

Contribuição para o estudo de fungos do género *Alternaria* em solanáceas no Ribatejo e Oeste

Beatriz Galvão Camelo dos Reis Henriques

Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre em
**Engenharia Agronómica com especialização em Proteção de
Plantas**

Orientadores: Professor auxiliar Arlindo Lima

Professora auxiliar Ana Paula Ferreira Ramos

Júri:

Presidente: Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Arlindo Lima, Professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientador

Mestre Eugénio Luís Fraga Diogo, Técnico Superior do Instituto Nacional de Invertebrados Agrários e Veterinários, na qualidade de especialista

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação apenas foi possível graças ao apoio e à colaboração de várias pessoas.

Aos meus Professores, Ana Paula Ramos e Arlindo Lima, queria agradecer por todo o tempo disponibilizado na realização deste trabalho, por toda a paciência, orientação e incentivo prestados durante todo este longo processo.

Aos funcionários do laboratório pela simpatia. Um obrigado especial à Tatiana por todo apoio no laboratório, imprescindível na realização da dissertação. À Dona Amélia por toda a ajuda na estufa e à Dona Olga pela companhia.

A todos os meus amigos pela força e atenção que prestaram nos momentos menos fáceis, pelos conselhos preciosos e pela total disponibilidade.

À minha família por todo o apoio económico, força e carinho que sempre demonstraram ao longo de toda a minha vida académica e na elaboração deste trabalho.

RESUMO

As solanáceas cultivadas, como a batateira, o tomateiro e o pimenteiro, com elevado interesse económico a nível nacional e mundial, têm sofrido perdas de produção inerentes a doenças como a alternariose cada vez mais notórias. A alternariose é uma doença provocada por fungos do género *Alternaria* com capacidade para afetar o caule, a folha e os frutos dos hospedeiros suscetíveis.

Com o principal objetivo de averiguar as espécies associadas a alternariose em hospedeiros da família Solanaceae, na região do Ribatejo e Oeste de Portugal, realizaram-se estudos laboratoriais.

Após prospeção a campos de cultura, foi criada uma coleção de 30 isolados de *Alternaria* spp. Para identificação das espécies foram estudadas as características morfológicas e moleculares dos isolados e foram realizados testes de patogenicidade e de virulência em discos de folhas de diversos hospedeiros de solanáceas como fisális, jiló, malagueta, pimenteiro, batateira e tomateiro.

Os resultados revelaram que a maioria dos isolados pertencem à espécie *A. alternata* (60%), embora se tenham encontrado vários isolados da espécie *A. infectoria* (27%), e ainda *A. arborescens*, *A. tenuissima* e *A. consortialis*. As espécies identificadas pertencem às secções *Alternata*, *Infectoreae* e *Ulocladioides*.

Nos estudos de patogenicidade e virulência ocorreram isolados de *A. alternata* que não se mostraram patogénicos para o hospedeiro de origem, mostrando-se no entanto, patogénicos em tomateiro e batateira. Todas as espécies de *Alternaria* testadas se mostraram mais virulentas em batateira do que nos restantes hospedeiros estudados. Os isolados das espécies *A. alternata* e *A. arborescens* revelaram-se os mais virulentos provocando maior índice de doença nos discos das folhas de tomateiro e batateira.

Palavras-chave: tomateiro; batateira; alternariose, *Alternaria* spp., patogenicidade

ABSTRACT

A contribution to the study of *Alternaria* spp. in Solanaceae in the Ribatejo and Oeste Region

Cultures such as potato, tomato and sweet pepper plants, have a high national and international economic interest. These have been suffering production losses due to numerous diseases, among which *Alternaria* disease, caused by fungi of the genus *Alternaria* which can affect the stem, leaf and fruit of susceptible hosts.

The main purpose of this study was to evaluate which *Alternaria* species are associated with *Alternaria* disease in solanaceous plants in the Ribatejo and Oeste Regions. Therefore, laboratory research was conducted.

After field survey, a collection of thirty isolates of *Alternaria* species was created and morphocultural and molecular characteristics of these isolates were studied. Additionally, each isolate was inoculated in leaf dics from the original host plant and from potato and tomato plants.

The results of morphocultural characteristics and the sequencing revealed that the majority of the isolates belonged to *A. alternata* species (60%), although *A. infectoria* (27%), *A. arborescens*, *A. tenuissima* and *A. consortialis* were also isolated. The identified species belong to *Alternata*, *Infectoreae* and *Ulocladioides* sections.

Pathogenicity and virulence experiments revealed that some *A. alternata* isolates were not pathogenic towards their original host while being pathogenic towards potato and tomato plants. All tested *Alternaria* species were more virulent in potato plants than in the other studied hosts. *A. alternata* and *A. arborescens* were the most virulent, having an increased disease rate on potato and tomato plant's leaves.

Keywords: tomato, potato, early blight, *Alternaria* spp., pathogenicity

Lista de binómios científicos

Aloe barbadensis Mill.
Alternaria alternata (Fr.) Keissl.
Alternaria arborescens E.G. Simmons
Alternaria beringelae E.G. Simmons
Alternaria capsici E.G. Simmons
Alternaria cassiae Jurair & A. Khan
Alternaria consortialis (Thüm.) J.W. Groves & S. Hughes
Alternaria crassa (Sacc.) Rands
Alternaria cretica E.G. Simmons & Vakal
Alternaria cyphomandrae E.G. Simmons
Alternaria fasciculata (Cooke & Ellis) L.R. Jones & Grout
Alternaria grandis E.G. Simmons
Alternaria infectoria E.G. Simmons
Alternaria linariae (Neerg.) E.G. Simmons
Alternaria longissima Deighton & MacGarvie
Alternaria protenta E.G. Simmons
Alternaria solani (Ellis & G. Martin) L.R. Jones
Alternaria subcylindrica E.G. Simmons
Alternaria tenuis Nees
Alternaria tenuissima (Nees) Wiltshire
Alternaria tomatophila E.G. Simmons
Aronia melanocarpa (Michx.) Elliot
Avicennia marina (Forssk.) Vierh.
Brassica oleracea L.
Capsicum annuum L.
Capsicum frutescens L.
Colletotrichum coccodes (Walls.) S. Hughes
Crotalaria spectabilis Roth.
Datura stramonium L.
Macrosporium solani Ellis & G. Martin
Malus domestica (Borkh.) Borkh.
Oryza sativa L.
Physalis ixocarpa Brot. ex Hornem.
Physalis peruviana L.
Physalis philadelphica Brot. ex Hornem.
Physalis pruinosa L.
Physalis pubescens L.
Senna obtusifolia (L.) H.S. Irwin & R.C. Barneby
Senna occidentalis (L.) H.S. Irwin & R.C. Barneby
Solanum aethiopicum L.
Solanum betaceum Cav.
Solanum lycopersicum L.
Solanum macrocarpon L.
Solanum melongena L.
Solanum muricatum Aiton
Solanum tuberosum L.
Torula alternata Fr.
Ulocladium consortiale (Thüm.) E.G. Simmons

Índice

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 12 |
| 2.1 | A importância das solanáceas | 12 |
| 2.2 | O género <i>Alternaria</i> | 14 |
| 2.3 | Fungos do género <i>Alternaria</i> em solanáceas | 17 |
| 2.3.1 | Perspetiva histórica dos agentes causais | 17 |
| 2.3.2 | Caracterização morfológica | 18 |
| 2.4 | Alternariose | 22 |
| 2.4.1 | Sintomas de alternariose | 22 |
| 2.4.2 | O ciclo da alternariose | 25 |
| 2.4.3 | Patogenicidade de <i>Alternaria</i> spp. | 27 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 3.1 | Prospecção, isolamento e conservação dos isolados | 29 |
| 3.2 | Características morfo culturais dos isolados | 30 |
| 3.2.1 | Características culturais | 30 |
| 3.2.2 | Características morfológicas e biometria dos conídios | 30 |
| 3.3 | Caracterização molecular dos isolados de <i>Alternaria</i> spp. estudados | 31 |
| 3.3.1 | Extração do DNA | 31 |
| 3.3.2 | Sequenciação e análise da região ITS do DNA ribossomal | 32 |
| 3.3.3 | Sequenciação e análise de um fragmento da proteína TEF1- α | 33 |
| 3.3.4 | Sequenciação e análise da região KOG1058 | 33 |
| 3.4 | Estudos de patogenicidade e virulência dos isolados de <i>Alternaria</i> spp. | 34 |
| 3.4.1 | Produção do material vegetal | 34 |
| 3.4.2 | Ensaio de patogenicidade e virulência em discos de folhas destacadas | 35 |
| 3.4.3 | Preparação da suspensão de conídios | 36 |
| 3.5 | Tratamento estatístico | 36 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |
| 4.1 | Coleção de isolados e dados de passaporte | 38 |
| 4.2 | Caracterização morfocultural | 39 |
| 4.2.1 | Crescimento das colônias | 39 |
| 4.2.2 | Características culturais | 41 |
| 4.2.3 | Características morfológicas dos conídios e padrão de esporulação | 48 |
| 4.3 | Caracterização molecular | 54 |
| 4.3.1 | Sequenciação de fragmentos da região ITS do DNA ribossomal | 54 |
| 4.3.2 | Sequenciação de fragmentos do gene TEF-1 α e da região KOG1058 | 56 |
| 4.4 | Estudos de patogenicidade e virulência dos isolados de <i>Alternaria</i> spp. | 60 |
| 5 | CONCLUSÕES E PERSPETIVAS | 64 |
| 6 | LISTA DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |
| 7 | ANEXOS | 73 |

