grande amizade que levarei comigo para sempre.

Ao pessoal do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças: Luana, Helena, Fabiana, Izabela, Carielli, Mélodi, Edivânio, Niday, Rayane, Josineide, Maurício, Nadson, Fred, Higor, pelos inúmeros momentos de descontração (risadas e piadinhas) e pela ajuda. Obrigada por tornarem o ambiente de trabalho bastante agradável.

À Cléia e Elenice que se tornaram grandes amigas, por toda a ajuda no dia a dia, pelos conselhos, por enxugarem minhas lágrimas, pelas sugestões e pelo imenso apoio durante a execução do trabalho.

Ao técnico do laboratório de Melhoramento Antônio Francisco Costa (Chico). Obrigada por toda paciência, por todos os ensinamentos e por ter me aguentado durante muito tempo com todo o meu desengonço.

À minha grande amiga de muitos anos e colega de mestrado Mariana Martins. Obrigada por todo o carinho, por me dar forças quando desanimada. Não me esquecerei nunca de todos os biscoitos de queijo e cafezinhos e nem das madrugadas no laboratório procurando esôfago de nematóide.

Às minhas amadas amigas de infância Carolina Pedroso, Ticiane Telles, Priscila Timponi e Gabriela Maria pela eterna amizade, por estarem sempre me apoiando e incentivando as minhas decisões. Por ouvirem meus desabafos e me ajudarem a prosseguir. Por não se importarem com a minha pequena ausência algumas vezes. Vocês fizeram toda a diferença.

Ao meu querido namorado Thiago que participou ativamente de todas as etapas do mestrado. Por me dar amor, carinho, força e compreensão. Pelas muitas palavras de incentivo, pelo ombro para chorar, por aguentar os ataques de desespero e estresse, por me ajudar a levantar diante de cada tombo, pela enorme paciência. Por estar do meu lado sempre e principalmente nas horas mais difíceis. Pela grande motivação dada, por me aconselhar e me fazer acreditar que sou forte e capaz. Obrigada do fundo do meu coração.

Aos meus pais José Carlos e Ana Maria, meus grandes exemplos de vida, por me apoiarem em minhas decisões e pelo imenso amor e carinho que sempre me deram durante todos esses anos. Obrigada pela credibilidade e confiança.

A minha estimada irmã Mariana por todo incentivo e motivação dados a mim desde o início de minha jornada e por toda a ajuda e paciência, principalmente nos momentos de estresse.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
AGRADECIMENTOS.....	iv
CAPÍTULO 1.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1. Família Alliaceae.....	2
2. Gênero <i>Allium</i>	2
3. Cultivo e domesticação das principais hortaliças do gênero <i>Allium</i>	3
4. Importância econômica de hortaliças do gênero <i>Allium</i>	3
4.1. Cebola.....	3
4.2. Alho.....	4
4.3. Alho-poró.....	4
4.4. Cebolinha.....	5
5. Mancha-púrpura ou queima das folhas das aliáceas.....	6
5.1. Agente causal da mancha-púrpura.....	6
5.2. Controle da mancha-púrpura.....	7
6. O gênero <i>Alternaria</i>	8
6.1. Origem e taxonomia.....	8
6.2. Morfologia e morfometria do gênero <i>Alternaria</i>	9
6.3. Espécies de <i>Alternaria</i>	11
7. Caracterização molecular de populações de fungos.....	14
8. Análises filogenéticas em fungos.....	15
9. Análises filogenéticas no gênero <i>Alternaria</i>	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO 2.....	27
DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE <i>Alternaria</i> ASSOCIADOS AO GÊNERO <i>Allium</i> NO BRASIL.....	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	32

Recuperação dos isolados.....	32
Preparação do micélio e extração de DNA.....	32
Amplificação do DNA.....	33
Reações de sequenciamento e análise das sequências.....	34
2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	35
RESULTADOS.....	40
Análise com a região ITS.....	40
Análise com o gene <i>Alt a1</i>	46
Morfologia e morfometria dos isolados.....	50
DISCUSSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sintomas de mancha púrpura em alho (A) e cebola (B).....	8
Figura 2: Esquema dos três genes do rDNA e regiões de espaçamento interno (ITS) e intergênicas (IGS), e as setas representam <i>primers</i> universais que amplificam as regiões (White <i>et al.</i> , 1990).....	19
Figura 3: Produto da amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica o amplicom único de tamanho aproximado de 530 pb.	42
Figura 4: Árvore consenso obtida pelo método de parcimônia com busca heurística utilizando o alinhamento da região ITS1-5.8S - ITS2. Os valores numéricos representam o índice bootstrap após 1000 repetições. As sequências das espécies <i>P. herbarum</i> e <i>S. callistephi</i> foram utilizadas como grupos externos. No subgrupo de <i>A. porri</i> foram omitidas as sequências idênticas a esta espécie.	43
Figura 5: Alinhamento dos isolados e espécies do GenBank na região ITS 1 do rDNA. Em vermelho, nucleotídeos idênticos e em branco os variáveis.	44
Figura 6: Alinhamento dos isolados e espécies do GenBank na região 5.8S do rDNA indicando reduzida variação.....	45
Figura 7: Produto da reamplificação do fragmento do gene <i>Alt a1</i> analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica o amplicom único de tamanho aproximado de 500 pb.	47
Figura 8: Árvore consenso obtida pelo método de parcimônia com busca heurística utilizando o alinhamento em uma região do gene <i>Alt a1</i> . Os valores numéricos representam o índice bootstrap após 1000 repetições. As sequências das espécies <i>P. herbarum</i> e <i>S. callistephi</i> foram utilizadas como grupos externos.....	48
Figura 9: Alinhamento mostrando a posição do íntron do gene <i>Alt a1</i> presente em algumas espécies de <i>Alternaria</i> e nos isolados. A chave as setas mostram a região do íntron.....	49
Figura 10: Fotos dos isolados EH 16 (A), EH 43 (B), EH 272 (C), EH 602 (D), EH 603 (E), EH 642 (F).	53
Figura 11: Fotos dos isolados EH 823 (G), EH 996 (H), EH 1167 (I), EH 1227 (J), EH 2084 (K).	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Relação de isolados de <i>Alternaria</i> utilizados nas análises com <i>Alt a1</i> e ITS 37	
Tabela 2: Hospedeira, local e data dos isolados de <i>Alternaria</i> caracterizados morfológicamente.	39
Tabela 3: Dimensões das estruturas de isolados de <i>Alternaria</i> , *ten= <i>A. tenuissima</i> , al= <i>A. alternata</i> , lon= <i>A. longipes</i> , crassa= <i>A. crassa</i>	52

CAPÍTULO 1
Revisão de literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1. Família Alliaceae

A família Alliaceae compreende 13 gêneros e 645 espécies, incluindo hortaliças cultivadas e ornamentais de importância econômica tais como o alho (*Allium sativum* L.), a cebola (*A. cepa* L.), a cebolinha (*A. fistulosum* L.) e o alho-poró (*A. ampeloprasum* var. *porrum* (L.) J. Gay) entre outras (Boiteux & Melo, 2004). Esta família é caracterizada por espécies bianuais e geófitas, desprovidas de caules ou com caules curtos e intumescidos. O caule forma, algumas vezes, bulbo e rizomas tuberosos envolvidos por bainha, com folhas basais que podem ser lineares, filiformes, lanceoladas ou ovaladas (Rahn, 1998). As flores são hermafroditas e actinomorfas com um odor peculiar que é uma característica da maioria dos representantes da família (Wasum *et al.*, 2007).

2. Gênero *Allium*

O gênero *Allium* é o mais numeroso da família Alliaceae, contendo aproximadamente 55 espécies herbáceas que apresentam órgãos subterrâneos de reserva. As espécies desse gênero são bastante difundidas em todo o mundo distribuindo-se do Círculo Polar Ártico até Europa, Ásia, América do Norte e África (Rahn, 1998). Dentre essas, 11 são usadas como hortaliças nas quais as partes comestíveis são os bulbos e/ou folhas (Almeida, 2006). Inicialmente, o gênero *Allium* e outros relacionados foram classificados dentro da família Liliaceae (Melchior, 1964). Mais tarde, este grupo foi transferido para a família Amaryllidaceae. Dados moleculares baseados em marcadores RAPD e na sequência de segmentos do DNA do cloroplasto revelaram uma relação monofilética entre as espécies do gênero *Allium* e diferenças significativas permitiram classificá-las dentro de uma família distinta, a Alliaceae (Fritsch & Friesen, 2002).

3. Cultivo e domesticação das principais hortaliças do gênero *Allium*

As espécies do gênero *Allium* são amplamente difundidas em todo o mundo. A cebola (*A. cepa*) tem sido cultivada a mais de 5000 anos, sendo uma das mais antigas hortaliças empregadas na dieta humana. A cebola e o alho (*A. sativum*) são originárias da Ásia Central (Turquia, Afeganistão, Paquistão, nordeste da China e Mongólia). A domesticação dessas espécies foi relatada nas regiões montanhosas da Turcomênia, Uzbequistão, Afeganistão e Paquistão. Atualmente, são desconhecidas espécies silvestres de cebola (Brewster, 1994). O alho-poró apresenta uma situação distinta, pois plantas selvagens de *A. ampeloprasum* são encontradas desde Ásia Menor até o leste do Irã, esporadicamente na Califórnia e em outras regiões da América e do continente europeu. A cebolinha (*A. fistulosum*) foi historicamente a principal cultura do gênero *Allium* em países do continente asiático tais como China e Japão, aonde vem sendo utilizada a mais de 2000 anos (Almeida, 2006; Brewster, 1994; Fritsch & Friesen, 2002). A cebolinha foi domesticada provavelmente no noroeste da China e a maior variabilidade morfológica pode ser encontrada na China, na Coreia e no Japão (Friesen *et al.*, 1999).

4. Importância econômica de hortaliças do gênero *Allium*

4.1. Cebola (*A. cepa*)

A cebola está entre as hortaliças de maior importância econômica no mundo juntamente com o tomate e a batata. Esta hortaliça apresenta grande difusão no mundo devido a sua variada utilização *in natura*, bem como em forma de tempero e de condimento. Além de ser uma especiaria cosmopolita, a cebola é também muito utilizada na culinária regional do Brasil (Boiteux & Melo, 2004; Filgueira, 2008). A cebola é uma planta monocotiledônea herbácea de ciclo vegetativo bienal. É valorizada pelo seu sabor e aroma distintos, constituindo uma importante fonte de carboidratos, incluindo açúcares simples e, além disso, quase não apresenta gordura (Almeida, 2006). A China, os Estados Unidos e a Turquia são os maiores produtores mundiais, estando o Brasil em sétimo lugar (FAOSTAT, 2009). O cultivo da cebola vem crescendo ao longo dos anos no Brasil. A produção nacional de cebola atingiu em 2009 a marca de 1.511.853 toneladas, ocupando a terceira posição no 'ranking' nacional de hortaliças,

ficando atrás apenas do tomate e da batata. A área cultivada de cebola no mesmo ano foi de 66.013 hectares. No entanto, os níveis de produtividade ainda permanecem baixos, em torno de 23 t/ha. A região Sul do país é responsável por aproximadamente 67% da produção brasileira com destaque para os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Uma significativa expansão na produção foi observada em anos recentes na região Centro-oeste e no Cerrado mineiro, em especial, em São Gotardo-MG (IBGE, 2011; Embrapa, 2011).

4.2. Alho (*A. sativum*)

O alho é utilizado no mundo todo como tempero e também como planta medicinal. Pode ser comercializado seco ou desidratado e é consumido normalmente cozido (Almeida, 2006). É uma planta tenra que apresenta folhas alongadas e estreitas, sendo a parte utilizável o bulbo, que é composto por bulbilhos, os quais são ricos em amido e substâncias aromáticas com valor condimentar, medicinal e nutricional (Filgueira, 2008). No Brasil, a cultura do alho é de extrema importância devido à área cultivada e por utilizar muita mão-de-obra ao longo da produção. Isso faz com que a cultura figure entre as principais hortaliças cultivadas (Mota *et al.*, 2005). A China é o país que mais produz, detendo 85% da produção total e é também o que mais exporta. A Rússia e os Estados Unidos também se destacam no cenário mundial. No Brasil, a área plantada no ano de 2009 foi de 10.063 ha e a produção de 86.752 toneladas (IBGE, 2011). O país ainda não supre toda a necessidade do mercado interno já que importa alho da Argentina e da China. A maior parte da produção nacional se concentra na região Sul. O segundo lugar é ocupado pela região Sudeste que detém 25.669 toneladas do total produzido no país. O Centro-Oeste tem tido grande avanço no cultivo de alho nos últimos anos, destacando-se o estado de Goiás. O estado de Minas Gerais é o que apresenta a maior produção devido à maior produtividade das lavouras neste local. (IBGE, 2011; Embrapa, 2011).

4.3. Alho-poró (*A. ampeloprasum* var. *porrum*)

A cultura do alho-poró, dentre as Aliáceas, é a menos utilizada no mercado nacional para consumo *in natura*. No entanto, a demanda da agroindústria é crescente. A planta é fenotipicamente muito similar ao alho sendo, no entanto, mais vigorosa, com folhas mais largas e mais alongadas de coloração verde-escura. É caracterizada pelo longo pseudocaule, que pode ser estiolado tornando-se branco e a base da planta com bulbo simples, um dos fatores que o difere do alho comum (Filgueira, 2008). A produção brasileira de alho-poró, em 2006, foi de 5.864 toneladas. O Sudeste é a maior região produtora. No estado de São Paulo concentra-se quase 50% da produção total, ficando em segundo lugar o Rio de Janeiro (IBGE, 2006; Embrapa, 2011).

4.4. Cebolinha (*Allium fistulosum*)

A cebolinha pertence ao mesmo subgênero ou seção botânica da cebola. Apresenta morfologia semelhante a da cebola, contudo é menor e produz bulbos mais finos e compridos, que originam uma touceira devido ao intenso perfilhamento. Essa hortaliça é bastante rústica sendo pouco exigente em solo e clima, além disso, adapta-se a uma ampla faixa de temperaturas (Almeida, 2006; Filgueira, 2008). Dados do IBGE, 2006, revelam que a produção de cebolinha foi de 99.952 toneladas distribuídas em 42.391 estabelecimentos rurais (Embrapa, 2011).

5. Doenças em Aliáceas

Dentre os fatores que podem ocasionar perdas nas culturas do alho e da cebola, as doenças figuram como um dos mais importantes. Bactérias, vírus e nematóides podem infectar as culturas e causar doenças. No entanto, a maioria delas é causada por fungos tais como *Puccinia porri* (ferrugem), *Glomerella cingulata* (antracnose), *Peronospora destructor* (míldio), *Botrytis squamosa* (queima das pontas) e outras. Entre as doenças fúngicas, a mancha-púrpura, cujo agente causal é o fungo *Alternaria porri*, se destaca pela ocorrência em todas as regiões do Brasil onde se cultivam alho e cebola e por causar danos à produção de até 70% (Massola Jr *et al*, 2005; Miller & Lacy, 1995)

5.1. Mancha-púrpura ou queima das folhas das aliáceas

A mancha-púrpura já foi relatada afetando cebola (*A. cepa*), alho (*A. sativum*), alho-poró (*A. ampeloprasum*) e cebolinha (*A. fistulosum*) em todas as regiões do mundo onde estas hortaliças são cultivadas (Miller & Lacy, 1995). O fungo *Alternaria porri* (Ellis) tem sido citado como principal agente causal da mancha-púrpura. A doença é mais severa em áreas de clima quente e úmido. No Brasil é uma das mais importantes doenças de parte aérea do alho e da cebola, pois reduz drasticamente a produção e a conservação dos bulbos (Massola Jr *et al.*, 2005). Além disso, a mancha púrpura causa grandes prejuízos aos produtores podendo levar a perdas de 50 a 100% (Reis & Henz, 2009). Os sintomas iniciais surgem nas folhas e nas hastes (escapos) florais como pequenas pontuações (2-3 mm), com aparência aquosa e formato irregular que rapidamente desenvolvem um centro de coloração esbranquiçada. Com a evolução da doença e sob condições favoráveis, as lesões aumentam de tamanho e adquirem cor púrpura, contendo anéis concêntricos mais escuros correspondentes às frutificações do fungo. As lesões podem, ainda, apresentar um halo amarelo. O coalescimento das manchas induz sintomas de enrugamento e murcha das folhas (Figura 1). Podem ocorrer queimas restritas as pontas das folhas quando o ataque da doença começa na extremidade superior da lamina foliar (Massola Jr *et al.*, 2005; Miller & Lacy, 1995; Reis & Henz, 2009). Os bulbos, quando infectados durante o ciclo de cultivo e/ou colheita, apresentam podridão semi-aquosa e enrugamento de suas escamas frescas. Os tecidos afetados ficam com coloração amarelada resultante de um pigmento liberado pelo patógeno que se difunde nas escamas tornando-se vermelhos com o tempo. Com o desenvolvimento do micélio do fungo nos bulbos afetados estes ficam com coloração bem escura. Geralmente, algumas escamas mais superficiais são atacadas pelo patógeno, no entanto, às vezes, o ataque pode ocorrer no bulbo inteiro (Massola Jr *et al.*, 2005).

5.2. Agente causal da mancha-púrpura

Alternaria porri (Ellis) apresenta conidióforos dispostos em grupo ou solitários, retos ou flexionados, septados de coloração palha a marrom claro com uma ou mais cicatrizes bem distintas. Os conídios, são formados solitariamente no ápice do

conidióforo, são curvos ou retos e obclavados, podendo conter septos longitudinais e transversais. Os conídios apresentam rostro de tamanho variável, simples ou bifurcado. A forma sexuada ainda não foi encontrada na natureza (Miller & Lacy, 1995; Simmons, 2007; Massola Jr *et al.*, 2005). A sobrevivência da *A. porri* de um cultivo para o outro se dá pela forma de micélio ou esporos em restos culturais. Em condições de alta umidade relativa ocorre profusa esporulação sobre os restos de cultura. Os esporos são disseminados pelo vento, água de irrigação, respingos de chuva e, dessa forma, atingem facilmente as folhas das plantas em desenvolvimento no campo. Uma vez sobre os esporos germinam, formam apressório e penetram diretamente, através de ferimentos ou ainda pelos estômatos. A temperatura ótima para desenvolvimento da doença é 21 a 30° C. Folhas mais velhas são mais suscetíveis quando comparadas às folhas novas. Essas últimas contêm camadas mais espessas de cutícula o que dificulta penetração do fungo. Uma epidemia em lavouras novas pode se iniciar com inóculo vindo de plantações próximas carregado pelo vento. Ferimentos causados por insetos como *Thrips tabaci* servem de porta-entrada para o patógeno. A semente pode também estar infectada pelo fungo, porém, a relevância epidemiológica dessa forma de disseminação ainda não está bem definida (Agrios, 2005; Massola Jr *et al.*, 2005; Reis & Henz, 2009).