Índice de Quadros

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Características biométricas dos esporos de <i>Alternaria alternata</i> segundo diversos autores | 19 |
| Quadro 2 - Características biométricas dos esporos de <i>Alternaria arborescens</i> segundo diversos autores | 20 |
| Quadro 3 - Características biométricas dos esporos de <i>Alternaria tenuissima</i> segundo diversos autores | 20 |
| Quadro 4 - Características biométricas dos esporos de <i>Alternaria infectoria</i> segundo diversos autores | 21 |
| Quadro 5 - Escala de severidade com a descrição sintomatológica correspondente a cada grau de doença, com fotografias, após sete dias de inoculação com isolados de <i>Alternaria</i> spp..... | 37 |
| Quadro 6 - Dados de passaporte dos isolados considerados no presente estudo, com referência ao hospedeiro de origem, órgão vegetativo a partir do qual foi obtido, local e data de colheita e sua identificação à espécie. | 38 |
| Quadro 7 - Sieriação dos isolados de <i>Alternaria alternata</i> de acordo com o teste de comparação do diâmetro médio das colónias (mm) em PDA, após incubação sob condições de ausência de luz, a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, ao fim de sete dias de crescimento (Teste de Tukey, 95% de confiança)..... | 39 |
| Quadro 8 - Sieriação dos isolados de <i>Alternaria infectoria</i> , <i>A. consortialis</i> , <i>A. tenuissima</i> e <i>A. arborescens</i> de acordo com o teste de comparação do diâmetro médio das colónias (mm) em PDA, após incubação sob condições de ausência de luz, a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, ao fim de sete dias de crescimento (Teste de Tukey, 95% de confiança) | 41 |
| Quadro 9 - Descrição das colónias dos isolados da coleção e fotografias, ao fim de 8 dias de crescimento, incubadas sob condições de ausência de luz, a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ | 42 |
| Quadro 10 – Parâmetros dendrométricos dos conídios dos isolados identificados neste estudo, em gelose 1%, com 10 dias de crescimento na ausência de luz a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Referência ao hospedeiro de origem e aos valores de comprimento e largura dos conídios, do número de septos transversais e do número de septos longitudinais. .. | 50 |
| Quadro 11 – Lista de isolados para os quais se obtiveram sequências das regiões ITS do DNA ribossomal, para o gene da proteína TEF1- α e para a região KOG1058, com a respectiva identificação com base nas características morfológicas e por confronto com a base de dados pública NCBI, com recurso à ferramenta BLASTn | 55 |
| Quadro 12 – Índice de doença (%) dos isolados de <i>Alternaria</i> estudados nos diferentes hospedeiros inoculados, calculados com base na escala de severidade proposta em Materiais e Métodos. | 62 |
| Quadro 13 – Índice de doença (%) de cada espécie de <i>Alternaria</i> no hospedeiro de origem, em batateira e em tomateiro, calculados com base na escala de severidade proposta em Materiais e Métodos. | 63 |
| Quadro 14 - Resultados das duas séries de inoculações em discos de folhas destacadas de tomateiro, batateira e do respetivo hospedeiro de origem para os isolados. São apresentadas as modas para cada série de inoculações, de acordo com a escala de severidade proposta em 'Materiais e Métodos', e a respetiva correlação. | 76 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Fig. 1 – Parão de esporulação das espécies (a) <i>Alternaria alternata</i> (grupo 4), (b) <i>A. arborescens</i> (grupo 3), (c) <i>A. tenuissima</i> (grupo 5) e (d) <i>A. infectoria</i> (grupo 6) e conídios representativos dessas espécies (adaptado de Orina et al., 2011) e de <i>A. consortialis</i> (e) (adaptado de Andersen & Hollensted, 2008) | 21 |
| Fig. 2a - Mancha com anéis concêntricos numa infecção de <i>Alternaria</i> sp. em folha de batateira;..... | 23 |
| Fig. 2b - Sintomas de alternariose em batateira em folhas senescentes | 23 |
| Fig. 3 - Ciclo da alternariose em batateira e tomateiro. (adaptado de Agrios (2005) e de Adhikari et al. (2017)) | 27 |
| Fig. 4 – Aspeto de tomateiros e batateiras tutoradas em vasos de polietileno, com três semanas de idade, produzidas em estufa com sistema <i>cooling</i> sob luz natural..... | 34 |
| Fig. 5 - Inoculação de discos de folhas destacadas dos hospedeiros em estudo por deposição de uma gotícula de suspensão de conídios do respetivo isolado de <i>Alternaria</i> spp. | 35 |
| Fig. 6 – Fotografias do padrão de ramificação, conídios e conidióforos de <i>A. alternata</i> (A, B e C), <i>A. arborescens</i> (D), <i>A. tenuissima</i> (E), <i>A. infectoria</i> (F e G) e <i>A. consortialis</i> (H, I e J), obtidas a partir de colónias com 7 dias de crescimento em meio de cultura de gelose 1%, na obscuridade, a 25±1°C. Nas fotografias identificadas como E e G estão evidenciadas características como a produção de conídios com bico no isolado identificado como <i>A. tenuissima</i> (PT624) e a formação lateral de um conidióforo secundário no isolado identificado como <i>A. infectoria</i> , respetivamente. | 52 |
| Fig. 7 - Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal para isolados de <i>Alternaria</i> spp., obtido através do agrupamento por <i>Maximum Likelihood method</i> ; foram utilizadas 1000 <i>bootstraps</i> e matrizes de distância de acordo com o modelo Jukes-Cantor; em cada nó, os valores apresentados representam o respetivo valor de <i>bootstrap</i> (valores superiores a 50 %); sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respetiva referência; a sequência de <i>Stemphylium herbarum</i> foi utilizada como <i>outgroup</i> | 57 |
| Fig. 8 - Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas de fragmentos do gene TEF-1 α para isolados de <i>Alternaria</i> spp., obtido através do agrupamento por <i>Maximum Likelihood method</i> ; foram utilizadas 1000 <i>bootstraps</i> e matrizes de distância de acordo com o modelo evolutivo Kimura 2; em cada nó os valores apresentados representam o respetivo valor de <i>bootstrap</i> (valores superiores a 50 %); sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respetiva referência; a sequência de <i>Stemphylium herbarum</i> foi utilizada como <i>outgroup</i> | 58 |
| Fig. 9 - Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas de fragmentos da região KOG1058 para isolados de <i>Alternaria</i> spp., obtido através do agrupamento por <i>Maximum Likelihood method</i> ; foram utilizadas 1000 <i>bootstraps</i> e matrizes de distância de acordo com o modelo evolutivo Kimura 2 (+G); em cada nó os valores apresentados representam o respetivo valor de <i>bootstrap</i> (valores superiores a 50 %); sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respetiva referência; a sequência de <i>Alternaria alternanthera</i> foi utilizada como <i>outgroup</i> | 59 |

1 INTRODUÇÃO

As solanáceas constituem a terceira família botânica mais importante economicamente e surgem como uma das culturas mais valiosas (Saisri, 2015) com espécies de plantas produtoras de tubérculos como a batateira (*Solanum tuberosum*), de frutos, como o tomateiro (*S. lycopersicum*), o pimenteiro e a malagueta (*Capsicum* spp.), o jiló (*S. aethiopicum*) e a fisális (*Physalis* spp.) que por vezes é utilizada como planta ornamental.

A batateira, é a quinta cultura mais produzida mundialmente. Em Portugal, a produção desta cultura diminuiu 7,3% entre 2014 e 2016, em regiões produtoras como Ribatejo e Trás-os-Montes, como consequência da redução da área cultivada, no entanto, continua a ser das culturas que ocupa maior área cultivada do território nacional. Relativamente ao tomate, Portugal situa-se entre os maiores produtores deste fruto a nível europeu, tendo atingido uma produção de 1,8 milhões de toneladas em 2015 (FAOSTAT, 2016). Porém, a área dedicada à produção de solanáceas e a sua produtividade têm sofrido flutuações, em parte como consequência da incidência e aumento da severidade de ataques de pragas e doenças como a alternariose. Esta micose causada por várias espécies do género *Alternaria* é atualmente referida como uma das mais importantes doenças em solanáceas.

As infeções de *Alternaria* spp. em solanáceas podem ocorrer em caules, folhas e frutos caracterizando-se pelo aparecimento de manchas negras de tecido necrótico, por vezes, com produção de anéis concêntricos em torno da lesão e rodeadas de um halo clorótico. Estes sintomas ocorrem nas folhas, podendo levar a uma diminuição significativa do potencial fotossintético das plantas e, consequentemente, da produção. A afetação dos frutos inviabiliza a sua comercialização e pode ser responsável por podridões no armazenamento (Thomma, 2003; Logrieco et al., 2009; Lawrence et al., 2013; Armitage et al., 2015). Na etiologia desta doença estão envolvidas sobretudo, as espécies *A. solani* e *A. alternata*, encontrando-se ainda referência a outras espécies como *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. infectoria*, *A. consortialis* e espécies de esporos grandes como *A. linariae*, *A. grandis* e *A. protenta* que estão associadas a maior severidade de sintomas da doença (Simmons, 2000; Woudenberg et al., 2014).

Em Portugal, pouco se sabe sobre as espécies associadas à alternariose de solanáceas e sobre aspetos epidemiológicos da população destes patogénios. Assim, estudaram-se 30 isolados de fungos do género *Alternaria* encontrados associados a material vegetal sintomático recolhido em campos e estufas de produção de solanáceas, na região do Ribatejo e Oeste.

Considerou-se como ferramenta deste trabalho uma coleção de isolados identificados à espécie pelo estudo das suas características morfológicas e moleculares. Adicionalmente, procedeu-se à avaliação da sua patogenicidade e virulência por inoculação de discos de folhas de batateira, tomateiro e dos hospedeiros de origem dos diferentes isolados.

O trabalho estrutura-se em cinco capítulos: no capítulo 1 apresenta-se uma “Introdução” com enquadramento e justificação do tema da dissertação; no capítulo 2, “Revisão Bibliográfica”, reuniu-se

a informação relacionada com o tema, incluindo a sistemática e taxonomia dos fungos do género *Alternaria* bem como as características e os critérios utilizados na identificação das espécies de *Alternaria* associadas a solanáceas, hospedeiros, ciclo de vida e sintomas de alternariose; no capítulo 3 estão descritos o “Material e Métodos” utilizados neste estudo; no capítulo 4, onde se apresenta a “Discussão dos Resultados” obtidos; e finalmente, no capítulo 5 as “Conclusões e Perspetivas Futuras” com a sugestão de possíveis trabalhos a desenvolver em sequência desta dissertação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A importância das solanáceas

A família *Solanaceae*, da ordem *Solanales*, é uma das maiores famílias de plantas angiospérmicas. É composta por mais de 90 gêneros que incluem mais de 2000 espécies. Os táxones desta família apresentam uma grande diversidade morfológica adaptando-se a diversos climas, desde algumas das florestas tropicais mais húmidas do mundo, que recebem mais de 3000 mm de precipitação anualmente, aos desertos mais secos e montanhas mais altas com queda de neve regular e temperaturas inferiores a zero graus (Fernandez-Pozo, 2014). Esta diversidade permite que se adaptem estando amplamente distribuídas e presentes em todos os continentes, excetuando na Antártida (“*Solanaceae Source*,” 2017). Sendo originárias da América do Sul, é neste continente onde naturalmente se regista uma maior diversidade de espécies, incluindo 50 gêneros endêmicos (D’Arcy, 1991).

As solanáceas constituem a terceira família botânica mais importante economicamente e surgem como uma das culturas mais valiosas, com espécies cultivadas muito variadas e associadas a diversas utilidades (Saisri, 2015). Espécies desta família incluem plantas produtoras de tubérculos como a batateira (*Solanum tuberosum*), de frutos, como o tomateiro (*S. lycopersicum*), a beringela (*S. melongena*), o pimento e a malagueta (*Capsicum* spp.), o tomate-maracujá (*S. betaceum*), o melão-andino (*S. muricatum*), o jiló (*S. aethiopicum*), a giboma (*S. macrocarpon*) e a fisális (*Physalis* spp.) e de folhas comestíveis, como a giboma (Saisri, 2015; “*Solanaceae Source*,” 2017). Adicionalmente, inclui espécies utilizadas como ornamentais (*Petunia* spp., *Brugmansia* spp., *Datura* spp., *Physalis* spp. e *Capsicum* spp.) e medicinais, dada a particularidade de algumas espécies da família *Solanaceae* produzirem alcaloides como metabolitos secundários (“*Solanaceae Source*,” 2017). Com este efeito, são de destacar *Capsicum* spp., produtoras de capsaicina, associada à supressão de crescimento celular em doentes com cancro (Saisri, 2015), e *Datura stramonium*, produtora de atropina com efeito de relaxamento muscular e anti-inflamatório (Soni et al., 2012). Por outro lado, os alcalóides mostram toxicidade para humanos e animais e podem estar presentes em diversos constituintes de muitas espécies (Saisri, 2015). Por fim, o tomateiro, o tabaco e as petúnias são ainda utilizados em estudos de biologia (Saisri, 2015).

O género *Solanum* contém quase metade das espécies da família *Solanaceae*, estando bem representado no seu continente de origem, a América do Sul, em especial nos vales dos Andes. Secundariamente, podem encontrar-se centros de diversidade e endemismo na América do Norte e México, América Central, Leste do Brasil, Índia Ocidental, África e Austrália (“*Solanaceae Source*,” 2017). É um género com elevada distribuição e importância económica mundial que, para além da batateira, tomateiro e beringela, inclui espécies cultivadas em menor escala como o tomate-maracujá, o melão-andino, o jiló e a giboma.

Atualmente, a batateira tem uma elevada importância económica, sendo a quinta cultura mais produzida mundialmente (FAOSTAT, 2016). A nível nacional, a produção de batata diminuiu 7,3% entre 2014 e 2016, em regiões produtoras como Ribatejo e Trás-os-Montes, como consequência da redução da área cultivada, de 27 214 ha para 23 296 ha (-14,4%). Neste período, obtiveram-se produções entre 450 e 550 mil toneladas de tubérculos (INE, 2016). Porém, após os cereais, como o milho, a aveia, o trigo e o arroz, a batata continua a ser a cultura que ocupa uma maior superfície do terreno nacional e em termos de produção, surge após o tomate de indústria e o milho (INE, 2016).

O tomate é um fruto consumido mundialmente tanto em fresco como transformado. Apesar de não se encontrar tão bem posicionado no *ranking* das culturas produzidas a nível mundial (FAOSTAT, 2016), é uma cultura com uma grande importância em Portugal. Portugal situa-se entre os maiores produtores de tomate a nível europeu, tendo atingido uma produção de 1,8 milhões de toneladas em 2015 (FAOSTAT, 2016). A superfície dedicada à produção de tomate para indústria foi superior a 19 000 ha, em 2016, e tem sofrido um aumento considerável (11,6% entre 2014 e 2016) sendo esta a cultura que apresenta o valor mais elevado de produção (INE, 2016). A superfície para cultivo de tomate para consumo em fresco tem-se mantido constante e superior a 1 000 ha, com produções a rondar as 90 mil toneladas entre 2014 e 2016 (INE, 2016).

O género *Capsicum* contém mais de 30 espécies, incluindo formas cultivadas e espontâneas que produzem frutos picantes e não picantes ("The Plant List", 2013). Entre as espécies de *Capsicum* domesticadas ocorre o pimento (*C. annuum*) e a malagueta (*C. frutescens*). Os pimentos e malaguetas não têm grande expressão na cultura portuguesa, ao contrário de Espanha, o maior produtor a nível europeu, e do México, um dos maiores produtores mundiais (FAOSTAT, 2016).

O género *Physalis* contém mais de 100 espécies ("The Plant List", 2013). Algumas produzem um fruto esférico semelhante a um pequeno tomate e a cor pode variar entre amarelo, verde, laranja e vermelho. Caracteristicamente diferencia-se de muitas solanáceas pelo cálice desenvolvido que envolve o fruto, que seca e adquire uma coloração dourada. As bagas de algumas espécies são comestíveis e algumas têm importância comercial, nomeadamente: *P. pubescens*, *P. peruviana*, *P. pruinosa* e *P. philadelphica* (= *P. ixocarpa*). É um fruto de grande importância na Colômbia, o maior fornecedor mundial. Em 2007, mais de 80% da sua produção foi exportada para países como a Holanda, Alemanha, França, Suécia e Grã-Bretanha (Lima, 2009). Dada a atratividade do preço de mercado e o potencial para exportação, a cultura começou a ganhar expressão em Portugal e, em 2013, começou a ser produzida no país para comercialização, em maior escala, nomeadamente nas regiões de Leiria e Faro (Pires, 2015). Por outro lado, a planta facilmente se dissemina sendo uma infestante de culturas e considerada uma espécie invasora (Feliciano, 2008).

Em todas as regiões onde se cultivam solanáceas as plantas são afetadas por problemas fitossanitários que, conseqüentemente, limitam o seu potencial produtivo. De entre as doenças, podemos associar a diferentes espécies de solanáceas ataques de nemátodes e as doenças causadas por vírus, bactérias e fungos e pseudofungos, muitos constituindo inimigos-chave (Hardy, 1996; Shankar et al., 2014). A alternariose, micose causada por várias espécies do género *Alternaria*, assume-se atualmente como

uma das mais importantes doenças em solanáceas, surgindo registos de perdas de produção de até 80% em tomateiro e batateira (Basu, 1974; Pryor & Gilbertson, 2000; Grigolli et al., 2011; Kumar & Barnwal, 2017).