5.3. Controle da mancha-púrpura

O controle da mancha-púrpura é dependente do uso de fungicidas, uma vez que a maioria das cultivares comerciais no Brasil não apresentam níveis de resistência desejáveis. Rotação de culturas, eliminação de restos culturais contaminados, aração profunda, diminuição do período de molhamento foliar, boa drenagem do solo e menor densidade de plantas ajudam na redução do inóculo em condições de cultivo (Massola Jr *et al.*, 2005). É possível realizar a prevenção da doença com fungicidas à base de mancozeb, chlorothalonil, propineb, iprodione e azoxistrobin (MAPA, 2011). É recomendada a rotação de ingredientes ativos, visando evitar o surgimento de isolados com tolerância aos diferentes produtos (Reis & Henz, 2009). Nos últimos anos, produtores de alho e cebola vêm se deparando com grandes dificuldades em relação ao controle da mancha-púrpura. Esse problema pode estar relacionado a falhas na metodologia de aplicação de fungicidas, modificações na população do patógeno (condicionadas pelo uso intensivo de fungicidas específicos) ou os dois fatores atuando

conjuntamente. No tocante à forma de aplicação do fungicida, é necessário haver boa cobertura aderência do produto às folhas das plantas. As folhas de alho e cebola são estreitas e eretas, além de conterem uma quantidade mais elevada de cera, o que dificulta a adesão do produto na superfície; o uso, portanto, de um espalhante adesivo auxiliaria na eficiência do controle químico. Em relação a mudanças na população do fungo, para evitar o surgimento de resistência deve-se seguir corretamente as dosagens indicadas pelo fabricante e o controle não deve ser baseado em apenas um princípio ativo (Reis & Henz, 2009). Domingues *et al.* (2004) testaram diversos ingredientes ativos na cultivar de alho Roxo-Pérola e constataram níveis de controle pela aplicação de fungicida variando de 53,4% a 82,5%. Os fungicidas estrobilurinas azoxystrobin e kresoxin methyl foram aqueles que mais se destacaram. Tebuconazole, iprodione e pyrimethanil também obtiveram um bom desempenho em relação ao controle da doença. Outro trabalho desenvolvido por Palangana *et al.* (2008), visando controlar a mancha púrpura na cultura da cebola observou que tetraconazol proporcionou as melhores produções e eficiência de controle nas dosagens de 50, 75, 100 e 200 mL i.a/100L.



Figura 1: Sintomas de mancha púrpura em alho (A) e cebola (B)

6. O gênero *Alternaria*

6.1. Origem e taxonomia

Alternaria é um gênero de fungos cosmopolitas, sendo que muitas espécies estão presentes no solo como saprófitas associadas com partes mortas de plantas. Esses fungos se desenvolvem em condições típicas de regiões tropicais, caracterizadas por clima quente e úmido e ainda são resistentes a baixas temperaturas ou temperaturas

elevadas. Essa grande adaptabilidade torna as espécies de *Alternaria* tolerantes a ambientes desfavoráveis, o que explica a ocorrência do patógeno mundialmente (Rotem, 1994). Os fungos deste gênero fazem parte também da microbiota aérea e podem estar presentes em sementes. Esses organismos podem também ser encontrados em poeira doméstica o que caracteriza o gênero como um alergênico importante. Estão incluídas no gênero, espécies parasitas de uma flora diversificada de plantas cultivadas e daninhas (Simmons, 1995). Representantes desse gênero são abundantes em tecidos de plantas tanto vivas como em decomposição e as espécies mais bem conhecidas são parasitas invasivos e patógenos de inúmeros exemplares de plantas em todas as regiões habitáveis do planeta (Simmons, 2007). As estimativas do número de espécies do gênero variam muito, além disso, os dados específicos são difíceis de avaliar devido à proliferação de sinônimos nomenclaturais de validação duvidosa (Simmons, 2007). O gênero *Alternaria* é mitospórico cuja forma sexual da maioria das espécies ainda não é conhecida. (Rotem, 1994; Simmons 1995). O gênero foi descrito em 1816 por Nees, sendo *Alternaria alternata* a espécie-tipo (Rotem, 1994). Todos os teleomorfos conhecidos de *Alternaria* são membros do gênero ascomiceto *Lewia* Barr & Simmons (Simmons, 2007) e somente em seis, dentre muitas outras espécies de *Alternaria* e relacionadas, foi encontrado o estágio sexual (Simmons, 1986; 1990; Hawksworth *et al.*, 1995). *Lewia* está enquadrado na divisão Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Pleosporales, família Pleosporaceae (Rotem, 1994; Simmons 1995).

6.2. Morfologia e morfometria do gênero *Alternaria*

As espécies de *Alternaria* apresentam conídios muriformes, de coloração escura, tipicamente obclavados, algumas vezes com pontas abruptamente afiladas, formando um rostro na extremidade distal. Os conídios podem ser formados em cadeias simples ou ramificadas ou ainda solitariamente. Algumas espécies têm falsos rostros que resultam da germinação do conídio funcionando como célula conidiogênica para o conídio seguinte de uma cadeia germinativa (Ellis, 1971). Apenas a parede interna da célula conidiogênica participa da formação dos conídios (conidiogênese politrética). Os conidióforos são solitários, eretos ou subdecumbentes, septados, simples ou ramificados, escuros e, muitas vezes, geniculados; a ponta do conidióforo possui o mesmo diâmetro de suas outras células (Simmons, 1995).

A classificação e identificação de espécies de *Alternaria* se baseiam principalmente em características morfológicas de conídios e padrões de conidiogênese. Usando esse critério, as espécies têm sido descritas e muitas foram colocadas em um dos vários grupos de espécies com base em características comuns de esporulação (Simmons, 1992). Este autor organizou o gênero em número de espécies-grupo cada qual com suas espécies representativas. Por exemplo, o grupo da *alternata* incluiu espécies com esporos em cadeia pequenas assim como ocorre em *A. alternata*; já o grupo da *porri* abrange espécies que contém esporos largos, com rostros longos e não dispostos em cadeia como o de *A. porri*. Outros grupos de espécies incluem o grupo *cheiranthi* que é composto pelas espécies que apresentam conídios grandes, escuros ou pigmentados que perdem o rostro proeminente e são produzidos solitariamente ou em cadeia com dois ou, raramente, três conídios. Há ainda os grupos-específicos *brassissicola*, *infectoria* e *tenuissima* (Simmons, 1995).

As espécies podem ser separadas pela morfologia do conídio; disposto em cadeia ou solitário; e segregadas em diversos grupos de acordo com o número de esporos contidos na cadeia. A existência ou não de cadeia é bastante influenciada pelas condições de crescimento, ou seja, estando o patógeno em meio de cultura ou na hospedeira. Por exemplo, *A. brassicae* quase nunca forma cadeia na planta, no entanto, forma pequenas cadeias em cultura (Rotem, 1994). A presença de conídios dispostos em cadeia é uma das muitas normas empregadas na identificação de espécies, assim como forma do conídio, septação e tamanho, a característica do rostro do conídio, as dimensões dos conidióforos, a gama de hospedeiras de espécies patogênicas e propriedades fisiológicas específicas (Neegard, 1945). Para a identificação de espécies individualmente, alguns critérios morfológicos são mais importantes do que outros, como, por exemplo, o aspecto do rostro auxilia a distinguir claramente espécies diferentes, porém não separa espécies similares. Por outro lado, a dimensão do corpo do esporo, incluindo o rostro, é considerada a característica de maior relevância de determinadas espécies. A largura do conídio na parte mais larga aparenta ser menos importante do que o comprimento, sendo que conídios de inúmeras espécies apresentam largura semelhante, mas variam bastante no comprimento; assim como no caso do comprimento dos conidióforos (Rotem, 1994).

Neegard (1945) baseando-se na formação de cadeias separou as espécies em três grandes grupos, *Longicatenatae* (conídios formados em cadeias longas sem rostro ou

com rostro pequeno como em *A. alternata*); *Brevicatenatae* (conídios em cadeia de 3 a 5 esporos com rostros bastante curtos a muito longo, como em *A. tenuissima*) e *Noncatenatae* (conídios solitários e normalmente sem rostro como em *A. helianthi* e raramente com rostros longos como em *A. solani*).

Outros gêneros fúngicos, como *Stemphylium*, *Ulocladium* e *Macrosporium* também possuem conídios muriformes e escuros (Elliot, 1917; Simmons, 1967; Wiltshire, 1933), a morfologia desses conídios são semelhantes aos de algumas espécies de *Alternaria* e a similaridade no tamanho e forma entre membros desses gêneros têm complicado a classificação de certas espécies bem como a identificação prática de alguns membros fitopatogênicos dos gêneros (Pryor & Gilbertson, 2000).

6.3. Espécies de *Alternaria*

As espécies de *Alternaria* são parasitas de plantas vivas bem como saprofíticas em substratos orgânicos. Há grande variação morfológica entre os membros do gênero. As espécies patogênicas a culturas com grande importância econômica apresentam diferenças morfológicas entre si (Rotem, 1994; Simmons, 2007). Abaixo serão listadas algumas dessas espécies com importância agrônômica e suas características morfológicas.

Alternaria alternata produz cadeias com até 20 conídios. Os primeiros usualmente permanecem longos e elípticos até a maturação; os demais conídios produzidos depois se tornam ovóides e elipsóides. Os conídios elípticos produzidos inicialmente têm 25-30 x 5-9 μm , com 4-7 septos transversais e pouco ou nenhum septo longitudinal. Os esporos produzidos mais tarde apresentam 7-25 x 5-12 μm , com 1-7 septos transversais e quase nenhum longitudinal. Os conídios surgem oliváceos em uma massa verde ou marrom acinzentada quando examinados em ácido láctico; eles perdem o tom esverdeado em poucos dias e exibem um tom pálido a amarelo-dourado (Simmons, 2007).

Já *A. dauci* apresenta conidióforos eretos com comprimento de 30-100 μm e largura de 5-7 μm . Os esporos são predominantemente solitários, entretanto um conídio primário pode ocasionalmente formar um conidióforo robusto secundário e um subsequente conídio secundário com um rostro estreito. Os conídios mais jovens têm formato ovóide e não chegam a medir 20 μm ; o primeiro septo transversal é formado ao

mesmo tempo do rostro estreito apical com até 50 μm de comprimento. O alargamento do conídio e a extensão do rostro permanecem simultâneos até que uma alta porcentagem de conídios alcance um tamanho de 65-115 x 15-22 μm (corpo do conídio) e com um rostro principal de 200-275 μm . O formato dos conídios maduros é de elipsóide longo a obclavado com 8-13 septos transversais e geralmente um ou às vezes 2 ou 3 longitudinais. A coloração do conídio vai de amarelado à marrom escuro (Simmons, 2007).

A espécie *A. tenuissima*, por sua vez, produz conídios em cadeia, os primeiros possuem formato cônico da metade para baixo; somente septos transversais estão presentes nesses esporos que normalmente não ultrapassam 50 μm x 8 μm . Os conídios secundários são adicionados na cadeia e apresentam o corpo do conídio com rostro cônico longo, com todas as unidades exibindo esta característica. Os esporos maduros que contém somente septos transversais alcançam um tamanho de 32-45 μm x 11-13 μm . Os esporos muriformes ovoides com septos chegam a 32-45 μm x 14-18 μm . Os conídios obclavados, muriformes e septados contém 40-60 μm x 16-18 μm . O máximo comprimento de um conídio com um rostro cônico longo bem desenvolvido é de 64-72 μm . A coloração deles é dourado médio e apresentam ornamentações pontuais. Muitos representativos desta espécie são confusamente identificados com *A. alternata* (Simmons, 2007).

Ainda segundo Simmons (2007), os conídios de *A. longipes* são estreitos ovóides ou elipsoides, produzidos em cadeias simples com 10 a 15 conídios sem ramos laterais ou com 1-3 ramos de 1-7 conídios. Essas cadeias de conídios são muito abundantes. O corpo do conídio mede de 12 a 48 μm de comprimento por 5 a 14 μm de largura, com 3-8 septos transversais em nenhum longitudinal ou somente 1 ou 2. Os conidióforos primários chegam a medir 500 μm e são abundantes. O conídio terminal contém um conidióforo apical secundário que é septado e mede 30 x 3 μm . O conídio pode ser ornamentado ou liso e com coloração marrom oliva e não apresenta rostro.

Em *A. porri* a morfologia dos conídios é bastante variável. Os mais jovens apresentam formato ovóide, podendo ser mais amplos ou quase cilíndricos com uma célula apical bastante arredondada ou cônica, dispersados em hifas aéreas menores. Os conidióforos alcançam um tamanho de 140-175 x 8-10 μm , são robustos, geniculados com 1 a 2 sítios conidiogênicos e ramificados. Os conídios são solitários, produzindo longos rostros com forma de cone quando totalmente desenvolvidos. Esses rostros

produzidos em meio de cultura V8 são simples frequentemente com uma ramificação e raramente com duas; diminui rapidamente da largura da base. Os conídios contêm de 8 a 12 septos transversais e um longitudinal do 4° ao 7° segmento transversal. Os conídios com rostros simples alcançam 70 a 105 µm de comprimento e 19 a 24 µm de largura, somente o corpo, e o rostro pode ter de 95 a 160 µm. Já os que apresentam rostro ramificado alcançam 80-90 x 21µm com uma extensão do corpo cônico de 40-50µm antes de a ramificação ocorrer; os ramos têm de 100 a 115 µm de comprimento. A septação dos conídios é conspícua, o septo mais distante permanece visível com a inserção dos muitos septos transversais e poucos longitudinais. O principal septo transversal apresenta uma leve constrição em relação ao corpo do conídio e uma espessa quando comparado a matriz do septo mais distante. A coloração do conídio é de marrom médio a claro. As paredes exteriores são lisas ou às vezes com pontuações gerais (Simmons, 2007).

No Brasil, a espécie *A. porri* é a que normalmente tem sido relatada como causadora de doenças em plantas do gênero *Allium*. No entanto, segundo Simmons (2007) outras espécies infectam aliáceas no mundo como: *Alternaria vanuatuensis*, *A. alli*, *A. ascaloniae*, *A. cepulicola*, *A. iranica*, *A. palandui*, *A. prasonis*, *A. punctatum* e *A. tenuissima* var. *alliicola*. Essas espécies apresentam entre si pequenas diferenças morfológicas e foram todas relatadas em hospedeiras pertencentes ao gênero *Allium*. *Alternaria porri* e *A. alli* são as únicas que contêm bifurcação no rostro do conídio, sendo que na última pode haver até seis ramificações no rostro, característica fundamental que separou morfológicamente esta espécie de *A. porri*. Os esporos de *A. iranica*, por sua vez, são mais compridos que o de *A. porri* e apresentam mais de uma constrição ao longo deles, o comprimento do conídio vai de 80 a 110 µm e a largura de 17 a 29 µm, pode conter de 8 a 12 septos transversais um rostro maior que 100 µm. A esporulação de *A. prasonis* em meio de cultura constitui-se de pequenos aglomerados de cadeias ramificadas de conídios, as hifas aéreas se espalham por toda a colônia produzindo cadeias curtas ramificadas e os conídios são nitidamente menores quando comparados às demais espécies. *Alternaria vanuatuensis* forma conídios robustos com formato amplo, longo-ovóide quando maduros e os rostros, que vão de 72 a 96 µm, possuem praticamente o mesmo tamanho do corpo do conídio que pode apresentar de 80 a 88 µm de comprimento e uma largura de 18 a 26 µm (Simmons, 2007).

7. Caracterização molecular de populações de fungos

As populações de patógenos estão em constante adaptação às mudanças no meio ambiente para sobreviver. Nos ecossistemas agrícolas, tais mudanças e adaptações podem incluir a introdução de novos genes de resistência de planta hospedeira, aplicações de fungicidas e fertilizantes químicos, sistemas de irrigação e rotações de cultura. Nesse contexto, é importante desenvolver ferramentas de pesquisa que permitam monitorar essa habilidade dos patógenos em evoluir já que os sistemas agrícolas impõem forte seleção direcional sobre essas populações. Este conhecimento é importante porque as estratégias de controle devem ter não um indivíduo, mas sim uma ‘população alvo’ do patógeno para serem eficazes (McDonald, 1997).

Muitos fatores podem contribuir para modificações genéticas dentro das populações de fungos, como por exemplo, mutações, sistemas de reprodução, fluxo gênico ou migração, tamanho da população e seleção. A estrutura genética se refere à quantidade e distribuição da variação de genes dentro e entre esses grupos populacionais. Definir a estrutura genética populacional é, logicamente, o primeiro passo em estudos genéticos sobre fungos. A estrutura de uma porção de indivíduos reflete sua história evolutiva, bem como seu potencial para evoluir, já que ela é resultado da seleção natural que é revelada pela variação da composição genética entre os indivíduos (McDonald, 1997; McDonald & Linde, 2002). Hospedeiros e patógenos estão engajados em uma constante luta: os primeiros evoluindo para escapar da infecção dos patógenos e estes, por sua vez, se adaptando para vencer as defesas do hospedeiro (Aguileta, 2009). A distribuição espacial do hospedeiro e dos patógenos, bem como os fenótipos de resistência têm fornecido informações valiosas sobre a adaptação local ou inadaptação e, assim, sobre os processos de co-evolução (Kaltz *et al.*, 1999; Burdon & Thrall, 2000; Laine, 2006; Sicard *et al.*, 2007). Tratando-se de uma perspectiva evolucionária, o estudo da dinâmica populacional dos fungos patogênicos de plantas na região dos trópicos é um assunto de pesquisa interessante, considerando o elevado número de ciclos de vida do patógeno ao longo do ano e a ausência de condições ambientais adversas que podem levar à redução drástica da população (Lourenço Jr *et al.*, 2009). Como é comum na maioria dos organismos, fungos fitopatogênicos dependem também dos processos de migração e recombinação de genes como melhor fonte de variação da base genética. Dentro das espécies, o fluxo gênico entre as

populações suplementa esses processos como a disseminação de propágulos de uma área epidemiológica para outra ou de uma estação de cultivo à outra. Estudos de uma grande variedade de patógenos fúngicos têm destacado a importância de alguns desses mecanismos por trás dos grandes agrupamentos como fonte de diversidade (Burdon *et al.*, 1997).

As plantas em agroecossistemas são usualmente cultivadas em grandes grupos que apresentam estrutura genética uniforme, que contribui para aumentar a disponibilidade de recursos do hospedeiro para certas raças do patógeno, proporcionando a ampliação do tamanho da sua população (Barret *et al.*, 2008). Essas populações grandes, além de serem menos endógamas que populações menores, aumentam a diversidade genética pelo acúmulo de mutações, em consequência, o patógeno reage mais rápido à introdução de medidas de controle, como a utilização de novos fungicidas ou genes de resistência (Stukenbrock & McDonald, 2008).

Os métodos comumente utilizados para avaliar a variação nas populações incluem análises de virulência, compatibilidade vegetativa além de análises bioquímicas e moleculares (Leslie *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1993; Milgroom *et al.*, 1997; Van Der Waals, 2004). A escolha do marcador genético pode ter um impacto relevante na análise e interpretação dos dados. Até a metade da década de 1980, havia disponível para estudo de populações, marcadores de origem morfológica ou patológica, ou ainda aloenzimas. Para os fitopatógenos, costumava-se fazer inferências baseando-se na variabilidade de virulência observada dentro e entre as populações. Atualmente, diversos métodos estão disponíveis para detecção na variação da sequência de DNA qualquer que seja o organismo, pois as técnicas moleculares são mais vantajosas por serem aplicadas a quaisquer organismos cujas amostras de DNA de qualidade possam ser obtidas (Brown, 1996; McDonald & McDermott, 1993). A integração entre bioinformática e técnicas de genética molecular de populações é um caminho para analisar grupos de fungos que não apresentam etapa sexual conhecida, em particular aqueles que compõem conjuntos complexos de espécies ou linhagens (Taylor *et al.*, 1999).

8. Análises filogenéticas em fungos

A sistemática molecular tem revolucionado a visão sobre a evolução dos fungos. Recentes esforços de sequenciamento em larga escala resultaram em filogenias multi-*loci* bastante amplas que melhoraram significativamente o entendimento de relações filogenéticas entre fungos (Binder & Hibbett, 2002; Lumbsch *et al.* , 2004; Lutzoni *et al.* , 2004; James *et al.* , 2006). A disponibilidade de numerosas sequências de genoma de fungos fornece um grande número de genes que poderiam ser utilizados para filogenias robustas. No entanto, existem várias espécies cujo genoma não é completamente sequenciado. Neste caso, apenas um número limitado de fragmentos de DNA pode ser seriam também úteis na filogenia de espécies ainda não sequenciadas completamente (Aguileta, 2008).

Diversos fatores podem influenciar o desempenho de um gene em particular no desenvolvimento de uma filogenia robusta e válida, como o seu comprimento, sua taxa e modo de evolução e sua história demográfica e seletiva (Aguileta, 2008). A identificação de uma quantidade pequena de genes suficientes para construir uma filogenia robusta proporcionará uma economia nos custos e promoverá maior precisão. Além disso, irá permitir uma homogeneização do conjunto de dados que serão úteis na construção de árvores (Aguileta, 2008; Lutzoni *et al.* ,2004).

Análises de sequências do DNA ribossomal (rDNA) tornaram-se comuns na sistemática moderna e vem sendo utilizada para estabelecer relações de filogenia molecular dentro de muitos grupos de fungos (Miyamoto & Cracraft, 1991; Moritz & Hillis, 1990; White *et al.* , 1990). De fato, as regiões genômicas mais utilizadas atualmente em análises de DNA para estudos em micologia em níveis abaixo do gênero e, portanto para identificação de espécies são as relacionadas ao rRNA (Horton & Bruns, 2001; Bridge *et al.* ,2005) tais como o espaçador interno transcrito (*internal transcribed spacer- ITS*); 18S, o 28S, e o espaçador intergênico (*Intergenic spacer IGS*); além do genoma mitocondrial (mt SSU- e mtLSU- Large mitochondrial subunit); assim como os genes que codificam proteínas como RNA polimerases (*RPB1* e *RPB2* -tubulina e actina- também são utilizados para filogenia molecular em fungos os loci, ATP-sintase (*ATP6*), e fator de alongação EF1- (*TEF1* e gliceraldenyde-3-phosphate dehydrogenase *gpd* (Schimitt *et al.*, 2009).

Os genes nucleares rDNA existem como uma família de genes, presentes em 60 a 220 cópias em um genomas haplóide de fungo. Essas cópias constituem sequências de DNA altamente similares organizadas lado a lado. Os quatro genes do RNAs ribossômicos com diferentes níveis de sedimentação (5S, 5.8S, 18S e 28S) fazem parte de uma mesma unidade de transcrição. Em cada unidade de transcrição, as regiões codificadoras são separadas por regiões espaçadoras internas (*Internal transcribed spacer* = ITS). A região ITS 1 separa os transcritos para os genes 18S, 5.8S e o ITS 2 separa os transcritos para os genes 28S e 5.8S (Figura 2). Essas unidades são separadas por regiões espaçadoras intergênicas (*Intergenic Spacers* =IGS). As regiões codificadoras são altamente conservadas entre diferentes espécies e gêneros, enquanto as regiões ITS e IGS apresentam maior variabilidade de sequência, sendo bastante utilizadas em estudos de sistemática molecular (Vilgalys & Gonzales, 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1995; Berthier *et al.*, 1996).

9. Análises filogenéticas no gênero *Alternaria*

A região ITS vem sendo usada para estabelecer relações filogenéticas entre espécies de *Alternaria* que produzem toxinas específicas a hospedeiras (Kubaba & Tsuge, 1995) ou que são patogênicas em crucíferas (Jasalavich *et al.*, 1995) bem como outras espécies pertencentes a ordem Pleosporales (Khashnobish & Shearer 1996; Morales *et al.*, 1992; Morales *et al.*,1995). Por exemplo, análises da região 18S nuclear, que é relativamente conservada, vêm sendo utilizada para descrever relações entre gêneros dentro da família Pleosporales e revelaram relações filogenéticas próximas entre *Pleospora* (teleomorfo de *Stemphylium*) e *Alternaria* (Berbee, 1996, Morales *et al.*, 1995).

O gene *Alt a 1* que codifica a principal proteína alergênica do gênero *Alternaria* também tem sido utilizado em análises filogenéticas do gênero. *Alternaria alternata* é considerado um dos fungos mais prolíficos produtores de alergênicos. Muitos desses compostos produzidos são proteínas como a enolase, proteínas ribossomais, fator de transporte nuclear e aldeído desidrogenase, que induz respostas alérgicas em humanos (Achatz *et al.*,1995; Simmon-Nobbe.,2000; Weitchel *et al.*,2003). O produto do gene *Alt a1*, é uma proteína cuja função no metabolismo do fungo ou na ecologia permanece ainda desconhecida (Barnes *et al.*, 1996; De Vougue *et al.*, 1996). Recentemente, um

homólogo do gene foi encontrado sendo altamente expresso durante o processo de infecção de *A. brassicicola* em *Arabidopsis thaliana*, sugerindo que o gene possa estar envolvido na patogenicidade (Cramer & Lawrence, 2003, 2004). Uma comparação realizada entre homólogos de *Alt a1* de *A. alternata* e *A. brassicicola* revelou maior divergência entre as sequências desta região (apenas 92% de similaridade) do que as encontradas em comparações similares de outros genes ribossômicos e codificadores de proteína (97%) como o ITS e o SSU do rDNA e ainda o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) para as mesmas duas espécies. Para o gene *Alt a1* houve 92% de similaridade versus 96,99% e 97% para os outros genes, respectivamente. (Cramer & Lawrence, 2003; Pryor & Bigelow, 2003). A presença do gene *Alt a1* em outras espécies ou gêneros é útil para a reconstrução de relações filogenéticas entre *Alternaria* e outros fungos relacionados. Além disso, análises da conservação de nucleotídeos e aminoácidos de *Alt a1* podem ser válidas para o entendimento da evolução deste gene e do seu papel principal na biologia do fungo (Hong *et al.*, 2004). Hong *et al.* (2004), utilizando iniciadores desenhados a partir das regiões conservadas do gene *Alt a1* de *A. alternata* (De Vouge *et al.*, 2003) e *A. brassicicola* (Cramer & Lawrence, 2003) verificaram a presença de homólogos em outras espécies de *Alternaria* e gêneros relacionados como *Stemphylium*, *Ulocladium*, *Embellisia* e *Nimbya*.

A classificação filogenética detalhada do reino Fungi, baseada em análises moleculares foi proposta por Hibbet *et al* (2007). Berbee *et al.* (1999) avaliaram a distribuição filogenética de patógenos altamente virulentos do gênero *Cochliobolus* e estimaram a relação entre espécies desse gênero com outras de *Curvularia* e *Bipolaris*, sendo os últimos fungos anamórficos pertencentes a Ascomycota, utilizando as sequências dos genes ITS e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Lourenço Jr *et al* (2009) investigaram a diversidade molecular e os processos evolucionários de isolados de *Alternaria solani* de batata e tomate no Brasil utilizando iniciadores da região ITS e dos genes *Alt a1* e *gpd*. Relações filogenéticas entre *Alternaria* e espécies relacionadas de *Ulocladium*, *Embellisia* e *Nymbya* já foram realizadas baseadas em análises de sequências de ITS, mt SSU, *gpd* e *Alt a1* (Chou & Wu, 2002; de Hoog & Horre, 2002; Pryor & Bigelow, 2003; Pryor & Gilbertson, 2000; Hong *et al.*, 2004). No entanto, para o desenvolvimento de uma filogenia mais robusta de *Alternaria* e gênero afins, análises adicionais que incorporem um locus genético mais variável são necessárias (Hong *et al.*, 2004).

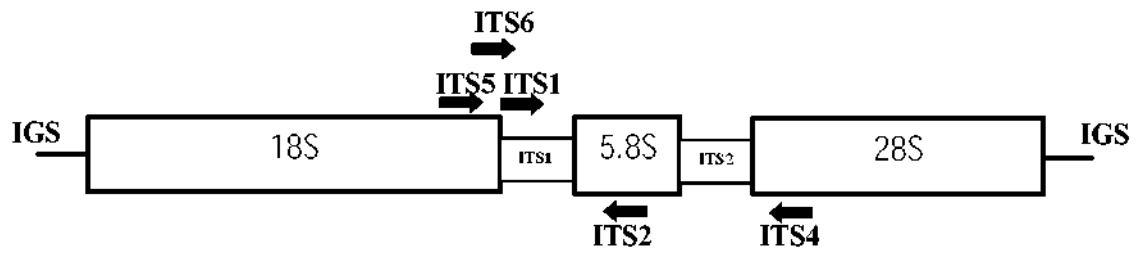


Figura 2: Esquema dos três genes do rDNA e regiões de espaçamento interno (ITS) e intergênicas (IGS), e as setas representam *primers* universais que amplificam as regiões (White *et al.*, 1990)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHATZ, G. OBERKOXER, H., LECHENAUER, E., SIMON, B., UNGER, A., KAN-DLER, D., EBNER, C., PRILLINGER, H., KRAFT, D., BREITENBACH, M. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Mol. Immunol.* 32: 213–227. 1995.

AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. 5th. Ed. Academic Press. St Paul. 2005.

AGUILETA, G., MARTHEY, S., CHIAPELLO, H., LEBRUN, M. H., RODOLPHE, F., FOURNIER, E., GENDRAULT-JACQUEMARD, A., GIRAUD, T. Assessing the performance of single-copy genes for recovering robust phylogenies. *Systematic Biology* 57. p. 613-627. 2008.

AGUILETA, G., REFRÉGIER, G., YOCKTENG, R., FOURNIER, E., GIRAUD, T. Rapidly evolving genes in pathogens: Methods for detecting positive selection and examples among fungi, bacteria, viruses and protists. *Infection, Genetics and Evolution*, Amsterdam. 9: 656–670. 2009.

ALMEIDA, D. Aliáceas. In: *Manual de culturas hortícolas*. Vol 1. 1^a ed. Lisboa Portugal. 2006.

BARNES, C.S., PACHECO, F., LANDUYT, J., ROSENTHAL, D., HU, F., PORTNOY, J. Production of a recombinant protein from *Alternaria* containing the reported N-terminal of the Alt a 1 allergen. In: SEHON, A., KRAFT, D., HAY GLASS, K.T. (Eds.). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 409. Plenum Press. New York. p. 197–203. 1996.

BARRETT, L. G., THRALL, P. H., BURDON, J. J., LINDE, C. C. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host–parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, Amsterdam. Vol 23. N 12. p. 678-685. 2008

BERBEE, M. L. Loculoascomycete origins and evolution of filamentous ascomycete morphology based on 18S rRNA gene sequence data. *Molecular Biology and Evolution* 13: 462-470. 1996.

BERTHIER, Y.; BRUCKART, W.L., CHABOUDEZ, P., LUSTER, D.G. Polymorphic patterns of ribosomal internal transcribed spacers in the biocontrol fungus *Puccinia carduorum* correlate with weed host origin. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3037-3041. 1996.

BINDER, M., HIBBETT, D.S. Higher-level phylogenetic relationships of homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 76–90. 2002.

BOITEUX, L.S., MELO, P.C.T. *Sistema de Produção de cebola (Allium cepa L) Sistema de produção 5*. Embrapa Hortaliças. 2004.

BREWSTER JL. *Crop production science and horticulture 3. Onions and other vegetables alliums*. CAB international 1994.

BRIDGE, P.D., SPOONER, B.M. AND ROBERTS, P.J. The impact of molecular data in fungal systematics. *Adv. Bot. Res.*, 42:33–67. 2005.

BROWN, J. K. M. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. *New Phytologist*, Cambridge, v. 133, p. 183-195,1996.

BURDON, J. J., SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology*, St. Paul. Vol. 87. N 6. p. 665-669. 1997.

BURDON, J., THRALL, P. Coevolution at multiple spatial scales: *Linum marginale*-*Melampsora lini*—from the individual to the species. *Evol. Ecol.* 14, 261–281. 2000.

CHOU, H.H., WU, W.S. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research* 106:164–169. 2002.

CRAMER, R.A., LAWRENCE, C.B. Cloning of a gene encoding an Alt a 1 isoallergen differentially expressed by the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* during *Arabidopsis* infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2361–2364. 2003.

CRAMER, R.A., LAWRENCE, C.B. Identification of *Alternaria brassicicola* genes expressed in planta during pathogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 115–128. 2004.

DE VOUGE, M.W., THANKER, A.M., CURRAN, I.H.A., ZHANG, L., MURADIA,G., RODE, H., VIJAY, H.M. Isolation and expression of a cDNA encoding on *Alternaria alternata* Alt a 1 subunit. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 111, 385–395.1996.

DOMINGUES, R. J., TÖFOLI, J. G., GARCIA JÚNIOR, O. Avaliação de fungicidas e programas de aplicação no controle da mancha púrpura do alho em condições de campo. *Arquivos do Instituto Biológico. Campinas.* Vol. 71. N. 2. p. 175-180. 2004

ELLIOTT, J. A. Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *American Journal of Botany* 4: 439-476. 1917.

ELLIS, J.B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew. 608p. 1971.

EMBRAPA HORTALIÇAS. Hortaliças em números. Disponível em http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/hortalicas_em_numeros.htm. Acessado em 22/03/2011.

FAO. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org/default.asp>. Acessado em 22/03/2011.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Embrapa Cenargen. Brasília, DF. 220p. 1995.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura.:agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Editora UFV. 3ª ed. Viçosa, MG. 421p. 2007.

FRIESEN, N., POLLNER S., BACKMANN, K., BLATTNER, FR. RAPDs and noncoding chloroplast DNA reveal a single origin of the cultivated *Allium fitosolium* from *A. altaicum* (Alliaceae). American Journal of Botany, St Louis, v. 86, p. 554-562, 1999.

FRITSCH, R.M., FRIESEN, N. Evolution, domestication and taxonomy. In.RABINOWITCH, H.D., CURRAH, L (Eds). Allium Crop sicence: recent advances. 515p. 2002.

HAWKSWORTH, D. L., KIRK, P. M., SUTTON, B. C.. PEGLER, D. N. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th edn. CAB Inter-national, Wallingford. 1995.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research, Cambridge, v. 111, p. 509-547 . 2007.

de HOOG, G.S., HORRE, R. Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. Mycoses 45. 259–276. 2002.

HONG, S.G., CRAMER, R.A., LAWRENCE, C.B., PRYOR, B.M. Alt a1 homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. Fungal Genetics and Biology. 42 (2005) 119-129. 2004.

HORTON, T.R. AND BRUNS, T.D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. Mol. Ecol. 10:1855–71. 2001.

IBGE. SIDRA. Censo Agropecuário. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/horti/default.asp?t=2&z=t&o=19&u1=1&u2=1&u3=1> Acessado em 26/03/2011.

JAMES, T.Y., KAUFF, F., SCHOCH, C.L., MATHENY, P.B., HOFSTETTER, V., et al.. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature 443: 818–822. 2006.

JASALAVICH, C. A., MORALES, V. M., PELCHER, L. E., SEGUIN-SWARTZ, G. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. Mycological Research 99: 604-614. 1995.