2.2 O género *Alternaria*

O género *Alternaria* é um táxon de fungos ecologicamente diversificado e reconhecido mundialmente. Ocorrendo numa larga diversidade de habitats, pode associar-se a animais e a plantas e surge no solo e na atmosfera (Woudenberg et al., 2013). Táxones atualmente enquadrados no género podem surgir como saprófitas em tecidos de plantas hospedeiras senescentes ou previamente lesadas e como endófitas, mas assumem particular importância como agentes patogénicos, seletivos ou generalistas, de plantas hospedeiras de interesse agronómico e ornamental, provocando doenças no caule, folhas e frutos e podridões em pós colheita (Thomma, 2003; Logrieco et al., 2009; Lawrence et al., 2013; Armitage et al., 2015). Adicionalmente, algumas espécies são consideradas agentes patogénicos oportunistas e eminentes em animais, nomeadamente em doentes humanos imunocomprometidos (Lawrence et al., 2013; Armitage et al., 2015). Fungos do género *Alternaria* produzem esporos que são transportados pelo ar e a inalação dos mesmos pode provocar alergias (Woudenberg et al., 2013; Lawrence et al., 2016) e patologias como asma, sinusite (Mamgain et al., 2013) e pneumonite (Mageste et al., 2012). Assim, de acordo com Lawrence et al. (2013) poucos táxones de fungos, no seu habitat nativo, têm a capacidade para igualar o impacto global deste género, afetando tanto seres humanos como as suas atividades.

Mais de 4 000 espécies de plantas foram associadas a espécies do género *Alternaria*, fazendo deste um género com capacidade de infetar uma enorme gama de hospedeiros (Thomma, 2003; Lawrence et al., 2013). Pode afetar culturas de interesse agronómico, como o tomateiro, a batateira, as brássicas e algumas fruteiras, bem como plantas ornamentais (Mamgain et al., 2013). Adicionalmente, várias espécies deste género ocorrem em plantas infestantes, o que pode ser visto como uma oportunidade para o controlo biológico das mesmas. Servem de exemplo a espécie *A. cassiae* (herbicida ASST™) que é utilizada como agente de controlo biológico de *Senna obtusifolia*, *S. occidentalis* e *Crotalaria spectabilis* (Bannon, 1988) e da espécie *A. crassa* no controlo de *D. stramonium* (Stewart-Wade et al., 1998).

Filogeneticamente, o género *Alternaria* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, sub-filo Pezizomycotina, classe Dothideomycetes, sub-classe Pleosporomycetidae, ordem Pleosporales e família Pleosporaceae ("Mycobank Database", 2017). Foi originalmente descrito por Nees, em 1816, com a espécie *Alternaria tenuis*, caracterizada pela produção, em cadeia, de esporos multicelulares escuros com septos transversais e longitudinais (feodictiósporos) possuindo um bico ou células apicais afuniladas (Thomma, 2003). Fries, em 1832, não reconheceu esta descrição e descreveu o mesmo fungo como *Torula alternata*, complicando a taxonomia do género desde o seu começo. Por sua vez, Wallroth (1883) descreveu o género *Stemphylium* e neste género, o subgénero *Pseudostemphylium*, os quais apresentavam igualmente feodictiósporos. Posteriormente, Subramanian (1961) propôs a elevação de *Pseudostemphylium* a género. No entanto, de referir que, em 1912, Keisser havia

reavaliado as descrições de *A. tenuis* e *T. alternata*, tendo sinonimizado ambas as espécies sob *A. alternata* (Lawrence et al., 2013). Simmons (1967) realizou uma profunda revisão deste complexo de fungos, tipificou-os e definiu as características que permitiram enquadrar as espécies nos gêneros *Alternaria*, *Stemphylium* e *Ulocladium* (= *Pseudostemphylium*), sendo *A. alternata* a espécie tipo do gênero *Alternaria*. Posteriores revisões taxonômicas levaram o autor a colocar algumas espécies do gênero *Alternaria* no novo gênero *Nimbya* (Simmons, 1989) e, mais tarde, ressuscitou um antigo gênero, *Prathoda*, transferindo a espécie *A. longissima* para esse gênero, e segregou no gênero *Alternaria*, os gêneros *Alternariaster*, *Chalastospora* e *Teretiospora* (Simmons, 2007)

Os estudos clássicos de identificação à espécie no gênero *Alternaria* baseiam-se na análise de caracteres morfológicos, nomeadamente nas características dos conídios, comprimento das cadeias e padrão de esporulação (Neergaard, 1945; Simmons & Roberts, 1993). O comprimento dos esporos, incluindo o comprimento do bico, é a característica morfológica mais importante de uma dada espécie considerada. No entanto, em muitos casos, os intervalos de valores para uma espécie e a sobreposição de valores entre espécies impedem a identificação à espécie e a distinção entre espécies do mesmo e de grupos diferentes (Rotem, 1994). Para além disto, as características morfológicas não são apenas afetadas por fatores intrínsecos (Thomma, 2003; Landschoot et al., 2017). Deste modo, fatores como o tipo de substrato em que se desenvolve o fungo (Rotem, 1994; Andersen et al., 2002), a gestão das condições de luminosidade e de temperatura (Simmons, 1992) e o hospedeiro de origem (Marak et al., 2014), podem ser responsáveis por uma variação significativa nas características morfológicas de uma espécie, levando a problemas de identificação. Por estas razões, desde a criação do gênero, entendeu-se que algumas das identificações assumidas na bibliografia podiam estar incorretas ou ser sinónimos de outras espécies (Rotem, 1994; Andersen & Thrane, 1996; Woudenberg et al., 2013).

A similaridade morfológica entre espécies e a variabilidade dentro da espécie levou a que vários autores considerassem que seria necessário o desenvolvimento de métodos menos ambíguos independentes de fatores externos para identificação das espécies (Elansky et al., 2012; Gannibal et al., 2014; Armitage et al., 2015). Mais recentemente, as técnicas moleculares têm permitido a validação de estudos clássicos baseados exclusivamente na morfologia das espécies, descobrir novas espécies e colocar hipóteses filogenéticas ao gênero *Alternaria* e a géneros próximos.

Numa análise polifásica sobre o complexo *Alternaria*, Woudenberg et al. (2013) referiram que, com base em trabalhos realizados por diversos autores, podia entender-se que o complexo de *Alternaria* compreendia nove géneros polifiléticos, *Alternaria*, *Chalastospora*, *Crivellia*, *Embellisia*, *Nimbya*, *Sinomyces*, *Stemphylium*, *Ulocladium* e *Undifilum*, sendo que o gênero *Alternaria* se repartia em oito secções (incluindo a secção *Alternata*) e o grupo de espécies *A. infectoria*. Todavia, ao analisarem características morfológicas de estirpes representativas do gênero *Alternaria* e de estirpes de 16 géneros relacionados, aliadas às suas sequências dos genes nas regiões SSU (18S nrDNA), LSU (28S nrDNA), ITS (*internal transcribed spacer*), GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), RPB2 (*RNA polymerase second largest subunit*) e TEF1- α (*translation elongation factor 1-alpha*), concluíram pela sinonimização de todos os géneros do complexo *Alternaria*, excetuando *Stemphylium*,

e ainda dos géneros *Brachycladium*, *Allewia*, *Chmelia*, *Lewia*, *Teretispora* e *Ybotromyces*. Por outro lado, consideraram que o género *Alternaria* é constituído por 24 secções e seis linhagens monotípicas. Nas secções referiram a secção *Alternariae sensu* Lawrence et al. (2013), onde se encontram as espécies *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima*, a secção *Infectoriae* que inclui a espécie *A. infectoria* e a secção *Porri*, que compreende espécies com esporos grandes como *A. crassa*, *A. grandis*, *A. protenta*, *A. solani* e *A. tomatophila* (Woudenberg et al., 2013).

Atualmente, o estudo de espécies de interesse, nomeadamente as espécies de *Alternaria* associadas a doenças com importância económica, como a alternariose das solanáceas, têm como base uma análise morfológica, cultural e molecular dos isolados (Bessadat et al., 2016; Lawrence et al., 2016). Contudo, é importante considerar que a resolução filogenética para a definição das espécies está estreitamente relacionada com os *loci* utilizados (Tymon et al., 2016). Alguns autores defendem a utilização de zonas conservadas do DNA, enquanto outros defendem que estas não possuem variabilidade suficiente para serem capazes de diferenciar ao nível da espécie (Armitage et al., 2015). Servem de exemplo a região espaciadora transcrita interna (ITS) do DNA ribossomal, que por serem idênticas em muitas espécies de *Alternaria*, nomeadamente dentro das secções, não apoiam os resultados obtidos com outras regiões com maior resolução. Todavia, esta sequência e sequências de genes que codificam a região TEF1- α são frequentemente referidas em estudos taxonómicos do género *Alternaria* (Pryor & Gilbertson et al., 2000; Lawrence et al., 2013; Woudenberg et al., 2013, 2015; Landschoot et al., 2017). Serdani et al. (2002) concluem que a região ITS tem capacidade de diferenciar espécies do grupo de *A. infectoria* dos isolados da secção *Alternata* e Woudenberg et al. (2015) referem que uma região pouco conservada do DNA, KOG1058, possui um bom poder discriminativo de espécies pertencentes à secção *Alternata* relativamente a outras secções.