KALTZ, O., GANDON, S., MICHALAKIS, Y., SHYKOFF, J. Local maladaptation of the plant pathogen *Microbotryum violaceum* to its host *Silene latifolia*: evidence from a cross-inoculation experiment. Evolution 53, 395–407. 1999.

KHASHNOBISH, A., SHEARER, C. A. Phylogenetic relationships in some *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria* species. Mycological Research 100: 1355-1363. 1996.

- KUSABA, M., TSUGE, T. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics* 28: 491-498. 1995.
- LAINE, A. Evolution of host resistance: Looking for coevolutionary hotspots at small spatial scales. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 273, 267–273. 2006.
- LESLIE, J.K.. Fungal vegetative compatibility – Promises and prospects. *Phytoparasitica* 24:1-6. 1996.
- LEUNG, H., NELSON, R. J., LEACH, J. E.. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv. Plant Pathol.* 10:157- 205. 1993
- LOURENÇO JR, V., MOYA, A., GONZÁLEZ-CANDELAS, F., CARBONE, I., MAFFIA, L.A., MIZUBUTI, E.S.G. Molecular Diversity and Evolutionary Processes of *Alternaria solani* in Brazil Inferred Using Genealogical and Coalescent Approaches. *Phytopathology*. Vol 99. N°6. 2009.
- LUMBSCH, H. T. Phylogeny of filamentous ascomycetes. *Naturwissenschaften*, Berlin. Vol. 87. p. 335-342. 2000.
- LUMBSCH, H.T., SCHMITT, I., PALICE, Z., WIKLUND, E., EKMAN, S., WEDIN, M. Supraordinal phylogenetic relationships of Lecanoromycetes based on a Bayesian analysis of combined nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 822–832. 2004.
- LUTZONI F, KAUFF F, COX CJ, MCLAUGHLIN D, CELIO G, et al.. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91: 1446–1480. 2004.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Agrofit. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em: 04/04/2011
- MASSOLA JR, N.S., JESUS JR, W.C., KIMATI H. Doenças do alho e da cebola. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA. *Manual de Fitopatologia. Doenças de plantas cultivadas*. Vol 2 . 4ª Ed. 2005.
- MCDONALD, B. A., MCDERMOTT, J. M. The population genetics of plant pathogenic fungi. *BioScience*. London. Vol. 43. p. 311-319. 1993.
- MCDONALD, B. A. *The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques*. *Phytopathology*, St. Paul. Vol 87. N. 4. p. 448-453, 1997.
- MCDONALD, B. A., LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*. Palo Alto. Vol. 40. p. 349-379. 2002.

- MELCHIOR; H. 3. Reihe Liliiflorae (Liliales). In: MELCHIOR; H. (Ed.) A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien. 12. Auflage. Gebruder Borntraeger, Berlin- Nikolasse, pp. 513-543. 1964
- MILLER, M. E., LACY, M. L. Purple blotch. In: SCHWARTZ, H. F., MOHAN, S. K. (Ed.). Compendium of onion and garlic diseases. St. Paul: APS Press. p. 23-24. 1995.
- MILGROOM, M. G., FRY, W. E.. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Adv. Bot. Res.* 24:1-30. 1997.
- MIYAMOTO, M.M., CRACRAFT, J. Phylogenetic inference, DNA sequence analysis, and the future of molecular systematics. In: *Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*: 3-17. Oxford University Press, New York. 1991.
- MORALES, V. M., PELCHER, L. E., TAYLOR, J. L. Comparison of the 5.8s rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. *Current Genetics* 23: 490-495. 1992.
- MORALES, V. M., JASALAVICH, C. A., PELCHER, L. E., PETRIE, G. A., TAYLOR, J. L. Phylogenetic relationship among several *Leptosphaeria* species based on their ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 99: 593-603. 1995.
- MORITZ, C. & HILLIS, D. M. Molecular systematics : context and controversies. In *Molecular Systematics*: 1-10. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 1990.
- MOTA, J.H., NOCE, R., YURI, J.E., RESENDE, G.M., SOUZA, R.J. Análise da evolução da produção e relação risco-retorno para a cultura do alho, no Brasil e regiões (1991 a 2000). *Horticultura brasileira*. Brasília-DF. Vol. 23. N.2. p. 238-241. 2005.
- NEEGARD, P. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Oxford University Press London. 1945.
- PALANGANA, F. C., CAVALIERI, J. D., MOURA, V. H. M. C., BRANDÃO FILHO, J. U. T., VIDA, J. B., SANTOS, H. S. Eficiência de fungicidas no controle da mancha púrpura (*Alternaria porri*) na cultura da cebola. *Horticultura Brasileira*. Brasília, DF. Vol. 26. N. 2 (Suplemento). p. S5250-S5254. 2008.
- PRYOR, B.M., BIGELOW, D.M. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nymphaea* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia*. 95, 1139-1152. 2003.
- PRYOR, B.M., GILBERTSON, R.L. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research* 104 : 1312–1321. 2000.
- RAHN, K. Alliaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer- Verlag.. Vol. 3. p.70-78. 1998
- REIS, A., HENZ, G.P. Mancha-púrpura do alho e da cebola: doença difícil de controlar. Comunicado técnico 71. Embrapa. Brasília-DF. 2009

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

SCHMITT, I., CRESPO, A., DIVAKAR, P. K.; FANKHAUSER, J. D., HERMANSACKETT, E., KALB, K., NELSEN, M. P., NELSON, N. A., RIVAS-PLATA, E., SHIMP, A.D., WIDHELM, T., LUMBSCH, H.T. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia*, Leiden. Vol. 23. P 35-40. 2009.

SICARD, D., PENNINGS, P.S., GRANDCLEMENT, C., ACOSTA, J., KALTZ, O., SHYKOFF, J.A. Specialization and local adaptation of a fungal parasite on two host plant species as revealed by two fitness traits. *Evolution* 61, 27–41. 2007.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* themes and variations (22–26). *Mycotaxon* 25 : 287–308. 1986.

SIMMONS, E. G. *Embellisia* and related teleomorphs. *Myco-taxon* 38 : 251–265. 1990.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: CHELKOWSKI, J., VISCONTI, A. (Eds): *Alternaria: biology, plant diseases and metabolites* 1–35. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1992.

SIMMONS, E.G. *Alternaria*, themes and variations: 112-144. *Mycotaxon* 55:55-163. 1995.

SIMMONS, E. G. *Alternaria: an identification manual*. Utrecht: CBS. CBS Biodiversity Series, 6. P.775. 2007.

SIMON-NOBBE, B., PROBST, G., KAJAVA, A.V., OBERKOXER, H., SUSANI, M., CRAMERI, R., FERREIRA, F., EBNER, C., BREITENBACH, M. IgE-binding epitopes of enolases, a class of highly conserved fungal allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 887–895. 2000.

STUKENBROCK, E. H., MCDONALD, B. A. The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto. Vol. 46. p. 75-100. 2008.

TAYLOR, J., JACOBSON, D., FISHER, M. The evolution of asexual fungi: Reproduction, speciation and classification. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:197-246. 1999.

VAN DER WAALS, J. E.; KORSTEN, L.; SLIPPERS, B. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease*, Saint Paul. Vol. 88. p. 959-964. 2004.

VILGALYS, R., GONZALEZ, D. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Current Genetics* 18:277-280. 1990.

WASUM RA, BORDIN J, SINIGAGLIA C. Considerações taxônomicas. In. BARBIERI, R.L. (Ed.) *Cebola: ciência, arte e história*. 2ª ed. Brasília-DF. Embrapa Informação tecnológica, 2007

WEICHEL, M., SCHMID-GRENDELMEIMER, P., FLUCKIGER, S., BREITENBACH, M., BLASER, K., CRAMERI, R. Nuclear transport factor2 represents a novel cross-reactive fungal allergen. *Allergy* 58, 198–206. 2003.

WILTSHIRE, S. P. The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. *Transactions of the British Mycological Society* 18: 135-160. 1933.

WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE, AND J. W. TAYLOR. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY J. J., WHITE, T. J. (Eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York. 1990.

CAPÍTULO 2

**DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Alternaria* spp.
ASSOCIADOS AO GÊNERO *Allium* NO BRASIL**

Diversidade de isolados de *Alternaria* spp. associados ao gênero *Allium* no Brasil

RESUMO – A Embrapa Hortaliças mantém uma coleção de isolados de *Alternaria* de diversas regiões do Brasil oriundo de plantas cultivadas da família Alliaceae como: *Allium cepa* (cebola), *A. sativum* (alho), *A. fistulosum* (cebolinha) e *A. ampeloprasum* var. *porrum* (alho-poró). O presente trabalho foi realizado com o intuito de investigar a variabilidade morfológica e molecular desses isolados. Para tanto foi feita uma caracterização molecular via sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal e do gene *Alt a1* (codificador de uma proteína alergênica encontrado em espécies de *Alternaria*). Análises morfológicas e morfométricas foram também conduzidas para um subgrupo de isolados. Em relação à análise com a região ITS foram formados dois grupos distintos. Um composto pelo grupo de espécies alternata e outro contendo as espécies tipo porri. Já na árvore filogenética do gene *Alt a1*, todos os isolados e espécies foram alocados em um mesmo grande grupo e dentro dele formaram-se subgrupos. Alguns isolados foram selecionados para caracterização morfológica, no entanto somente 10 esporularam *in vitro*. As estruturas dos isolados foram observadas e medidas. Do total, nove se enquadraram no grupo da espécie *A. alternata* e somente um foi alocado em *A. crassa*. Os resultados morfométricos se assemelharam aos moleculares e concluiu-se que o gene *Alt a1* foi menos informativo. A análise realizada com a região ITS separou logo os isolados em dois grupos distintos.

Palavras-chave: região ITS, gene *Alt a1*, *A. porri*, Alliaceae, morfometria.

Diversity of *Alternaria* spp. isolates associated to *Allium* genus in Brazil

ABSTRACT – Embrapa Hortaliças (Embrapa Vegetable Crops) maintain a collection of *Alternaria* isolates collected from plant species of the Alliaceae family as well as : *Allium cepa* (onion), *A. sativum* (garlic), *A. fistulosum* (chive) e *A. ampeloprasum* var. *porrum* (leek). The present work was carried out aiming to investigate the morphological and molecular variability of those isolates. For this was made the molecular characterization of the isolates by sequencing the ITS region of ribosomal DNA and of gene *Alt a1* that codes for an allergenic protein produced by *Alternaria* species. After this, it was made morphologic and morphometric studies with some isolates. In the ITS tree it was observed two distinct groups. One group was represented by isolates of the species groups *alternata* and the other one represented by isolates of the species group *porri*. In the phylogeny tree of *Alt a1*, all isolates were grouped in one big single group. Within this big group it was formed subgroups. Some isolates were selected for the morphological characterization. However only 10 isolates produced spores in culture. The structure of the isolates were measured and observed under optical microscope. Nine out of ten isolates were classified in the *A. alternata* group and only one was classified as *A. crassa*. The results of morphometrical characterization were similar to those of the molecular classification. The *Alt a1* gene was less informative. Analysis with the ITS region separated the isolates in two groups, while the analysis with *Alt a1* separated the isolates in only one group.

Key-words: ITS region, *Alt a1* gene, *A. porri*, Alliaceae, morphometric.

INTRODUÇÃO

A cebola (*A. cepa*) é a principal cultura da família das Aliáceas e uma das hortaliças com maior volume de produção a nível mundial (Almeida, 2006). O alho (*A. sativum*) é um condimento usado quase universalmente sendo também muito importante na culinária brasileira. A cebolinha é geralmente cultivada por pequenos olericultores (Filgueira, 2007) sendo muito apreciada e cultivada no Brasil (Heredia Zarate *et al.*, 2003). A espécie *A. ampeloprasum* ou alho-poró é utilizada comercialmente em algumas regiões da Europa, América do Norte, Ásia temperada e esporadicamente em outros locais (Fritsch & Friesen, 2002). No Brasil, é menos utilizada que as demais aliáceas, domesticamente, porém, cresce a demanda das agroindústrias produtoras de sopas desidratadas (Filgueira, 2008).

A mancha-púrpura, uma das principais doenças foliares de plantas do gênero *Allium*, é causada por *Alternaria porri* e ocorre em todas as regiões onde se cultivam principalmente alho e cebola, sendo mais severa em áreas de clima quente e úmido (Nunes & Kimati, 1997; Miller & Lacy, 1995). No Brasil, a doença já foi relatada em alho, cebola, alho-poró e cebolinha (Mendes *et al.*, 1998). É uma das doenças mais relevantes destas culturas, podendo ocasionar perdas de até 70% na produção em condições ambientais favoráveis e prejudicando a conservação dos bulbos e a produção de sementes em cebola (Massola Jr *et al.*, 2005; Miller & Lacy, 1995).

Estudos anteriores subdividiram o gênero *Alternaria* em alguns grupos-específicos de acordo com a presença de cadeia e morfologia dos conídios (Neegard, 1945). As características morfológicas apresentam sobreposição em algumas espécies e as mesmas são afetadas pelas condições de crescimento, podendo assim não ser suficientes para distinção das espécies bem como para filogenia (Rotem, 1994). O sistema taxonômico do gênero *Alternaria* ainda permanece obscuro e são necessários mais estudos que esclareçam as relações filogenéticas dentro deste grupo (Chou & Wu, 2001). Ferramentas moleculares podem ajudar no esclarecimento destas relações. Assim, a utilização dos dois métodos; morfológico e molecular; em conjunto, torna-se uma ferramenta eficaz para os estudos a respeito desse grupo de patógenos.

Para análises taxonômicas de fungos em nível de espécie ou ainda abaixo do nível, a região ITS é comumente a mais usada (Pryor & Gilbertson, 2000). Alguns

trabalhos de filogenia já foram realizados entre espécies de *Alternaria* bem como com outros gêneros relacionados utilizando outros genes como *Alt al* e *gpd* (Hong *et al.*, 2004; Pryor & Gilbertson, 2000; Chou & Wu, 2001; Lourenço Jr *et al.*, 2009); no entanto ainda não há trabalhos com isolados deste fungo associados com plantas cultivadas do gênero *Allium*.

Nos últimos anos, produtores de alho e cebola têm enfrentado dificuldades para controlar a doença mancha púrpura em alho e cebola, o que pode estar relacionado a falhas na metodologia de aplicação de fungicidas ou mudanças na população do patógeno, ou ainda os dois fatores em conjunto. Com isso, pesquisadores da Embrapa coletaram isolados de *Alternaria* em aliáceas em várias regiões do Brasil com o intuito de investigar o comportamento dessas populações (Reis & Henz, 2009). Diante deste quadro, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma caracterização molecular desses isolados de *Alternaria* encontrados em plantas de cebola, alho, alho-poró e cebolinha utilizando sequências de DNA da região ITS e do gene que codifica a proteína alergênica, *Alt al*, bem como uma caracterização morfométrica e morfológica de alguns isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Recuperação dos isolados

Os isolados de espécies de *Alternaria* utilizados são mantidos armazenados em câmara fria na Embrapa Hortaliças, dentro de tubos de penicilina preservados com óleo mineral (Stebbins & Robbins, 1949) ou água (Castellani, 1939). Eles fazem parte da coleção de fungos e oomicetos fitopatogênicos da Embrapa Hortaliças e são provenientes de culturas monospóricas. Inicialmente foram selecionados 100 isolados. Em uma câmara de fluxo de ar contínuo, localizada no laboratório de Fitopatologia, com o auxílio de um estilete esterilizado com álcool e chama, foi retirado, de cada tubo, um disco de micélio (isolados preservados em água) ou uma porção do meio com micélio (isolados preservados em óleo mineral) que foi seco em papel filtro autoclavado e colocado no centro de uma placa de petri contendo meio ST (suco de tomate) ou suco de vegetais V8, sendo adicionado ao meio o antibiótico tetraciclina. O procedimento foi realizado com todos os isolados e as placas foram acondicionadas em BOD com temperatura de 25°C.

Preparação do micélio e extração de DNA

Depois de aproximadamente dez dias, as placas já com o micélio crescido, foram retiradas da BOD dentro da câmara de fluxo de ar contínuo, foi raspado o micélio aéreo, com um bisturi esterilizado, e colocado em microtubos de 1 mL. Os tubos foram armazenados no freezer até que fosse realizada a extração do DNA. O DNA de cada isolado foi extraído segundo um protocolo CTAB (Boiteux *et al.*, 1999) para extração de DNA de tecidos de plantas com algumas modificações. Uma pequena porção de micélio congelado, cerca de 15 mg, foi macerada com nitrogênio líquido em cadinhos gelados até formarem um pó fino. Colocou-se este pó em microtubos contendo 600µl de CTAB a 65°C sendo feita logo depois uma agitação suave manualmente. Os tubos foram deixados em banho-maria (65°C) durante 10 minutos e em seguida resfriados por 3 minutos em temperatura ambiente. Acrescentou-se 600 µL de Clorofil (clorofórmio + álcool isoamílico, na proporção 24:1), agitando-os vigorosamente. Em seguida,

centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 minutos para a formação de duas fases (a de cima contendo DNA e a inferior com a fase orgânica do material). Foi retirado 550µl da fase superior e adicionou-se essa solução em outro tubo. No novo tubo, foi acrescentado 300µl de isopropanol gelado, agitando-se lentamente. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 13 minutos eliminando-se, posteriormente, o sobrenadante e lavando-se o pellet com álcool 70% cuidadosamente. Os materiais foram colocados em câmara de crescimento por 20 minutos para secagem. Depois disso, adicionou-se 200 µL de TE e deixou-se por toda a noite dentro de uma geladeira para ressuspender o pellet. No dia seguinte agitou-se utilizando o vortex. A concentração do DNA purificado foi estimada em gel de agarose 1% (p/v) baseando-se em um marcador de quantidade contendo o fago λ (lambda) na concentração de 10 ng/µL. Todos os materiais foram diluídos para a concentração final de 20ng/µL em TE (Tris 0,01M; EDTA 0,001M; pH 7,0).