Como referido, a distinção de espécies do género *Alternaria* pelo uso de características morfológicas é complicada. Simmons & Roberts (1993) padronizaram as condições ótimas de crescimento para as espécies do género e definiram grupos de espécies de acordo com o comprimento das cadeias de esporos e os seus padrões de ramificação. Mais recentemente, Woudenberg et al. (2015), aplicaram nove *loci* (ITS, SSU, LSU, GAPDH, RPB2, TEF1- α , Alt a 1 (*Alternaria major allergen*), endoPG (*endopolygalacturonase*) e uma região anónima OPA10-2) a 168 isolados de *Alternaria*, na tentativa de distinguir as espécies e esclarecer a filogenia da secção *Alternata*, resultando na diferenciação do complexo de espécies *A. arborescens*, na sinonimização de 105 denominações correspondentes a 35 morfo-espécies, incluindo *A. tenuissima*, sob *A. alternata*, e descrição de mais 10 espécies. Contudo, Zheng et al. (2015) defendem que *A. alternata* e *A. tenuissima* podem distinguir-se com base na análise da sequência parcial do gene da histona 3.

Adicionalmente, pode utilizar-se o perfil dos metabolitos secundários, uma vez que diferentes espécies de *Alternaria* produzem diferentes metabolitos ou combinações destes (Andersen et al., 2002; Adhikari et al., 2017).

2.3 Fungos do género *Alternaria* em solanáceas

Um largo espectro de espécies do género *Alternaria* é responsável ou está associado a doenças em plantas da família *Solanaceae*, com capacidade para afetar todos os órgãos e estados vegetativos das plantas (Bessadat et al., 2014a), como folhas, caules, frutos e tubérculos. Nestes hospedeiros, espécies do género *Alternaria* podem ser responsáveis por diferentes doenças, como o tombamento de plântulas, a podridão do colo do caule na fase de planta jovem (*collar* ou *foot rot*) e o cancro no caule (*stem canker*) em plantas adultas, podendo ainda afetar tubérculos a partir de lesões ou frutos de tomate e pimento diretamente, os quais desenvolvem podridões em pós-colheita (van der Waals et al., 2001; Almeida, 2006; Logrieco et al., 2009; Kumar & Barnwal, 2017). Contudo, a doença provocada por fungos do género *Alternaria* que mais se destaca é a alternariose, isto é, necrose em órgãos aéreos da planta a que se associam várias espécies de *Alternaria* que atuam como agentes causais primários ou secundários.

A alternariose em solanáceas é causada sobretudo por espécies de três secções do género *Alternaria*: secção *Porri*, secção *Alternata* e secção *Infectoriae* (Orina et al., 2011; Woudenberg et al., 2015; Devappa et al., 2016; Kokaeva et al., 2017). Adicionalmente, a espécie *A. consortialis* (= *Ulocladium consortiale*) é isolada a partir de folhas de tomateiro (Bessadat et al., 2016).

O impacto da alternariose em Portugal é considerado moderado, aparentemente não existindo muitos estudos sobre a doença. As espécies que aparecem referenciadas são *A. solani* e *A. alternata* que afetam as culturas da batateira, tomateiro e pimenteiro, tanto no campo como em pós colheita (Almeida, 2006).

2.3.1 Perspetiva histórica dos agentes causais

Ellis & Martin (1882) foram os primeiros autores a descrever os sintomas de alternariose na batateira como lesões castanhas a pretas com anéis concêntricos nas folhas, produzindo um efeito tipo alvo. Consideraram que o agente responsável pela doença era *Macrosporium solani*. Mais tarde, Jones & Grout (1897) associaram duas espécies do género *Alternaria* aos sintomas de alternariose em batateira, assumindo que *A. solani* surgia como patogénica e *A. fasciculata* (= *A. alternata*) como saprófita. Durante mais de um século *A. solani* foi considerado como o único agente causal da alternariose em tomateiro, batateira, pimenteiro, beringela e outras solanáceas. Contudo, vários autores foram ao longo do tempo reconhecendo que existia uma elevada heterogeneidade morfológica e patogénica na população do que se considerava *A. solani* e sugeriram que a doença pudesse ser causada por outras espécies ou raças do fungo (Gannibal et al., 2014).

Simmons (2000), ao fazer a revisão taxonómica do género *Alternaria* associado a hospedeiros da família *Solanaceae*, analisou *A. solani sensu lato* e espécies afins (secção *Porri*) e descreveu ou reconheceu, para além de *A. solani*, *A. grandis*, em batateira, *A. tomatophila*, *A. cretica* e *A. subcylindrica* em tomateiro, *A. beringelae*, em beringela, *A. capsici*, em pimento e *A. cyphomandrae*, em tomate-maracujá. De referir, no entanto, que Woudenberg et al. (2014) sinonimizaram

A. tomatophila, *A. cretica* e *A. subcylindrica* com *A. linariae*, aumentando o leque de hospedeiros desta espécie, e *A. capsici* com *A. crassa*. Como agentes patogénicos em batateira, referiram ainda *A. grandis*, *A. protenta* e *A. solani*. Esta especialização dos agentes patogénicos com os hospedeiros foi depois suportada por estudos moleculares (Rodrigues et al., 2010; Gannibal et al., 2014; Landschoot et al., 2017).

A importância das espécies de *Alternaria* com esporos pequenos como agentes causais da alternariose tem sido questionada por vários autores (Stammler et al., 2014). As espécies *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima* (secção *Alternata*) e *A. infectoria* (secção *Infectoriae*) são frequentemente isoladas a partir de tecido infetado onde ocorrem espécies patogénicas de esporos grandes (Bessadat et al., 2016; Kokaeva et al., 2017), levando à colocação da questão da existência de uma interação entre estes grupos de espécies (Leiminger et al., 2010). Contudo, esta hipótese foi contrariada ao provar-se que *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima* têm capacidade para provocar infeção nas plantas, ocorrendo sintomatologia idêntica à da alternariose provocada por espécies com esporos grandes e bicos longos (Bessadat et al., 2014a, 2014b & 2016; Dube, 2014). Porém, Droby et al. (1984) terão sido provavelmente os primeiros autores a referirem a patogenicidade de *A. alternata* em batateira, afirmando os autores que esta espécie é responsável pela sintomatologia das pequenas pontuações escuras observadas em folhas desta planta.

2.3.2 Caracterização morfológica

Fungos do género *Alternaria* caracterizam-se por produzirem hifa castanha a castanho-olivácea, conidióforos macronematosos, mononematosos, simples ou irregulares, ramificados, solitários ou em fascículos, curtos ou alongados. Produzem conídios solitários ou em cadeias, ovais, obovoídes, cilíndricos elipsoidais ou obclavados, com ou sem bico, lisos ou rugosos, com septos transversais e com ou sem septos longitudinais e oblíquos. Os conidióforos e os conídios variam entre uma tonalidade castanha a castanho-olivácea (Barnett & Hunter, 1998; Pryor & Gilbertson, 2000; Woudenberg et al., 2013; Lawrence et al., 2016).

No que diz respeito às espécies com conídios grandes, a utilização de características morfológicas como a dimensão dos esporos, o comprimento dos bicos e as suas ramificações é útil para a diferenciação de espécies dentro da secção *Porri* (Alvarenga et al., 2016). Em solanáceas, considerou-se *A. solani* como o único agente causal da alternariose por um longo período, o que confirma a plasticidade morfológica destas espécies (Gannibal et al., 2014). No entanto, a espécie *A. solani* diferencia-se maioritariamente de *A. grandis* pelo comprimento total dos conídios. Segundo Rodrigues et al. (2010), em PCA (*potato carrot agar*), os esporos de *A. solani* apresentam um comprimento entre 168-210µm, variando entre 237-390µm em *A. grandis*. Relativamente a *A. tomatophila* (= *A. linariae*), a principal distinção encontrava-se na ramificação dos bicos, geralmente presente em número superior (1-4) quando comparada com *A. solani* e *A. grandis*, sendo que o corpo do conídio mostra-se mais estreito e com um comprimento inferior sendo o bico, tendencialmente mais longo que o bico de *A. solani* (Gannibal et al., 2014).

Tipicamente, as espécies dentro da secção *Alternata* produzem esporos pequenos a moderados, com septos transversais e alguns longitudinais (Lawrence et al., 2016). Contudo, ao contrário das espécies pertencentes à secção *Porri*, os bicos dos esporos, quando presentes, são de reduzidas dimensões e não têm valor taxonómico, e as dimensões dos corpos dos conídios sobrepõem-se entre e dentro dos grupos de espécies. Por isto, morfológicamente, o estudo dos padrões de ramificação dos grupos de espécies definidos por Simmons & Roberts (1993), nomeadamente os grupos de espécies de *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima*, continua a servir de base em estudos morfológicos (Andersen et al., 2002; Bessadat et al., 2016).

A espécie *A. alternata* é a mais comum e variável dentro do género *Alternaria* e, segundo Ali et al. (2006), produz colónias preto a preto-oliváceo e por vezes acinzentadas, com rápido crescimento em laboratório. Em gelose de batata dextrosada (PDA-*potato dextrose agar*) pode atingir um diâmetro a variar entre 33 e 72 mm em sete dias a 25±1°C, na ausência de luz (Durand, 2017). Pode ocorrer a produção de pigmentos difusíveis no meio de cultura (Devi et al., 2014). Tipicamente, e de acordo com Simmons e Roberts (1993), *A. alternata* produz um padrão de esporulação que corresponde ao grupo 4 (Fig. 1a), definido pela formação de conidióforos primários curtos e cadeias com entre 2 a 6 conídios que formam conidióforos secundários a partir do seu corpo, os quais produzem cadeias curtas de 1 a 5 conídios (Andersen et al., 2002; Bessadat et al., 2016). Serdani et al. (2002), referenciam a formação de cadeias mais longas, entre 6-12 conídios de comprimento, em PCA. Os conidióforos primários surgem individualmente ou em pequenos grupos, ramificados, retos ou flexuosos com 1 a 3 septos, geniculados, hialinos a oliváceos, com comprimento até 50,0 µm e largura entre 3,0 e 6,0 µm, possuindo uma ou mais cicatrizes conidiais (Quadro 1). Os conídios podem ser obclavados, obpiriformes, óvóides ou elipsóides, por vezes com um bico cónico ou cilíndrico, hialinos a castanho-dourados ou castanho-escuros (Ali et al., 2006; Bessadat et al., 2014b; Dube, 2014; Devappa et al., 2016).

Quadro 1 – Características biométricas dos esporos de *Alternaria alternata* segundo diversos autores

| Hospedeiro | Substrato | Corpo do conídio (µm) | | Nº de septos | | Referências |
|-----------------------------|-----------|-----------------------|------------|--------------|---------|---------------------------|
| | | Comprimento | Largura | Trans. | Longit. | |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | PDA | 23,0 – 63,0 | 9,0 – 18,0 | 8 | Vários | Ali et al. (2006) |
| - | PCA | 6,5 – 59,8 | 4,2 – 16,5 | 1 – 8 | 0 – 3 | Bessadat et al. (2014b) |
| <i>Solanum tuberosum</i> | - | 19,7 – 45,4 | 8,5 – 18,6 | 2 – 6 | 1 – 5 | Vasconcelos et al. (2014) |

Para a espécie *A. arborescens* também se verifica um crescimento rápido em cultura. Em PDA, na obscuridade a 20°C, desenvolve colónias com margem irregular, castanho-bronzeadas a pretas, com textura feltrosa (Wenneker et al., 2018). O padrão de esporulação (grupo 3) define-se pela formação de conidióforos primários longos com extensa ramificação terminal (Fig. 1b). A ramificação ocorre a partir da formação de um conidióforo secundário curto na extremidade dos conídios, sendo que o primeiro conídio da cadeia pode ser até duas vezes maior que o conídio que o precede (Andersen et al., 2002; Wenneker et al., 2018). Os conídios apresentam-se ovóides, obpiriformes ou elipsóides, por vezes apresentando um bico apical afunilado, bronzeados a castanho-claros (Akhtar et al., 2014; Bessadat et al., 2014b). As características biométricas dos esporos de *A. arborescens* segundo diversos autores são apresentadas no Quadro 2.

O padrão de esporulação das espécies *A. alternata* e *A. arborescens* diferencia-se principalmente pelo comprimento das cadeias, grau de ramificação e posição do conidióforo secundário. A espécie *A. alternata* produz geralmente cadeias mais longas, enquanto a espécie *A. arborescens* produz conidióforos primários mais longos e um padrão de ramificação mais complexo com formação de cadeias ramificadas a partir do corpo do conídio (Andersen et al., 2002).

Quadro 2 - Características biométricas dos esporos de *Alternaria arborescens* segundo diversos autores

| Hospedeiro | Substrato | Corpo do conídio (µm) | | Nº de septos | | Referências |
|------------------------|-----------|-----------------------|------------|--------------|---------|-------------------------|
| | | Comprimento | Largura | Trans. | Longit. | |
| <i>Oryza sativa</i> | MEA* | 10,0 – 30,0 | 5,0 – 14,0 | 1 – 5 | 1 | Akhtar et al. (2014) |
| - | PSA** | 9,6 – 38,4 | 3,2 – 12,8 | 1 – 6 | 0 – 3 | Bessadat et al. (2014b) |
| <i>Malus domestica</i> | - | 10,0 – 30,0 | 5,0 – 10,0 | 1 – 5 | - | Wenneker et al. (2018) |

*MEA: Malt Extract Agar; **PSA: Peptone sucrose agar

As colónias de *A. tenuissima*, em PDA, apresentam uma coloração a variar entre preto-esverdeado a cinzento-oliváceo, por vezes com uma margem esbranquiçada, com textura cotonosa (Đisalov et al., 2015; Lin et al., 2016), atingindo um diâmetro de 50 mm em apenas cinco dias de crescimento, na obscuridade (Wee et al., 2016). Caracteristicamente, *A. tenuissima* produz um padrão de ramificação (grupo 5) que se caracteriza pela produção de conidióforos primários curtos e cadeias longas com 9 ou mais conídios, com pouca ou nenhuma ramificação (Fig. 1c). Caso ocorram cadeias secundárias, geralmente são curtas, entre 1 a 4 conídios, e formam-se usualmente a partir do corpo dos primeiros esporos da cadeia (Andersen et al., 2002; Lin et al., 2016). Andersen et al. (2002) observaram a formação ocasional de bicos verdadeiros em isolados desta espécie. Os conidióforos são simples ou geniculados, hialinos a castanho-claro com comprimento entre 15,0 e 75,0 µm (Quadro 3). Os conídios apresentam-se ovóides, obclavados ou elipsoidais, castanho-oliváceos a castanhos-dourados, muriformes e sem bico. Ocasionalmente apresentam paredes verrugosas (Bessadat et al., 2014b; Lin et al., 2016; Wee et al., 2016; Durand, 2017).

Quadro 3 - Características biométricas dos esporos de *Alternaria tenuissima* segundo diversos autores

| Hospedeiro | Substrato | Corpo do conídio (µm) | | Nº de septos | | Referências |
|---------------------------|-----------|-----------------------|------------|--------------|---------|-----------------------------|
| | | Comprimento | Largura | Trans. | Longit. | |
| - | - | 11 – 40 | 8 – 16 | 0 – 7 | 0 – 3 | Rodríguez-Roa et al. (2013) |
| - | PSA | 9,8 – 60,2 | 8,6 – 15,5 | 4 – 9 | - | Bessadat et al. (2014b) |
| - | PDA | 13,2 – 44,8 | 6,4 – 16,1 | 1 – 9 | 0 – 6 | Durand (2017) |
| <i>Avicennia marina</i> | PDA | 21,2 – 45,5 | 7,3 – 17,7 | 1 – 4 | 0 – 2 | Lin et al. (2016) |
| <i>Aloe barbadensis</i> | PCA | 9,5 – 36,9 | 7,1 – 19 | - | - | Vakalounakis et al. (2016) |
| <i>Aronia melanocarpa</i> | PDA | 22 – 32 | 8 – 11 | 2 – 4 | 0 – 1 | Wee et al. (2016) |

Dentro dos grupos de espécies definidos segundo o padrão de esporulação inclui-se o grupo de espécies de *A. infectoria* que ocorre na secção *Infectoriae*. Esta espécie (Fig. 1d) não se distingue das espécies dentro da secção *Alternata* pela dimensão dos seus conídios (Quadro 4), mas pela formação de conidióforos secundários longos na zona apical dos esporos, em cadeias ramificadas com 4 a 10 esporos, gerando um padrão de esporulação complexo (grupo 6) (Andersen et al., 2002). Esta espécie produz conidióforos castanhos, simples ou geniculados e esporos que apresentam bico, elipsoidais a ovóides longos, muriformes e castanho-escuros, mostrando-se por vezes verrugosos (Rahimloo et al., 2015; Durand, 2017). Em meio de cultura PCA as colónias atingem os 66 mm de diâmetro no sétimo dia de crescimento, a $24\pm 1^\circ\text{C}$, mostrando-se esbranquiçadas a cinzentas e purulentas a feltrosas (Rahimloo et al., 2015). Durand (2017) registou em PDA o mesmo valor de diâmetro da cultura, em sete dias de crescimento.

Quadro 4 - Características biométricas dos esporos de *Alternaria infectoria* segundo diversos autores

| Hospedeiro | Substrato | Corpo do conídio (μm) | | Nº de septos | | Referências |
|---------------------------|-----------|------------------------------------|-------------|--------------|---------|-----------------------------|
| | | Comprimento | Largura | Transv. | Longit. | |
| - | - | 10,0 – 57,0 | 6,0 – 12,0 | 3 – 8 | 0 – 3 | Rodríguez-Roa et al. (2013) |
| <i>Brassica oleraceae</i> | PCA | 30,0 – 45,0 | 8,0 – 15,0 | 3 – 6 | 0 – 3 | Rahimloo et al., (2015) |
| - | PDA | 12 – 78,8 | 10,6 – 24,8 | 3 – 11 | 1 – 6 | Durand (2017) |

Em meio de cultura DRYES (*Dichloran Rose Bengal Yeast Extract Sucrose Agar*), Andersen et al. (2002) estudaram isolados de quatro espécies de acordo com a coloração das colónias, tendo diferenciado *A. infectoria* pela produção de colónias com tonalidade branca a branco-amarelada. Nos isolados das espécies *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima* as colónias surgiam com diversas tonalidades de verde a acinzentadas.