Amplificação do DNA

A amplificação do DNA de cada isolado foi feita via PCR (Reação de cadeia da Polimerase ou “Polymerase Chain Reaction”) utilizando os *primers* ITS4 e ITS5 que amplificam a região ITS 1 e ITS2 e o gene 5.8s rDNA do DNA ribossomal (White *et al.*,1990). As sequências dos nucleotídeos ITS5 e ITS4 são 5’-GGA-AGT-AAA-AGT-CGG-G-3’ e 5’-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3’, respectivamente (White *et al.*,1990). Foram também empregados para a reação de PCR os iniciadores ALT-rev (5’-ACG-AGG-GTG-AYG-TAG-GCG-TC-3’) e ALT-for (5’-ATG-CAG-TTC-ACC-ACC-ATC-GC-3’) que amplificam o gene que codifica a molécula alergênica *Alt A1*, específica de *Alternaria* (Hong *et al.*, 2004). Estes iniciadores foram desenhados baseando-se em regiões conservadas deste gene de *A. alternata* (De Vouge *et al.*, 1996) e *A. brassicicola* (Cramer e Lawrence, 2003). As amplificações foram feitas no termociclador *PCR System 9700* (Applied Biosystems) e para cada reação foi realizado um mix cujo volume total foi de 20µl, contendo 2µL de tampão 10x (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 0,48µL de MgSO₄ 50mM, 2 µL de DNTPs (2,5µM cada), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5u/µL), 3,2µL de cada *primer*; todos da *Invitrogen® Life Technologies*, 5,92 µL de água miliQ e 3µL de DNA. O perfil de amplificação com os primers ITS constituiu-se em um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5

minutos; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto), extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados em géis de agarose 1% (p/v), corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

Para os primers *Alt a1*, o programa de amplificação constitui em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto), extensão final a 72°C por 10 minutos. O mix utilizado para cada reação foi em um volume total de 20µL; sendo 2µL de tampão 10x (100 mM Tris- HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1µL de MgSO₄ 50mM, 2 µL de DNTPs (2,5µM cada), 0,1 µL de Platinum ®*Taq* DNA polymerase High Fidelity (5u/µL), 1µL de cada *primer*; todos da *Invitrogen® Life Technologies*, 9,9 1µL de água miliQ e 3µL de DNA. Como foram observadas bandas inespecíficas no gel de agarose 1%, o produto da PCR foi purificado do gel com o Kit da *Invitrogen® Life Technologies*. Após verificação de que este produto purificado apresentava uma banda única em gel de agarose, foi realizada uma nova PCR com o produto diluído 10 vezes. Neste caso, as mesmas condições da primeira PCR com os iniciadores *Alt-for* e *Alt-rev* foram utilizadas com exceção do mix já que desta vez aplicou-se 0,2µL de *Taq* DNA polimerase (5u/µL) e 9,8 µL de água milliQ. Os amplicons desta PCR foram diretamente sequenciados.

Reações de sequenciamento e análise das sequências

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

Para a região ITS1, 5.8 rDNA e ITS2 foram analisados 77 isolados (Tabela 1) e acessos de espécies do GenBank como *A. dauci* (AF229466), *A. porri* (AB026159), *A. petroselini* (AF229454), *A. vanuatuensis* (JF331510), *A. macrospora* (AF229469), *A. tenuissima* (AF229476), *A. crassa* (AF229464) e para o gene *Alt a1* foram analisados 35 (Tabela X) isolados junto com acessos do GenBank de *A. dauci* (AY563292), *A. solani*

(AY563299), *A. porri* (AY563296), *A. petroselini* (AY563288), *A. vanuatuensis* (JF331555), *A. macrospora* (AY563294), *A. iranica* (JF331556), *A. brassicae* (AY563309), *A. longipes* (AY563304), *A. alternata* (AY278808), *A. crassa*, *A. tenuissima* (AY563302), *A. radicina* (AY563286) e *Embellisia alli* (AY563322) . Os acesso do GenBank foram selecionados de trabalhos anteriores realizados com as regiões analisadas (Hong *et al.*, 2004; Pryor & Gilbertson, 2000). A análise filogenética foi realizada com o critério de parcimônia e o suporte dos agrupamentos foi avalizado por “Bootstrap” (1000 repetições) no programa PAUP 4.0. *Stemphylium callisthephi* e *Pleospora herbarum* foram empregados como grupos externos na análise com ITS e na análise com *Alt a1*. Para a análise filogenética com *Alt a1* foram utilizados os mesmo parâmetros que Hong *et al.* (2004).

2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

As análises foram conduzidas no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças e Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília. Quarenta isolados, previamente selecionados de diferentes agrupamentos gerados pela análise molecular, foram utilizados neste estudo. Foram realizados dois métodos para induzir a esporulação. No primeiro procedimento, os isolados foram repicados em meio BDA ou V8 colocando-se um disco de micélio no centro de uma placa de petri. Após o crescimento do fungo, de cada placa, foram retirados, com auxílio de um bisturi, dois pedaços de micélio que foram colocados posteriormente em erlenmeyer contendo meio líquido BD (batata + dextrose). Os frascos erlenmeyers foram mantidos no escuro sob agitação contínua. Depois de sete dias, o material contido nos tubos foi triturado e colocado em placas de petri que continham uma camada grossa de meio V8. Após esse procedimento, as placas foram colocadas abertas em uma câmara de crescimento com lâmpadas de luz negra a 25°C e com fotoperíodo de 12 horas. O outro método realizado consistiu na repicagem dos isolados em cinco pontos de uma placa de petri que continha meio BDA bastante fino, que só cobria o fundo da placa. Estas placas foram colocadas invertidas direto sob a luz negra por 12 horas diariamente em um local totalmente escuro.

Quando observada esporulação do isolado na placa, os esporos foram capturados com auxílio de estilete e foi montada uma lâmina com lactofenol. Após a observação em microscópio ótico e constatação das estruturas, lâminas definitivas foram seladas com duas camadas de esmalte de unha. As lâminas de melhor qualidade foram levadas ao laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília para a medição dos conídios. Os esporos foram observados em microscópio ótico Leica® no aumento de 40x e 100x, neste último caso com auxílio de óleo de imersão. Aproximadamente 50 conídios de cada isolado foram analisados quanto o comprimento e a maior largura do corpo e do rostro do conídio, em micrômetros (μm); observou-se também o número de septos longitudinais e de septos transversais bem como a de largura dos conidióforos (em torno de 15). Foram retiradas fotografias das frutificações observadas em cada isolado. Para comparação dos valores, foi feita uma tabela contendo as medições máximas e mínimas e também médias obtidas (Tabela 3). Esses resultados foram comparados com o que já foi descrito por Simmons (2007) na literatura sobre a morfologia das espécies de *Alternaria*.

Tabela 1: Relação de isolados de *Alternaria* utilizados nas análises com *Alt al* e ITS

Isolado	Hospedeira	Localidade	Data
EH - 10	Cebolinha	São Felipe do Oeste- RO	2001
EH - 11	Cebolinha	São Felipe do Oeste- RO	2001
EH - 15	Alho	Gama-DF	2001
EH - 16	Alho	Gama-DF	2001
EH - 43	Alho	São Gotardo - MG	2002
EH - 46	Alho	Cristalina-GO	2002
EH - 71	Cebolinha	Águas Lindas- GO	2002
EH - 102	Alho	Cristalina-GO	2002
EH - 272	Cebola	Brazlândia- DF	2002
EH - 291	Alho	Brazlândia- DF	2002
EH - 321	Alho	Cristalina-GO	2003
EH - 324	Alho	Cristalina-GO	2003
EH - 498	Cebola	São José do Rio Pardo- SP	2003
EH - 516	Alho	Cristalina-GO	2003
EH - 557	Cebolinha	Chã-Grande -PE	2003
EH - 594	Cebola	São José do Rio Pardo-SP	2003
EH - 602	Cebola	Cristalina-GO	2003
EH - 603	Cebola	Cristalina- GO	2003
EH - 626	Cebola	CNPH-DF	2003
EH - 641	Cebola	São Gotardo- MG	2003
EH - 642	Cebola	São Gotardo- MG	2003
EH - 662	Alho	Cristalina-GO	2003
EH - 663	Alho	Cristalina-GO	2003
EH - 664	Alho	Cristalina-GO	2003
EH - 666	Alho	Cristalina-GO	2003
EH - 667	Alho	Cristalina-GO	2003
EH - 697	Cebolinha	São Jose do Rio Pardo-SP	2003
EH - 700	Cebola	São Jose do Rio Pardo-SP	2003
EH - 731	Alho	Ponte Alta- DF	2003
EH - 771	Cebola	Cristópolis- BA	2003
EH - 772	Alho	Cristópolis- BA	2003
EH - 823	Alho -Poró	Vargem Bonita- DF	2003
EH - 824	Alho -Poró	Vargem Bonita- DF	2003
EH - 904	Cebola	Pelotas -RS	2004
EH - 917	Cebola	Jaíba-MG	2004
EH - 941	Cebolinha	Brasília-DF	2004
EH - 942	Alho	Cristalina-GO	2004
EH - 943	Alho	Cristalina-GO	2004
EH - 963	Cebola	João Dourado-BA	2004
EH - 990	Cebolinha	V. Bonita- DF	2004
EH - 995	Cebola	São Gotardo- MG	2004
EH - 996	Cebola	São Gotardo- MG	2004
EH - 1056	Cebola	Ponte Alta- DF	2004

Isolado	Hospedeira	Localidade	Data
EH - 1073	Cebolinha	Vargem Bonita- DF	2004
EH - 1093	Cebolinha	Paranaguá-PR	2005
EH - 1094	Cebolinha	Paranaguá-PR	2005
EH - 1125	Cebola	Gama - DF	2005
EH - 1146	Cebola	Contenda- PR	2005
EH - 1166	Cebolinha	Caxias do Sul- RS	2005
EH - 1227	Cebola	Pelotas-RS	2005
EH - 1244	Alho- poró	Itobi- SP	2005
EH - 1245	Alho-poró	Itobi- SP	2005
EH - 1270	Cebolinha	Águas Claras- DF	2005
EH - 1275	Alho	Cristalina-GO	2005
EH - 1276	Alho	Cristalina-GO	2005
EH - 1277	Alho	Cristalina-GO	2005
EH - 1278	Alho	Cristalina-GO	2005
EH - 1282	Cebola	Cristalina-GO	2005
EH - 1288	Alho	Coimbra-MG	2005
EH - 1289	Alho	Coimbra-MG	2005
EH - 1291	Alho	Coimbra-MG	2005
EH - 1442	Cebolinha	Itapetininga -SP	2005
EH -1443	Cebolinha	Itapetininga -SP	2005
EH - 1463	Cebola	Paulínia-SP	2005
EH - 1464	Cebola	Paulínia-SP	2005
EH - 1465	Cebola	Paulínia-SP	2005
EH - 1486	Alho- porró	Gama-DF	2005
EH - 1488	Alho- porró	Gama-DF	2005
EH - 1553	Cebolinha	Brazlândia- DF	2006
EH - 1584	Alho	Formosa-GO	2006
EH - 1588	Alho	S Antonio Descoberto-GO	2006
EH - 1713	Cebola	Gama-DF	2006
EH - 1838	Alho	Cristalina-GO	2009
EH - 1848	Alho- poró	Nova Friburgo-RJ	2009
EH - 1856	Alho- poró	Nova Friburgo-RJ	2009
EH - 1871	Cebolinha	Teresópolis-RJ	2009
EH - 1893	Cebola	Gama-DF	2009
EH - 1967	Cebola	Bragança Paulista - SP	2009
EH - 1986	Alho-poró	Vitória de São Antão- PE	2010
EH - 1987	Alho-poró	Vitória de São Antão- PE	2010

Tabela 2: Hospedeira, local e data dos isolados de *Alternaria* caracterizados morfológicamente.

Isolados	Hospedeira	Local	Data
EH 16	Alho	Embrapa Hortaliças - DF	2001
EH 43	Alho	São Gotardo - MG	2002
EH 272	Cebola	Cristalina - GO	2002
EH 602	Cebola	São Gotardo - MG	2003
EH 603	Cebola	Cristalina - GO	2003
EH 642	Cebola	Cristalina - GO	2003
EH 823	Alho-poró	Vargem Bonita - DF	2003
EH 996	Cebola	São Gotardo - MG	2004
EH 1167	Cebolinha	Araucária - PR	2005
EH 1227	Cebola	Pelotas - RS	2005
EH 2084	Alho	Urutuaí - GO	2011

RESULTADOS

Análise com a região ITS

A amplificação via PCR gerou bandas únicas com aproximadamente 530 pares de bases que era o tamanho esperado (Figura 3). Não foram observados polimorfismos entre isolados que indicassem deleções/inserções nesta região. O seqüenciamento direto do amplicom confirmou que se tratava de um produto único devido à ausência de nucleotídeos dúbios (Ns) em todas as sequências analisadas. A análise de parcimônia revelou que do total de 289 caracteres utilizados, 253 foram constantes, 12 caracteres foram variáveis e 24 (8,3%) foram informativos para construção da árvore. Foi observado maior polimorfismo na região ITS 1 e pouco polimorfismo na região que codifica o 5.8S RNA, dado que já era esperado por se tratar de uma região mais conservada com função essencial na célula (Figura 5 e 6).

As sequências dos isolados desta análise diferiram da sequência de *Stemphylium callisthephi* e de *Pleospora herbarum*, que foram as espécie do GenBank utilizadas como grupo externo. Foram formados dois grandes grupos, o primeiro com 25 isolados que se agruparam com a sequência de *Alternaria porri*, que inclui *A. vanuatuensis*, *A. solani*, *A. dauci*, *A. macrospora*, *A. crassa*, *A. iranica*, com valores de Bootstrap de 66%. Dentro do grande grupo *porri*, outros subgrupos foram formados (Figura 4). Nove isolados de cebola, dois de cebolinha e um de alho-poró oriundos de diversas regiões geográficas do Brasil ficaram agrupados (*bootstrap* 62%). Foi gerado um grupo com dois isolados (um de alho do Distrito Federal e outro de alho-poró do Rio de Janeiro) que se alinharam com a sequência de *A. dauci* com valores altos de *bootstrap* (95%). Foram formados ainda dois subgrupos, com valores de *bootstrap* baixo, que não se alinharam com nenhuma sequência do GenBank. Um subgrupo composto por um isolado de alho de Goiás e outro de alho-poró de São Paulo (*bootstrap* 58%) e também um subgrupo formado por dois isolados de alho-poró do Distrito Federal e de Pernambuco (*bootstrap* de 61%). Nesta análise foram omitidas sequências idênticas ao grupo *A. porri* como: EH 10, EH 11, EH 15, EH 46, EH71, EH 102, EH 321, EH 557, EH 663, EH 666, EH 697, EH 700, EH 824, EH 917, EH 941, EH 942, EH 990, EH 1094, 1125, EH 1245, EH 1270, EH 1276, EH 1277, EH 1289, EH 1278, EH 1288, EH

1291, EH 1486, EH 1553, EH 1584, EH 1585, EH 1588, EH 1713, EH 1838, EH 1856, EH 1893, EH 1896.

Os demais isolados utilizados na construção da árvore formaram o segundo grande grupo e se alinharam com a sequência de *A. tenuissima*, *A. alternata* e *A. longipes* com 91% de suporte de *bootstrap* (Figura 4). Dentro desse grupo há isolados das quatro culturas (alho, cebola, alho-poró e cebolinha) de várias regiões do Brasil (Distrito Federal, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais). Formou-se um subgrupo com a sequência de um isolado de alho do Distrito Federal e um de cebolinha do Paraná (*bootstrap* 60%). Somente um isolado, EH 324, ficou alinhado com a sequência de *A. radicina*, porém com baixo valor de *bootstrap* (52 %). A análise revelou que a maioria dos isolados foi alocada junto com a espécie *A. porri* (sequências idênticas a esta espécie foram omitidas) indicando que boa parte da coleção de *Alternaria* estudada, coletada em plantas do gênero *Allium* realmente são espécies de *A. porri*. No entanto, há uma porcentagem que se enquadra em outras espécies.

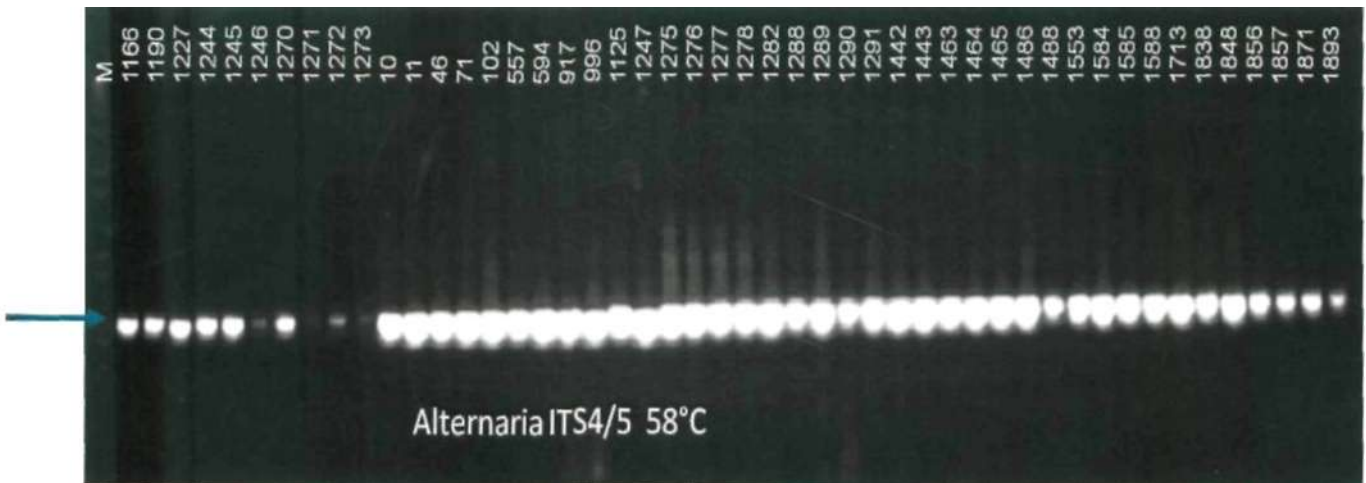
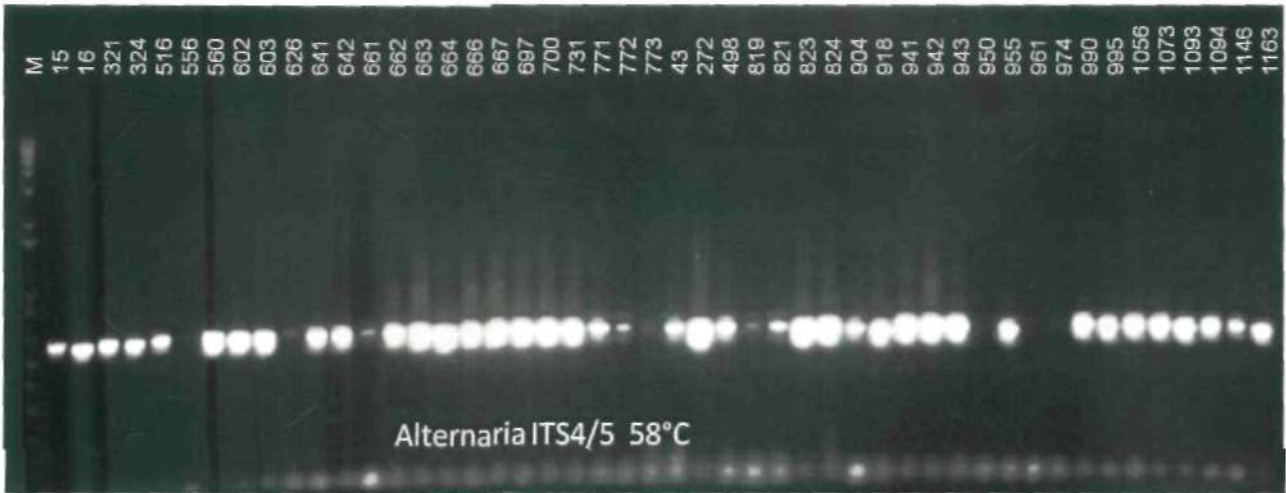


Figura 3: Produto da amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica o amplicom único de tamanho aproximado de 530 pb.

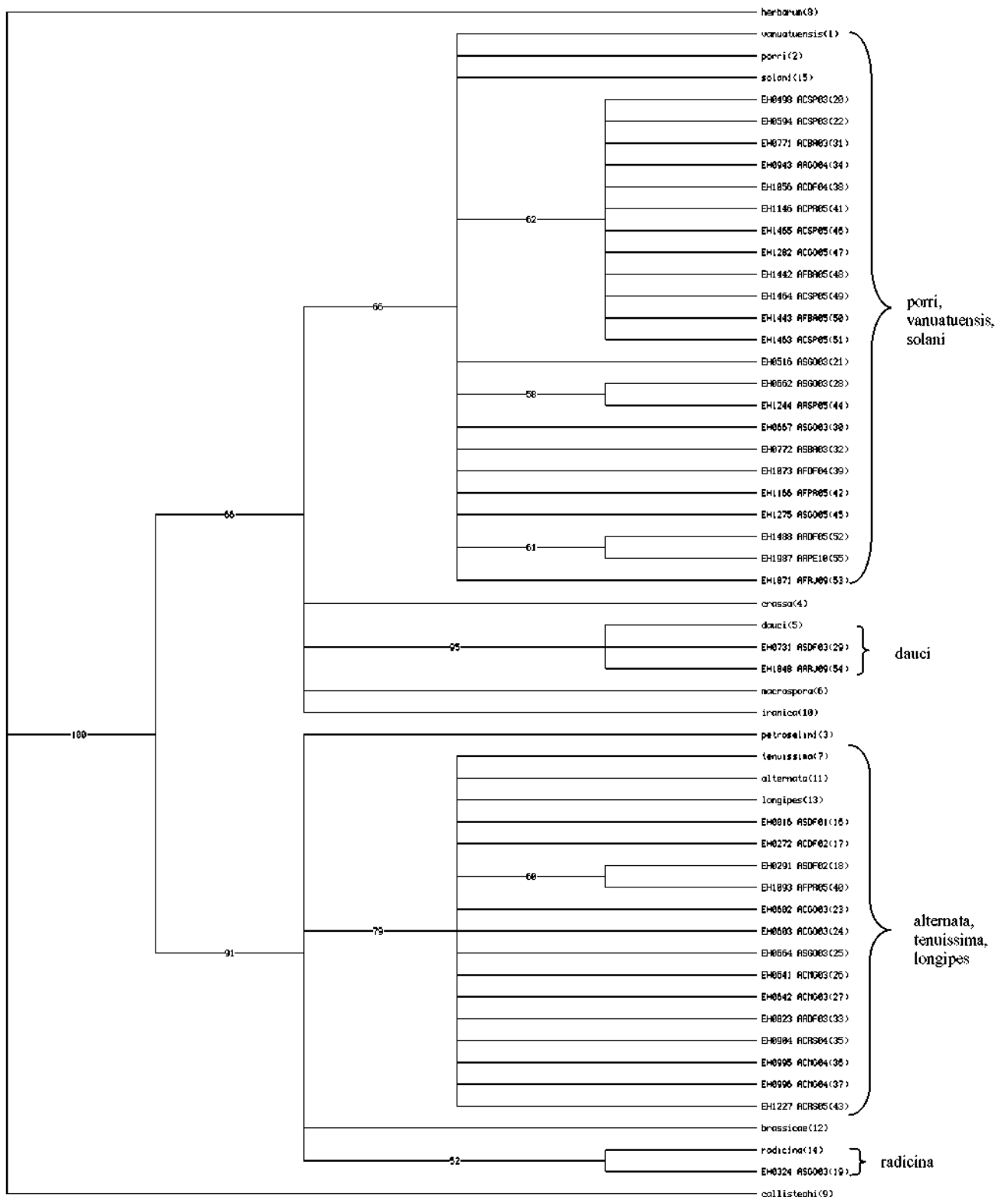


Figura 4: Árvore consenso obtida pelo método de parcimônia com busca heurística utilizando o alinhamento da região ITS1-5.8S - ITS2. Os valores numéricos representam o índice bootstrap após 1000 repetições. As sequências das espécies *P. herbarum* e *S. callistephi* foram utilizadas como grupos externos. No subgrupo de *A. porri* foram omitidas as sequências idênticas a esta espécie.



Figura 5: Alinhamento dos isolados e espécies do GenBank na região ITS 1 do rDNA. Em vermelho, nucleotídeos idênticos e em branco os variáveis.

A vanuatuensis
 A perri
 A petroselini
 A crassa
 A dauci
 A macrospora
 A tenuissima
 A alli
 P herbarum
 S callistephi
 EH15 ASDF01
 EH10 AFRO01
 EH11 AFRO01
 EH16 ASDF01
 EH321 ASGO03
 EH46 ASGO02
 EH71 AFGO02
 EH102 ASGO02
 EH272 ACDFO2
 EH291 ASDFO2
 EH557 AFPO03
 EH324 ASGO03
 EH498 ACSPO3
 EH516 ASGO03
 EH594 ACSPO3
 EH602 ACGO03
 EH603 ACGO03
 EH664 ASGO03
 EH641 ACMGO3
 EH642 ACMGO3
 EH662 ASGO03
 EH663 ASGO03
 EH731 ASDFO3
 EH666 ASGO03
 EH667 ASGO03
 EH697 AFSP03
 EH700 ACSPO3
 EH824 AADFO3
 EH771 ACBA03
 EH772 ASBA03
 EH823 AADFO3
 EH943 AAGGO4
 EH904 ACRS04
 EH917 ACMGO4
 EH941 AFDF04
 EH942 ASGO04
 EH1094 AFPR05
 EH990 AFDF04
 EH995 ACMGO4
 EH996 ACMGO4
 EH1056 ACDFO4
 EH1073 AFDF04
 EH1093 AFPR05
 EH1125 ACDFO5
 EH1146 ACPR05
 EH1166 AFPR05
 EH1227 ACRS05
 EH1244 AASF05
 EH1245 AASP05
 EH1276 ASGO05
 EH1270 AFDF05
 EH1275 ASGO05
 EH1277 ASGO05
 EH1289 ASMG05
 EH1465 ACSPO5
 EH1278 ASGO05
 EH1282 ACGO05
 EH1288 ASMG05
 EH1293 ASMG05
 EH1442 AFBA05
 EH1588 ASGO06
 EH1464 ACSPO5
 EH1443 AFRA05
 EH1463 ACSPO5
 EH1486 AADF05
 EH1488 AADF05
 EH1553 AFDF06
 EH1584 ASGO06
 EH1585 ASGO06
 EH1871 AFRJ09
 EH1713 ACDFO6
 EH1838 ASGO09
 EH1848 AARJ09
 EH1856 AARJ09
 EH1893 ACDFO9
 EH1986 AAPE10
 EH1987 AAPE10

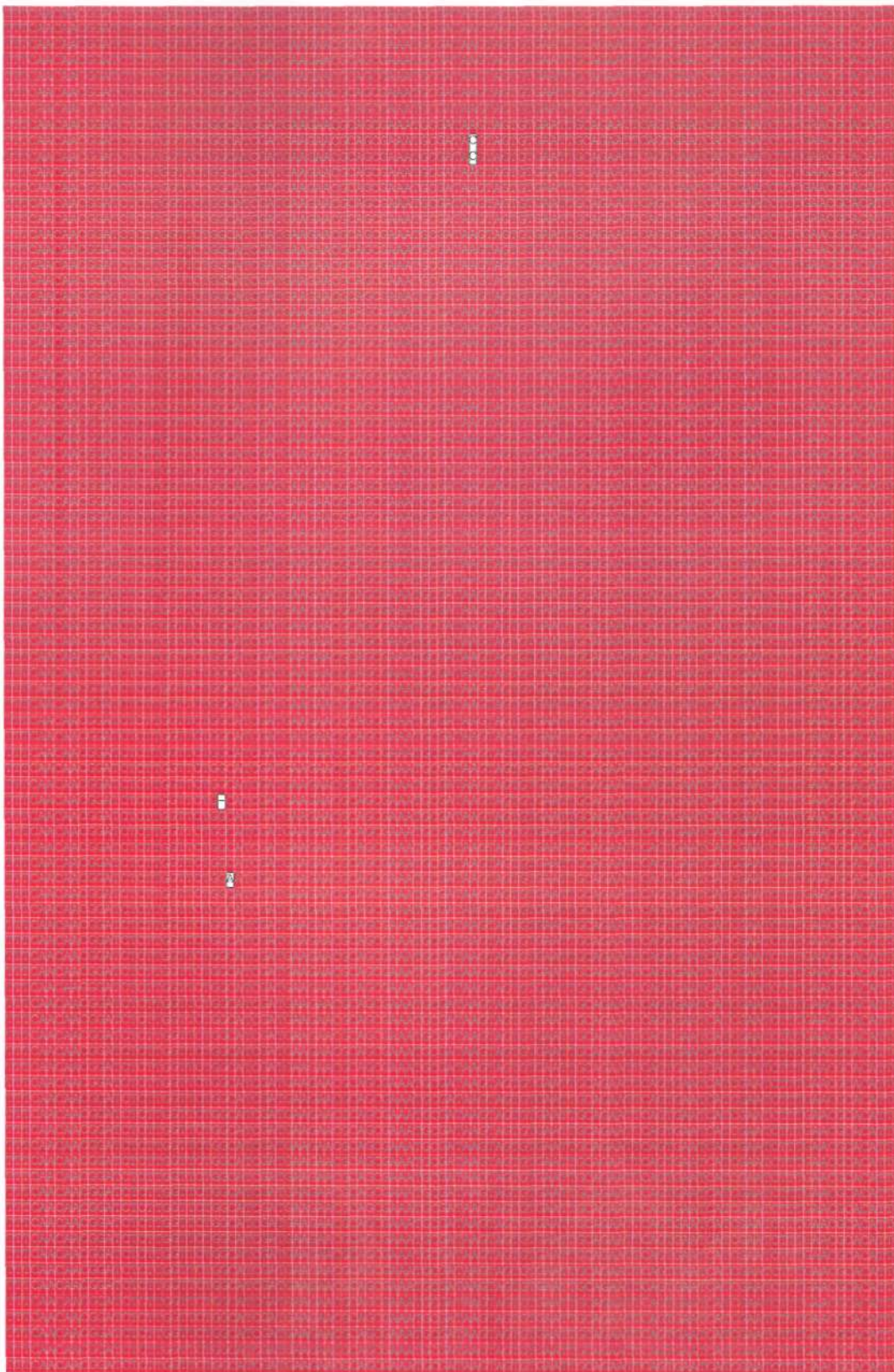


Figura 6: Alinhamento dos isolados e espécies do GenBank na região 5.8S do rDNA indicando reduzida variação (somente 4 substituições de nucleotídeos). Em vermelho são apresentados os nucleotídeos idênticos entre os isolados sequenciados.

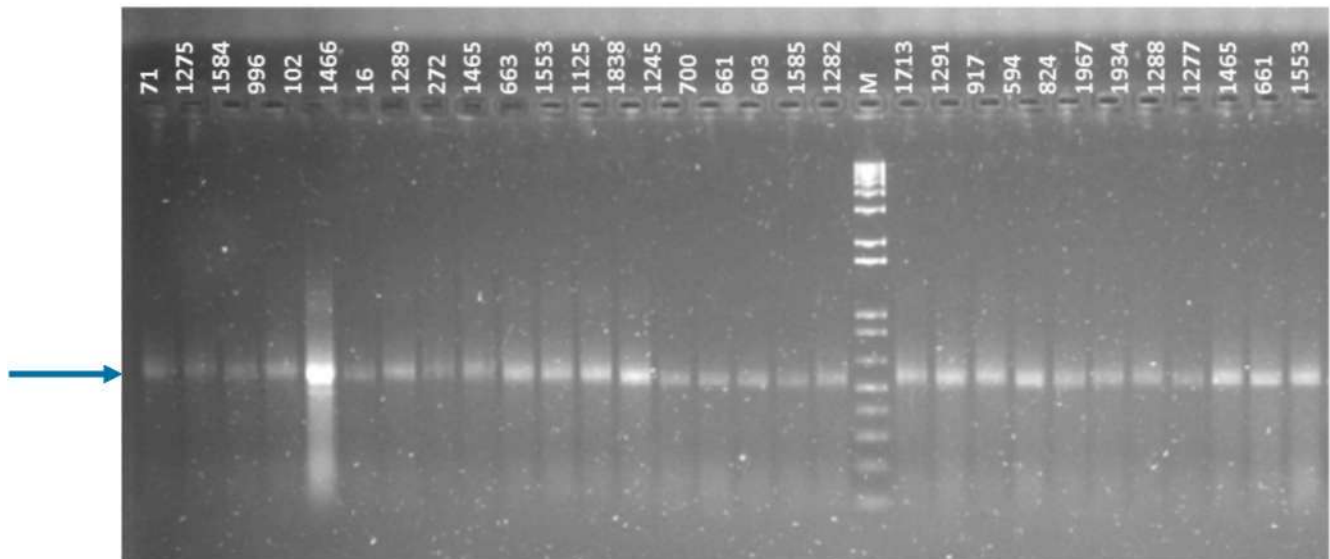


Figura 7: Produto da reamplificação do fragmento do gene *Alt a1* analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica o amplicom único de tamanho aproximado de 500 pb.

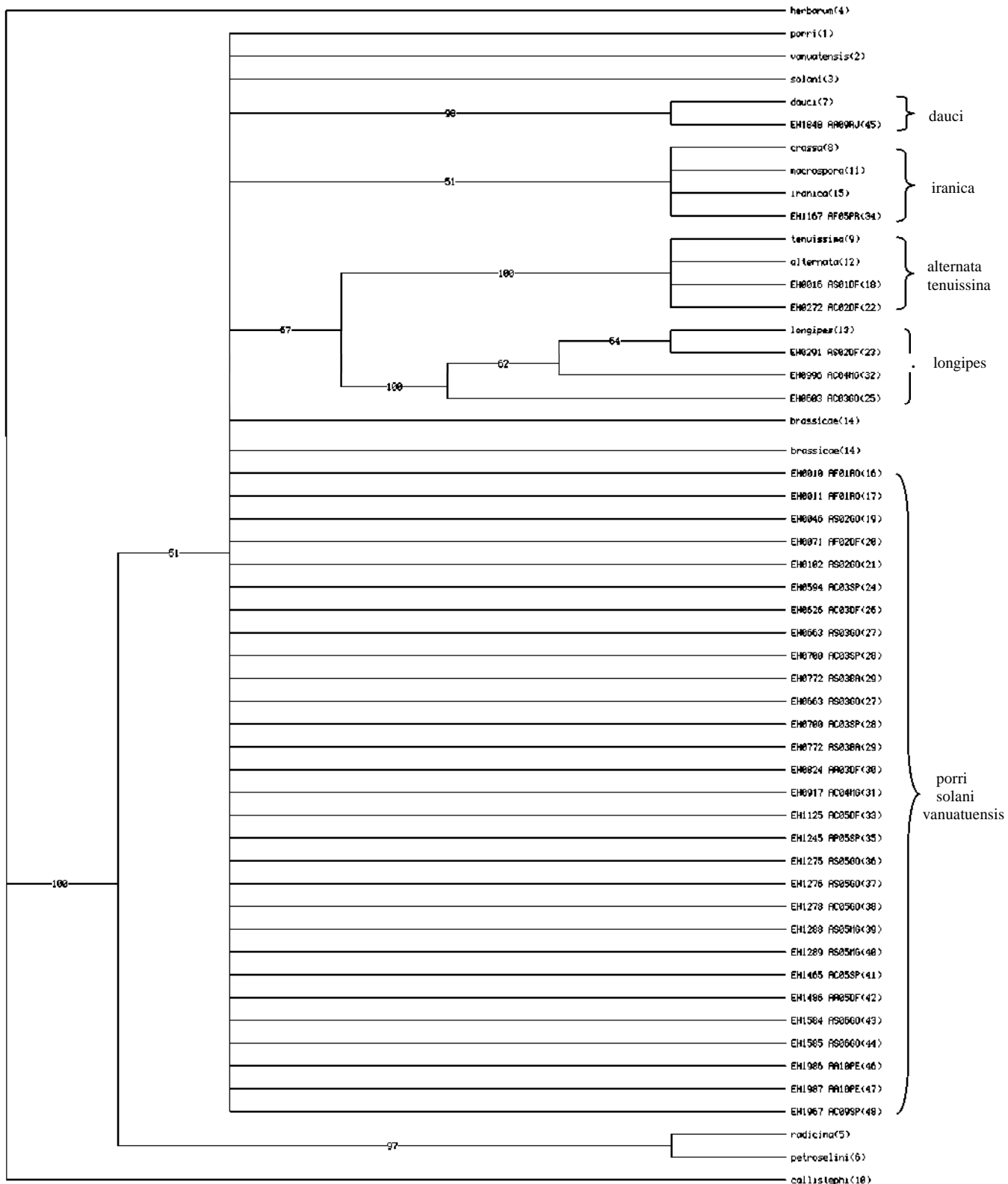


Figura 8: Árvore consenso obtida pelo método de parcimônia com busca heurística utilizando o alinhamento em uma região do gene *Alt a1*. Os valores numéricos representam o índice bootstrap após 1000 repetições. As sequências das espécies *P.herbarum* e *S.callistephi* foram utilizadas como grupos externos.