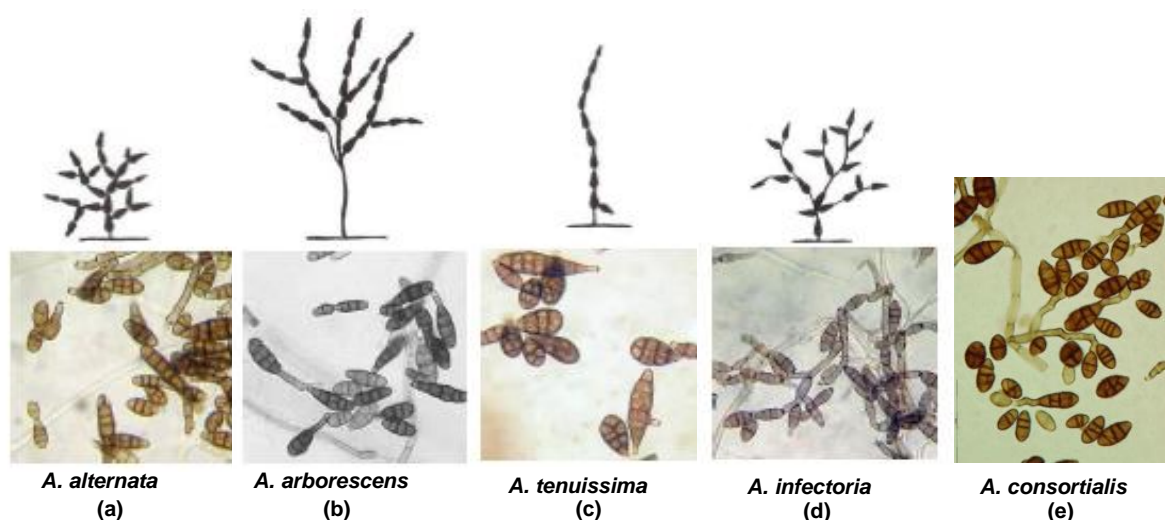


Fig. 1 – Padrão de esporulação das espécies (a) *Alternaria alternata* (grupo 4), (b) *A. arborescens* (grupo 3), (c) *A. tenuissima* (grupo 5) e (d) *A. infectoria* (grupo 6) e conídios representativos dessas espécies (adaptado de Orina et al., 2011) e de *A. consortialis* (e) (adaptado de Andersen & Hollensted, 2008)

Finalmente, a espécie *Alternaria consortialis* da secção *Ulocladioides*, a qual previamente era considerada como sendo do género *Ulocladium*, forma colónias, em PDA, castanho-oliváceo-escuras a pretas, aveludadas onde se observa abundante esporulação. Os conidióforos são eretos, simples ou ramificados, castanho-oliváceos a castanhos com 4,0 e 5,0 µm de largura e até 60,0 µm de comprimento (“Mycobank Database,” 2017). Esta espécie caracteriza-se essencialmente pela forma obovóide ou elipsoidal longa dos conídios e por possuir até 5 septos transversais e até 6 septos longitudinais ou oblíquos, sendo a forma destes e o número de septos variáveis de acordo com a maturação dos esporos (Andersen & Hollensted, 2008; Runa et al., 2009; “Mycobank Database,” 2017). Os conídios, predominantemente solitários, podem variar entre 14,0 e 40,0 µm de comprimento e 7,0 e 21,0 µm de largura. Segundo Lawrence et al. (2016) nesta espécie não ocorre a formação de conidióforos secundários nem de bico. Contudo, Andersen & Hollensted (2008), verificam a formação de conidióforos secundários geniculados, a partir dos conídios com maiores dimensões, formando um grupo secundário de conídios solitários (Fig. 1e).

2.4 Alternariose

Como referido, os fungos do género *Alternaria* podem ser responsáveis por diversas doenças em plantas, como o tombamento de plântulas, a podridão do colo do caule na fase de planta jovem e o cancro no caule em plantas adultas, podendo ainda afetar tubérculos a partir de lesões ou frutos de tomate e pimento diretamente, os quais desenvolvem podridões em pós-colheita. Contudo, a doença provocada por espécies do género *Alternaria* que mais se destaca é a alternariose.

2.4.1 Sintomas de alternariose

A sintomatologia provocada pelas infeções de *Alternaria* nas diversas espécies de *Solanaceae* é semelhante em todos os hospedeiros (Pscheidt, 1985), podendo afetar qualquer fase de crescimento e qualquer órgão vegetativo (Rotem, 1994). Os sintomas de alternariose expressam-se primeiramente nas folhas mais maduras da planta como pequenas e numerosas pontuações castanhas escuras a pretas, circulares a angulares, com 6 a 12 mm de diâmetro, restringidas pelas nervuras das folhas e que, frequentemente, estão rodeadas por um halo amarelo resultante da difusão de toxinas produzidas pelos agentes patogénicos. O aumento progressivo das lesões leva, caracteristicamente, ao desenvolvimento de manchas circulares com anéis concêntricos escuros alternados com bandas mais claras (Fig. 2a), em volta do local inicial de ataque, como consequência das flutuações de temperatura, humidade e radiação que condicionam o crescimento do fungo sobre a lesão (Wharton et al., 2013). O centro da lesão seca e fica com textura de papel. Rapidamente as folhas afetadas tornam-se amarelas, enrolam e murcham, permanecendo agarradas à planta (Wharton et al., 2013).

A alternariose é uma doença com um potencial muito destrutivo em diversas plantas da família *Solanaceae* e pode constituir um grave problema quer para produtos frescos quer para produtos destinados para a indústria (Bessadat et al., 2016). Dada a importância global das culturas do tomateiro e da batateira, grande parte dos casos de estudo têm sido direcionados a estes hospedeiros. A doença está presente em todos os continentes (Pryor & Gilbertson, 2000; Kumar & Barnwal, 2017) e ocorre

com maior impacto em regiões de climas tropicais e subtropicais, dada a combinação de condições ambientais, temperatura e humidade elevadas, que permitem utilizar sistemas de produção contínuos de culturas hospedeiras, as quais favorecem o desenvolvimento destes fungos, contribuindo para a ocorrência de um maior número de gerações do patógeno, comparativamente a zonas de clima temperado (Lourenço et al., 2009). Contudo, é igualmente importante em países de clima temperado, encontrando-se referências de elevados prejuízos em batateira, tomateiro ou pimenteiro em países como a Rússia (Orina et al., 2011; Gannibal et al., 2014), Bélgica (Landschoot et al., 2017; Vandecasteele et al., 2017), Alemanha (Leiminger et al., 2010 & 2013), Israel (Droby et al., 1984), Argélia (Bessadat et al., 2016; van der Waals et al., 2004), Estados Unidos da América (Tyman et al., 2016), Índia (Devappa et al., 2016), Brasil (Oliveira, 2007; Lourenço et al., 2009; Rodrigues et al., 2010) e Colômbia (Rodríguez-Roa et al., 2013).

Geralmente, os hospedeiros de *Alternaria* têm dois picos de suscetibilidade, na fase juvenil e na fase de senescência das plantas (Fig. 2b), servindo de exceção a batateira, que em campo é pouco suscetíveis nas primeiras fases de desenvolvimento, raramente apresentando sintomas da doença. No tomateiro ocorre sintomatologia típica de *damping-off* como resultado da germinação de sementes contaminadas por esporos ou micélio de *Alternaria* spp. Mais tarde, em plantas jovens, pode provocar *colar rot*, restringindo a base do caule das plantas afetadas. Em ambos os casos, pode ocorrer a morte da planta (Oliveira, 2007). Contudo, é a partir da fase da floração e frutificação ou formação de tubérculos, ao existir uma maior exigência em açúcares e nutrientes, que as plantas se tornam mais suscetíveis (Oliveira, 2007; Chohan et al., 2015).



Fig. 2a - Mancha com anéis concêntricos numa infecção de *Alternaria* sp. em folha de batateira;



Fig. 2b - Sintomas de alternariose em batateira em folhas senescentes.

Em Portugal não se designa de forma distinta os diferentes sintomas nas folhas provocadas por diferentes espécies de *Alternaria* em solanáceas, sendo apenas definidos como alternariose. Contudo, alguns autores defendem que diferentes sintomas, nomeadamente *brown spot* e *early blight*, são causadas por espécies de *Alternaria* distintas (DeDecker, 2012). Bessadat et al. (2016) inocularam *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima*, espécies com esporos pequenos, em folhas de tomateiro e registaram a formação de pontuações circulares, com diâmetro inferior ou igual a 4 mm e ocasionalmente, formando um halo clorótico, sintomas que associaram a *brown spot*. Na inoculação de *A. solani*, *A. linariae* e *A. grandis*, espécies com esporos grandes, observaram lesões de maiores

dimensões com um halo amarelo e normalmente limitadas pelas nervuras das folhas e com anéis concêntricos de coloração castanho-escuro. Nenhum dos isolados de esporos pequenos se mostrou altamente virulento, mas a agressividade de alguns foi superior à de isolados da espécie *A. linariae*. Por outro lado, os sintomas provocados pelas espécies de *Alternaria* com esporos pequenos assemelham-se às primeiras fases de infecção provocada por espécies com esporos grandes. Adicionalmente, sob condições menos favoráveis, as lesões provocadas por estas últimas ficam de reduzidas dimensões. Por essas razões, segundo vários autores, não é possível distinguir o agente patogénico envolvido na doença pela sintomatologia da folha, nomeadamente entre espécies com o mesmo tipo de esporos (Leiminger et al., 2010; Bessadat et al., 2016; Tymon et al., 2016; Vandercasteele et al., 2017). Os estágios primários das infeções podem ainda ser confundidos com doenças induzidas por outros agentes causais como *Collectotrichum coccodes* (Tymon et al., 2016).