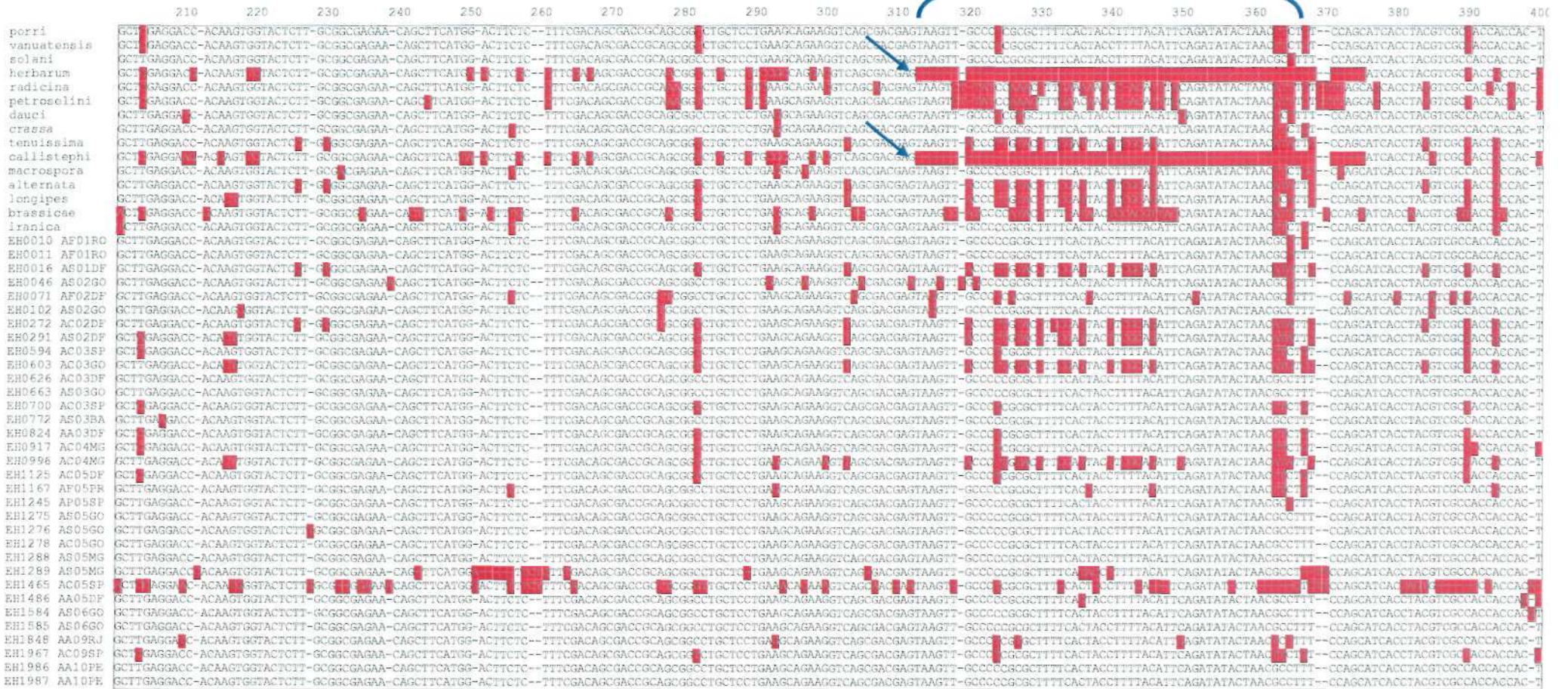


Figura 9: Alinhamento mostrando a posição do íntron do gene *Alt al* presente em algumas espécies de *Alternaria* e nos isolados. A chave e as setas mostram a região do íntron.

Morfologia e morfometria dos isolados

Alguns isolados esporularam somente quando submetidos ao primeiro procedimento e outros, por sua vez, produziram esporos somente no segundo método citado. Há ainda, aqueles isolados que esporularam nas duas maneiras realizadas e outros em que não foi constatada esporulação. Os testes foram repetidos visando obter o maior número possível de isolados com esporulação suficiente para a análise morfológica dos isolados esporulados. Para alguns isolados a esporulação ocorreu somente após a repetição do procedimento.

Dos 40 isolados utilizados para o teste, somente em 10 foi observada esporulação. A dificuldade de esporulação *in vitro* é típica das principais espécies patogênicas do gênero que apresentam conídios largos e solitários. Em contraste, muitas espécies que produzem esporos em cadeia, por exemplo, *A. alternata*, *A. tenuissima* esporulam facilmente. Todavia, em alguns casos uma indução externa pode aumentar a esporulação em algumas espécies (Rotem, 1994). A esporulação foi obtida nos isolados EH 16, EH 43, EH 272, EH 602, EH 603, EH 642, EH 823, EH 996, EH 1167, EH 1227. O isolado EH 2084 foi retirado direto de folha de alho e foi utilizado somente em termos de comparação já que os demais foram obtidos de meio de cultura.

Os isolados avaliados apresentaram bastante variação quanto às estruturas medidas, com exceção da largura do conidióforo. O comprimento do conídio variou de 11 a 103 μm e a largura de 5 a 24 μm . As medidas de comprimento do rostro foram as que tiveram maior variação de 2 a 87 μm . Já a largura do rostro variou de 2 a 7,5 μm . Os isolados apresentaram de 1 a 11 septos transversais enquanto o número de septos longitudinais não variou muito (Tabela 3). No isolado EH 2084, retirado diretamente de folhas de alho, observaram-se os maiores valores de comprimento e largura dos conídios, comprimento e largura do rostro, bem como largura de conidióforos. Essa grande diferença pode ter ocorrido pelo fato de os demais isolados terem sido cultivados em meio de cultura enquanto que o EH 2084 foi retirado de material vegetal. Este isolado não foi incluído na análise molecular e foi utilizado somente para comparação com os demais obtidos em meio de cultura.

A comparação das características morfométricas dos 10 isolados utilizados no estudo com a descrição de Simmons (2007) permite enquadrá-los em algumas espécies

de *Alternaria* com algumas variabilidades devido a diferenças entre os valores da literatura e os obtidos no trabalho. As espécies usadas para comparação com os isolados foram as mesmas utilizadas na análise molecular. Quase todos os isolados, de acordo com as características morfológicas medidas (Tabela 3) e pelas fotografias observadas (Figuras 10 e 11), podem ser enquadrados no grupo de espécies *A. alternata* e *A. tenuissima* que é o grupo que produz conídios pequenos dispostos em cadeia. Apesar de apresentarem algumas dimensões inferiores, os formatos e aspectos dos conídios desses isolados têm similaridade com o que foi descrito por Simmons (2007). O isolado EH 1167 foi o que apresentou maior distinção morfológica em relação aos demais, possuindo conídios grandes e bastante robustos, com rostros relativamente extensos, não produzidos em cadeias (Figura 11 - I). As dimensões deste isolado, bem como a forma dos conídios, permitem alocá-lo no grupo de espécies *crassa* ou *iranica*. O isolado EH 1227 (Figura 11 - J) é ligeiramente diferente dos demais e foi enquadrado quanto a dimensões e aspectos das estruturas observadas no grupo de espécies de *A. longipes*.

Tabela 3: Dimensões das estruturas de isolados de *Alternaria*, *ten=*A. tenuissima*, al=*A. alternata*, lon=*A. longipes*, crassa=*A. crassa*.

Isolados	Hospedeira	Local coleta	de	Comprimento do conídio (µm)	Largura do conídio (µm)	Comprimento do rostro (µm)	Nº de septos transversais	Nº de septos longitudinais	Largura do conidióforo (µm)	Presença de cadeia	ITS*	Alta1*
EH 16	Alho	Gama -DF		12 - 37	7 - 12	4 - 15	2 - 7	0 - 2	4 - 9	SIM	ten,al,lon	ten, al
EH 43	Alho	São Gotardo-MG		21- 53	8 - 19	6 - 13	2 - 6	0 - 4	3 - 6	NÃO		
EH 272	Cebola	Cristalina-GO		11 - 39	5 - 11	0 - 22	1 - 6	0 - 2	4 - 5	SIM	ten,al,lon	ten, al
EH 602	Cebola	São Gotardo-MG		17 - 39	5 - 13	3 - 21	2 - 6	0 - 2	3 - 6	SIM	ten,al,lon,	
EH 603	Cebola	Cristalina - GO		20 - 69	6 - 16	0 - 30	3 - 8	0 - 2	3 - 8	SIM	ten,al,lon	lon
EH 642	Cebola	São Gotardo-MG		15 - 39	5 - 14	4 - 24	1 - 6	0 - 2	3 - 6	SIM	ten,al,lon	
EH 823	Alho - poró	Vargem Bonita -DF		12 - 39	5 - 11	2 - 28	1 - 5	0 - 1	4 - 5	SIM	ten,al,lon,	
EH 996	Cebola	São Gotardo-MG		22- 54	7 - 17	5 - 16	2 - 7	0 - 3	3 - 4	SIM	ten,al,lon	lon
EH 1167	Cebolinha	Araucária-PR		41 - 67	13 - 24	4 - 89	5 - 8	0 - 2	4 - 7	NÃO		crassa
EH 1227	Cebola	Pelotas -RS		17 - 53	11 - 21	8 - 35	2 - 6	0 - 5	2 - 6	SIM	ten,al,lon	
EH 2084	Alho	Urutuaí-GO		54 - 103	10 - 20	20 - 87	6 - 11	0 - 2	8 - 9	NÃO		

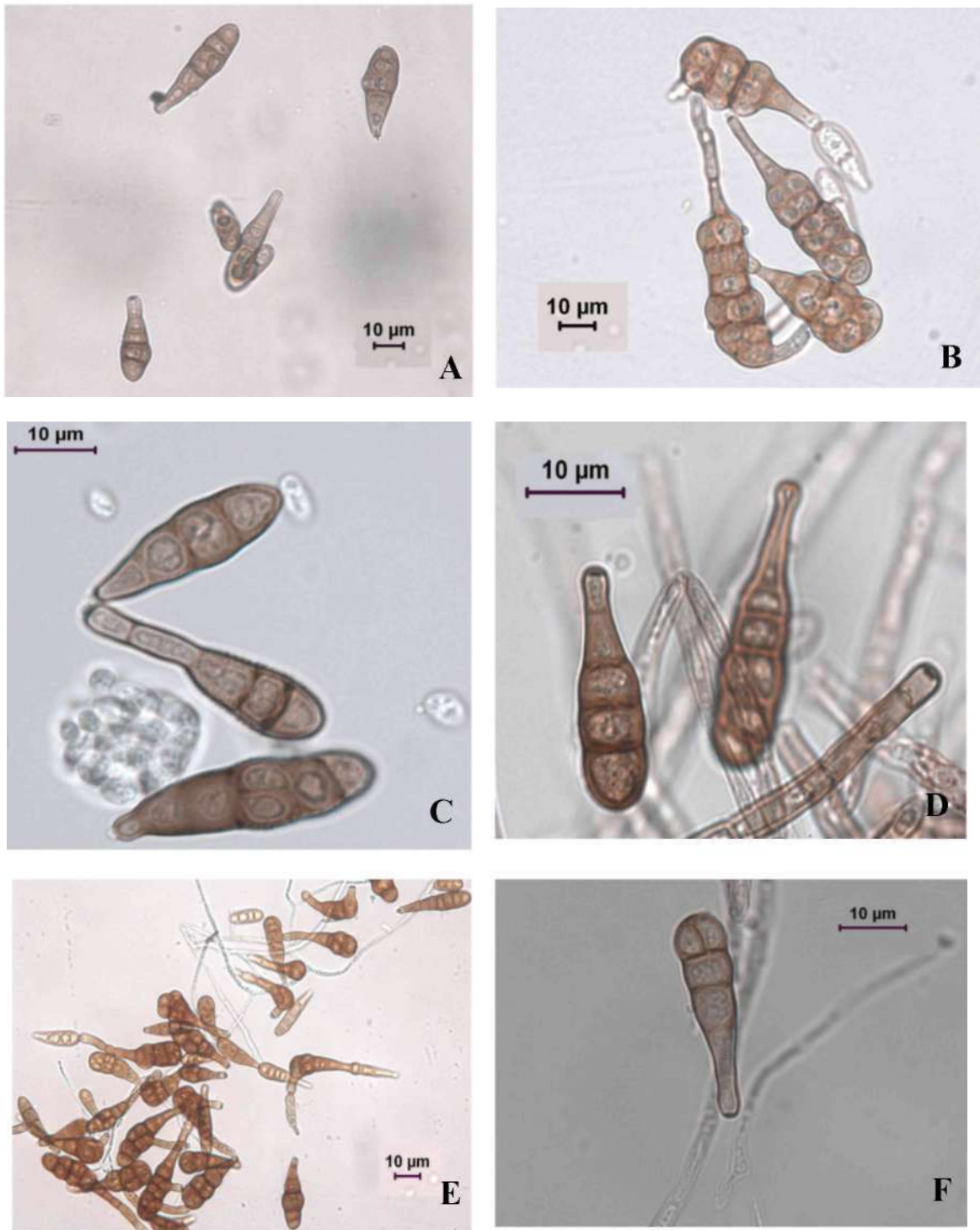


Figura 10: Fotos dos isolados EH 16 (A), EH 43 (B), EH 272 (C), EH 602 (D), EH 603 (E), EH 642 (F).

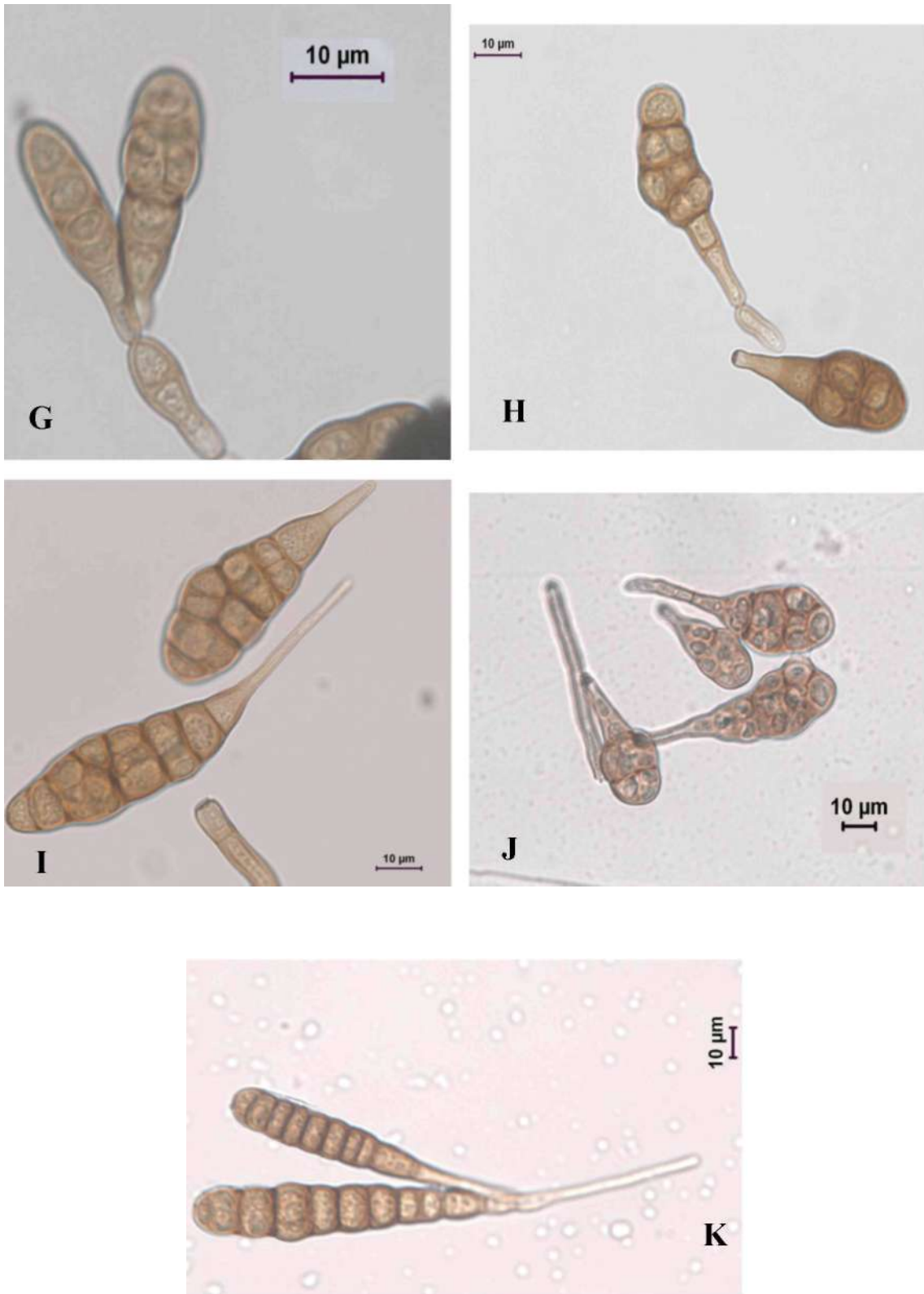


Figura 11: Fotos dos isolados EH 823 (G), EH 996 (H), EH 1167 (I), EH 1227 (J), EH 2084 (K).

DISCUSSÃO

A utilização de caracteres morfológicos de forma isolada na delimitação de espécies do gênero *Alternaria* tem sido evitada devido à considerável variabilidade no tamanho, forma e septação de conídios tanto dentro de uma espécie quanto até mesmo dentro de uma mesma colônia do fungo (Simmons, 1992). Esta variabilidade foi comprovada no presente estudo. Por esta razão foi realizada uma tentativa de combinar caracteres morfológicos com dados moleculares. Oitenta (80) isolados de *Alternaria* obtidos de diferentes plantas de um mesmo gênero foram caracterizados utilizando o DNA que codifica o RNA ribossomal, incluindo as regiões ITS 1-5.8S- ITS 2 e um gene codificador da proteína alergênica *Alt al*, além da caracterização morfológica. No entanto, apenas alguns dos isolados foram submetidos às três metodologias de avaliação devido, principalmente, à dificuldade de esporulação dos isolados. Esta dificuldade de esporulação *in vitro* do gênero *Alternaria* é típica de exemplares patogênicos, principalmente àqueles que produzem esporos largos e solitários. Por outro lado, muitas espécies que formam esporos em cadeia (por exemplo, *A. alternata*) e isolados saprofitos, em particular, esporulam facilmente e geralmente não necessitam de induções (Rotem 1994).

Na análise molecular a PCR do gene *Alt al* gerou um amplicom do tamanho esperado (em torno de 500 bases, Figura 7), não sendo observado nenhum polimorfismo de tamanho que indicasse a presença de deleções/inserções. Uma dificuldade encontrada com esta análise foi o fato de que os primers Alt-for e Alt-rev só foram capazes de amplificar metade dos isolados utilizados no trabalho. Além disso, foi necessário ainda realizar uma série de procedimentos para que o sequenciamento fosse possível. Por ser mais específico para *Alternaria*, esperava-se que o marcador fosse universal e gerasse maior diversidade dentro do gênero. Já tem sido relatada a necessidade da deleção de uma ou duas bases do terminal 3' dos *primers* utilizados para que eles possam ser universais (Hong *et al.*, 2005). Esta modificação poderá ser necessária para metade dos isolados de Aliáceas utilizados no presente estudo.

A análise de parcimônia com os dados do gene *Altal* indicou que houve 78 caracteres informativos que foram utilizados para agrupar os isolados em uma clade representada pela espécie *A porri*. Este parâmetro indicou que o gene *Altal* poderia ser mais informativo do que a região ITS1-5,8S-ITS2, que apresentou apenas 24 caracteres

informativos para parcimônia. Dentro deste grupo e mais próximos de *A. porri* foi colocada a espécie *A. solani*. Em um grupo separado foi colocada *A. alternata*, *A. longipes* e *A. tenuissima*. Estes grupos são similares aos encontrados em análise com as várias espécies do gênero *Alternaria* (Hong *et al.*, 2005).

Os iniciadores utilizados para amplificar a região ITS 1, 5.8S e ITS 2 resultaram em uma banda única que foi diretamente seqüenciada. A análise de parcimônia gerou uma árvore com topologia similar à gerada com os dados do gene *Alt a1*. No entanto, os valores de suporte *bootstrap* foram maiores. Os primers ITS 4 e ITS 5 permitiram a amplificação de todos os isolados, o que tornou a análise com este fragmento mais completa que a realizada com o gene *Alt a1*. Além disso, não foi necessária a re-amplificação do produto de PCR realizada com o fragmento *Alt a1*. Estes detalhes do procedimento indicam que a análise com o gene *Alt a1* necessita ser aperfeiçoada para ser considerada universal para o gênero *Alternaria*. A análise realizada com a região ITS permitiu separar os isolados em dois grandes grupos. O primeiro deles composto por *A. porri*, *A. vanuatuensis*, *A. solani*, *A. dauci*, *A. crassa*, *A. macrospora*, *A. iranica*. Estas espécies apresentam características semelhantes, ou seja: conídios largos, produzidos solitariamente, com rostros extensos. Dentro dele alguns isolados formaram subgrupos e dois isolados de alho-poró ficaram alocados com a espécie *A. dauci*. O segundo grupo foi formado com espécies similares a *A. alternata* (*A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. longipes*) que contém esporos dispostos em cadeias pequenas e não apresentam rostro extenso. Foi formado um subgrupo com os isolados alinhados com as espécies de *A. tenuissima*, *A. alternata* e *A. longipes*. Há ainda o subgrupo formado por um isolado de alho que se alinhou com a espécie *A. radicina* (Figura 4). Nos agrupamentos mostrados pela árvore gerada, não houve correlação entre hospedeiras e regiões, bem como data de coleta de isolados.

De maneira geral, os dados moleculares mostrados estão de acordo com o que já havia sido descrito na literatura por Simmons (1992) que subdividiu o gênero em espécies-grupos de acordo com algumas características morfológicas, como, por exemplo, presença ou ausência e tamanho de rostro, conídios dispostos em cadeia e tamanho do conídio. Esse resultado confirma também outras análises já realizadas com a região ITS nas quais as espécies de *Alternaria* também foram separadas em espécies-grupo assim como na morfologia (Pryor & Gilbertson, 2000; Pryor & Bigelow, 2003).

A espécie *A. petroselini*, apesar de ter sido enquadrada no segundo grupo alternata, apresenta características morfológicas distintas quando comparada às outras espécies desse grupo. Os conídios são mais robustos, bastante largos e não são produzidos em cadeia. Ademais, os esporos não contém rostro proeminente (Simmons, 2007). Pode ser por esse motivo que nenhum isolado foi agrupado com a espécie. Como já citado, um isolado (EH 324) ficou alinhado com *A. radicina*, espécie bastante semelhante a *A. petroselini* com conídios largos e relativamente pequenos produzidos solitariamente (Simmons, 2007). Isso indica que este isolado agrupado com *A. radicina* representa um exemplar diferente dos demais alocados nos dois grupos grandes gerados pela análise. Ainda não foi realizada a análise morfológica deste isolado.

A análise molecular realizada com esta região enquadrando os isolados, nos quais foi feita caracterização morfológica, no grupo alternata com exceção do isolado EH 1167 que não foi incluído na análise realizada com a região ITS, pois foi eliminado do alinhamento por conter sequência ruim.

O grupo de espécies porri gerado na filogenia com a região ITS apresentou alto grau de similaridade interna (88-100%). Sequências dos isolados 100% idênticas à de *A. porri* foram omitidas da análise filogenética. *A. vanuatuensis* foi incluída, apesar de apresentar 100% de identidade com *A. porri*. Esse alto grau de similaridade também foi constatado em trabalho realizado por Pryor & Gilbertson (2000), onde todas as cinco espécies do grupo porri analisadas (*A. porri*, *A. solani*, *A. dauci*, *A. crassa*, *A. macrospora*) apresentaram pouca variação entre suas sequências. Em estudos envolvendo outros gêneros de fungos foi encontrada bastante variabilidade em sequências de ITS e SSU dentre espécies relacionadas muito próximas (Li *et al.*, 1994; Morales *et al.*, 1992, Kretzer *et al.*, 1996), sugerindo que isolados de *Alternaria* com pequena ou nenhuma variação na sequência, podem representar categorias intraespecíficas como subespécies, variedades e/ou estirpes (Pryor & Gilbertson, 2000). Já foi proposto que certos membros do grupo porri representam variedades ou formas especiais de uma única espécie (Joly 1964; Neegard, 1945). Os resultados deste trabalho em conjunto com os gerados por Pryor & Gilbertson (2000) que revelaram altos graus de similaridade entre espécies do grupo porri e os isolados, dão suporte a concepção.

A árvore filogenética do gene *Alt a1* apresentou todos os isolados em um grande clado que contém subgrupos menores. Um isolado de cebolinha ficou agrupado com a

espécie de *A. dauci*. O outro subgrupo formado foi o de *A. tenuissima* e *A. alternata* com dois isolados; EH 16 e EH 272. O mesmo agrupamento ocorreu na análise com ITS, ou seja, os dois isolados ficaram no grupo *alternata*. O outro grupo formado por *A. longipes* enquadrou mais três isolados, dois de cebola e um de alho, EH 291, EH 996 e EH 603 (Figura 8). Na árvore do ITS, tais isolados se dispuseram junto com as três espécies, *A. alternata*, *A. tenuissima* e *A. longipes*. No caso deste agrupamento, foi possível uma separação melhor dos isolados na análise com *Alt a1* já que eles se agruparam junto com uma única espécie (*A. longipes*). O isolado EH 1167 de cebolinha foi o único que se agrupou com *A. crassa*, *A. macrospora* e *A. iranica* (Figura 4), indicando que se difere da maioria.

Em relação à morfologia e morfometria realizadas, dos 40 isolados colocados para esporular nos dois experimentos testados, somente 10 produziram conídios e conidióforos passíveis de serem medidos. Apenas um isolado (EH 1167) produziu esporos solitários e não dispostos em cadeia. Este isolado foi alocado no grupo *A. crassa* na análise do gene *Alt a1* (Figura 8). Os outros, apesar de pequenas diferenças, têm características morfológicas muito parecidas (Figuras 10 e 11) e enquadram-se no grupo de esporos produzidos em cadeia e menores.

Ao serem comparadas as dimensões das estruturas e frutificações dos isolados medidas, bem como as fotografias (Figuras 10 e 11), com a descrição das espécies realizada por Simmons (2007), foi possível constatar que os isolados, se enquadraram, genericamente nas espécies usadas para a construção das árvores, as quais eles se agruparam tanto em relação às sequências da região ITS quanto às sequências do gene *Alt a1*.

Os isolados esporulados, EH 16, EH 43, EH 271, EH 602, EH 603EH 642, EH 823, EH 996, segundo as dimensões medidas foram enquadrados no grupo *alternata* e *tenuissima*. O EH 1227 foi alocado no grupo de espécies de *A. longipes*. E por último o isolado EH 1167 ficou no grupo de *A. crassa*. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos na análise molecular. Na árvore ITS, todos os isolados, com exceção do EH 1167 que não estava presente na análise, ficaram enquadrados no grupo-espécie *alternata* que inclui *A. tenuissima*, *A. alternata* e *A. longipes* (Figura 4). Os isolados EH 16 e EH 272 ficaram juntos com as espécies de *A. alternata* e *A. tenuissima*. Na análise com *Alt a1*, os isolados EH 996 e EH 603 ficaram mais próximos de *A. longipes*. O

isolado com características morfológicas divergentes ficou alocado com as espécies *A. crassa*, *A. macrospora*, *A. iranica* (Figura 8).

A partir das considerações feitas conclui-se que a filogenia molecular utilizando o gene *Alt1* e a região ITS1-5.8S-ITS2 foi consistente com os resultados da caracterização morfológica. Esta comparação teria sido mais abrangente caso fosse possível realizar a esporulação de uma maior quantidade de isolados que produzem conídios solitários e grandes com rostros proeminentes. De acordo com o que foi mostrado pelas árvores filogenéticas, neste trabalho, há mais isolados com esse padrão de esporos e frutificações do que com esporos pequenos, normalmente dispostos em cadeia. Ademais, quando foi feito isolamento monospórico direto das lesões, a grande maioria deles era do tipo solitário e com rostro comprido. Só eram selecionados em cadeia e sem rostro ou com rostro curto, quando estes apareciam em lesões, sem a presença dos primeiros.

A expectativa inicial deste trabalho foi que a análise com o gene *Alt 1* pudesse discriminar melhor as espécies porque é uma região conservada específica deste gênero (De Vouge *et al.*, 1996; Cramer & Lawrence, 2003). Por outro lado, o rDNA é uma região universal onde espera-se baixo grau de polimorfismo entre isolados da mesma espécie (Vilgalys & Gonzales, 1990). Após a realização das análises com as duas regiões genômicas, foi possível constatar que, neste caso, os iniciadores correspondentes à região ITS em geral apresentaram uma melhor resolução taxonômica que o *Alt 1*. Além disso, amplicons da região ITS1-5.8S-ITS2 foram obtidos para todos os isolados em estudo e puderam ser sequenciados diretamente, sem necessidade de reamplificação, o que tornou a análise com rDNA mais simples do que a análise feita com o gene *Alt1*.

Com o presente trabalho é possível concluir que há variabilidade dentro dos isolados de *Alternaria* que poderá ser melhor explorada refinando-se as regiões genômicas empregadas ou ainda utilizando outras regiões em conjunto com as que já foram estudadas. Pois dessa forma haverá mais resultados para comparação entre os isolados e as espécies e para a construção de filogenias mais robustas e completas. Em relação à morfologia, é necessário desenvolver uma metodologia que seja eficiente para induzir esporulação neste grupo de isolados oriundos de plantas do gênero *Allium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, D. Aliáceas. In: Manual de culturas hortícolas. Vol 1. 1ª ed. Lisboa Portugal. 2006.

BOITEUX, L.S., M.E.N. FONSECA & P.W. SIMON, 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on RAPD-based genetic fingerprinting analysis in carrot. J Amer Soc Hort Sci 124: 32–38.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 42:225. 1939

CHOU, H.H., WU, W.S. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. Mycological Research 106:164–169. 2002.

CRAMER, R.A., LAWRENCE, C.B. Cloning of a gene encoding an Alt a 1 isoallergen differentially expressed by the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* during *Arabidopsis* infection. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2361–2364. 2003.

DE VOUGE, M.W., THANKER, A.M., CURRAN, I.H.A., ZHANG, L., MURADIA, G., RODE, H., VIJAY, H.M. Isolation and expression of a cDNA encoding on *Alternaria alternata* Alt a 1 subunit. Int. Arch. Allergy Immunol. 111, 385–395. 1996.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Editora UFV. 3ª ed. Viçosa, MG. 421p. 2007.

FRITSCH, R.M., FRIESEN, N. Evolution, domestication and taxonomy. In: RABINOWITCH, H.D., CURRAH, L (Eds). Allium Crop science: recent advances. 515p. 2002.

HEREDIA ZARATE, N. A., VIEIRA, M. C., WEISMANN, M., LOURENÇÃO, A. L. F. Produção e renda bruta de cebolinha e de salsa em cultivo solteiro e consorciado. Horticultura Brasileira. Brasília, DF. Vol. 21. P 574-577. 2003.

HONG, S.G., CRAMER, R.A., LAWRENCE, C.B., PRYOR, B.M. Alt a1 homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. Fungal Genetics and Biology. 42 (2005) 119-129. 2004

JOLY, P. Le genre *Alternaria*. Encyclopedie Mycologique. P. Lechevalier. Paris. 1964.

KRETZER, A., LI, Y., SZARO, T., BRUNS, T. D. Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus sensu lato*: phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia* 88: 776-785. 1996.

LI, K. N., ROUSE, D. I., GERMAN, T. L. Differentiation of ascomycetes with PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4324-4331. 1994.

LOURENÇO JR, V., MOYA, A., GONZÁLEZ-CANDELAS, F., CARBONE, I., MAFFIA, L.A., MIZUBUTI, E.S.G. Molecular Diversity and Evolutionary Processes of *Alternaria solani* in Brazil Inferred Using Genealogical and Coalescent Approaches. *Phytopathology*. Vol 99. N°6. 2009.

MASSOLA JR, N.S., JESUS JR, W.C., KIMATI H. Doenças do alho e da cebola. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA. Manual de Fitopatologia. Doenças de plantas cultivadas. Vol 2 . 4ª Ed. 2005.

MENDES, M.A.S., SILVA, V.L., DIANESE, JC., FERREIRA, M.A.S.V., SANTOS C.E.N., GOMES NETO, E., URBEN, A.F., CASTRO, C. Fungos em plantas no Brasil. Brasília. Embrapa- SPI/ Embrapa Cenargen. 569p. 1998.

MILLER, M. E., LACY, M. L. Purple blotch. In: SCHWARTZ, H. F., MOHAN, S. K. (Ed.). Compendium of onion and garlic diseases. St. Paul: APS Press. p. 23-24. 1995.

MORALES, V. M., PELCHER, L. E., TAYLOR, J. L. Comparison of the 5.8s rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. *Current Genetics* 23: 490-495. 1992.

NEEGARD, P. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Oxford University Press London. 1945

NUNES, M. E. T.; KIMATI, H. Doenças do alho e cebola. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). Manual de fitopatologia: vol. 2: doenças das plantas cultivadas. vol. 2. Piracicaba: Ceres. p. 49-64. 1997.

PRYOR, B.M., BIGELOW, D.M. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nymphaea* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia*. 95, 1139-1152. 2003.

PRYOR, B.M., GILBERTSON, R.L. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research* 104 : 1312–1321. 2000.

REIS, A., HENZ, G.P. Mancha-púrpura do alho e da cebola: doença difícil de controlar. Comunicado técnico 71. Embrapa. Brasília-DF. 2009.

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

SIMMONS, E. G. *Alternaria*: an identification manual. Utrecht: CBS. CBS Biodiversity Series, 6. P.775. 2007.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: CHELKOWSKI, J., VISCONTI, A. (Eds): *Alternaria*: biology, plant diseases and metabolites 1–35. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1992.

STEBBINS, M.E. ROBBINS, W.J. Mineral oil and preservation of fungous cultures. *Mycologia*, 41: 632, 1949.

VILGALYS, R., GONZALEZ, D. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Current Genetics* 18:277-280. 1990.

WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE, AND J. W. TAYLOR. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY J. J., WHITE, T. J. (Eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York. 1990.