A maioria das espécies de *Alternaria* é agente patogénico de folha, afetando a planta pela redução do seu potencial fotossintético (Rotem, 1994). Em casos de epidemias severas pode ocorrer o definhamento das plantas, provocando um abaixamento no seu potencial produtivo e depreciação qualitativa dos frutos ou tubérculos (Wharton et al., 2013; Bessadat et al., 2014b). Podem ainda surgir no caule e nos pecíolos das plantas jovens lesões alongadas, deprimidas, castanhas a pretas, podendo ou não apresentar anéis concêntricos (*stem canker*), que ao ficarem confinadas a um lado planta fazem com que esta cresça atrofiada e seja menos produtiva (Damicone et al., 2007). A afetação do pedúnculo pode resultar no aborto floral e de pequenos frutos (Oliveira, 2007).

Nos frutos como o tomate e o pimento, quer verdes quer maduros, podem ocorrer, similarmente, manchas escuras de grande dimensão, deprimidas e com anéis concêntricos (Morris et al., 2000). Geralmente surgem em torno do pedúnculo, por ser uma zona de deposição de orvalho e enriquecimento das gotículas com nutrientes do próprio fruto (Rotem, 1994). Penetrando por este, podem surgir sintomas em qualquer zona do fruto (Oliveira, 2007). Adicionalmente, podem ocorrer infeções latentes nos campos de cultura, sem exibição de sintomas, que mais tarde levam ao desenvolvimento de podridões no armazenamento. Geralmente, estas podridões são provocadas por agentes patogénicos fracos como *A. alternata* (Logrieco et al., 2009).

Nos tubérculos, as infeções ocorrem como consequência de ferimentos induzidos na epiderme e quer *A. alternata* quer *A. solani* são incapazes de penetrar tubérculos intactos, mesmo sob condições de elevada humidade (Rotem, 1994). Frequentemente, estas lesões e a contaminação decorrem da colheita mecânica. Em caso de infeção observam-se lesões circulares a irregulares, ligeiramente deprimidas e frequentemente rodeadas por uma borda mais elevada, púrpuras a castanho-escuras. A polpa permanece seca, com uma textura coriácea e cor escura (Oliveira, 2007; Wharton et al., 2013). No armazenamento, as lesões podem continuar a desenvolver-se, mas não ocorre uma dispersão secundária da doença, não sendo fontes de infeções secundárias (Wharton et al., 2013). Sob condições próprias de armazenamento o tubérculo facilmente cicatriza (Rotem, 1994; Oliveira, 2007).

2.4.2 O ciclo da alternariose

As espécies de *Alternaria* associadas a alternariose em solanáceas produzem como esporos apenas conídios, excetuando *A. infectoria*, que possui uma fase sexuada conhecida. Os conídios e o micélio do fungo permanecem no solo, em detritos das culturas, sementes e em hospedeiros alternativos suscetíveis, como plantas selvagens ou infestantes do género *Solanum* (Wharton et al., 2013). Essas estruturas representam a fonte primária de inóculo (Wharton et al., 2013; Adhikari et al., 2017). Adicionalmente, algumas espécies, como *A. solani*, podem ainda sobreviver na forma de clamidósporos ou microesclerotos (Rotem, 1994).

A melanização destas estruturas permite que persistam sob um largo espectro de condições ambientais (Wharton et al., 2013). No entanto, a sua sobrevivência pode diminuir significativamente sob condições de humidade relativa elevada, por isso, mantêm-se viáveis por maiores períodos em detritos de culturas mantidos à superfície do solo que em profundidade, por ser um ambiente menos húmido e com menor atividade microbiana (Rotem, 1994). Adicionalmente, a sobrevivência dos esporos em material vegetal como hospedeiros alternativos prende-se com a capacidade que as folhas têm para atuarem como filtro, protegendo os esporos presentes na página inferior e o micélio que se desenvolve no seu interior (Rotem 1994). Nas sementes, podem ocorrer esporos à superfície ou micélio sob a cutícula. Contudo, a viabilidade dos esporos presentes à superfície diminui ao fim de poucos anos, sob condições de armazenamento a baixas temperaturas e 50% de humidade relativa, enquanto o micélio que se desenvolve no interior se pode manter viável por mais de 12 anos (Rotem, 1994). Por isso, a disseminação a longas distâncias destes patógenos e instalação da doença em campos de cultura livres de alternariose podem associar-se a sementes infectadas (Lourenço et al., 2009; Mamgain et al., 2013; Vasconcelos et al., 2014; Singh et al., 2015).

No entanto, a dispersão de *Alternaria* é maioritariamente garantida pela dispersão passiva dos esporos por ação do vento, podendo ocorrer ainda por salpicos de água, ferramentas e, embora menos frequentemente, por animais (Chou & Wu, 2002; Mamgain et al., 2013; Dube, 2014). As espécies que formam cadeias de esporos médias a longas, como *A. alternata*, libertam os conídios com maior facilidade, comparativamente às espécies com esporos maiores e com bicos e cadeias curtas, como *A. solani*. A dispersão aérea dos esporos é facilitada pelo tamanho, o qual permite que flutuem no ar, e pela sua pigmentação, que os protege da radiação, viajando até áreas longínquas do seu local de produção (Rotem, 1994; Chou & Wu, 2002). A taxa de dispersão é ainda influenciada pela velocidade do vento e pela humidade. Em climas temperados, este processo ocorre maioritariamente no final da manhã, com a diminuição da humidade relativa nas folhas, e aumento da temperatura e velocidade do vento (Rotem, 1994; Wharton et al., 2013). Paralelamente, a dispersão é mais intensa na fase de senescência das culturas que registam máximos de esporulação em folhas mortas e senescentes. Por outro lado, a composição de esporos no ar varia com a fase do ciclo vegetativo da cultura. Leiminger et al. (2010) e Vandercasteele et al. (2017) detetaram predominância de esporos de espécies com conídios pequenos, como *A. alternata* e *A. arborescens*, no início do ciclo vegetativo da batateira e um aumento da percentagem de esporos de *A. solani* no decurso do desenvolvimento da cultura.

A fácil dispersão dos esporos de *Alternaria* pelo vento e a grande distribuição de plantas hospedeiras em todo o mundo contribuem para uma elevada variabilidade nas populações deste taxone e apontam para a falta de subpopulações geneticamente isoladas, a nível global (Weir et al., 1998; Morris et al., 2000; van der Waals et al., 2004; Oliveira, 2007; Lourenço et al., 2009; Leiminger et al., 2013; Gannibal et al., 2014).

Após o processo de dispersão, os esporos depositados no material vegetal suscetível germinam sob condições de humidade e temperatura a variar entre 8 e 32°C, ocorrendo a formação de tubos germinativos, com ou sem formação de apressório. Penetram o tecido do hospedeiro diretamente, pelos estomas e/ou por lesões e colonizam o espaço intracelular. Este processo é facilitado pela produção de toxinas e enzimas pelos agentes patogénicos para a degradação da cutícula do hospedeiro. As primeiras lesões necróticas surgem 2 a 3 dias após a infeção, dependendo das condições ambientais, da idade da planta e da sua suscetibilidade (Oliveira, 2007; Adhikari et al., 2017). Geralmente, é necessário um longo período húmido para a produção de esporos, mas estes agentes patogénicos beneficiam de períodos de humidade e de secura alternadas. Primeiramente, ocorre a formação de conidióforos durante uma noite húmida, e a produção de esporos ocorre no próximo período de humidade, após indução pela luz e secura provocada durante o dia (Rotem, 1994; Adhikari et al., 2017). Verificando-se condições de elevada humidade e temperaturas entre 25 e 32°C, ocorre a produção de conídios 3 a 5 dias depois do aparecimento dos primeiros sintomas (Wharton et al., 2013; Adhikari et al., 2017), tornando-se novas fontes de inóculo. Consequentemente, observa-se o sinal da doença sobre os tecidos infetados como uma massa de micélio fino, aveludado e escuro (Singh et al., 2015). Posteriormente, ocorre a dispersão secundária dos conídios desenvolvidos sobre as lesões que, sob condições favoráveis, germinam e retomam o processo infeccioso em partes saudáveis da planta ou em plantas diferentes (Wharton et al., 2013; Adhikari et al., 2017) (Fig. 3). No geral, plantas com tecido enfraquecido, quer por stress ambiental, deficiências nutritivas, senescência ou por ferimentos, são mais suscetíveis (Rotem, 1994; Laemmlen, 2001; Damicone et al., 2007; Dube, 2014).

As espécies do género *Alternaria* têm potencial para causar infeções policíclicas devido ao seu curto ciclo de vida (Adhikari et al., 2017) que prossegue desde que existam hospedeiros suscetíveis e se verifiquem condições favoráveis de temperaturas, entre 24-29°C, e longos períodos de folha molhada (Bessadat et al., 2014b; Kumar & Barnwal, 2017). O período entre a infeção e a esporulação para *A.solani*, em tomateiro, pode ser de apenas sete dias (Oliveira, 2007).

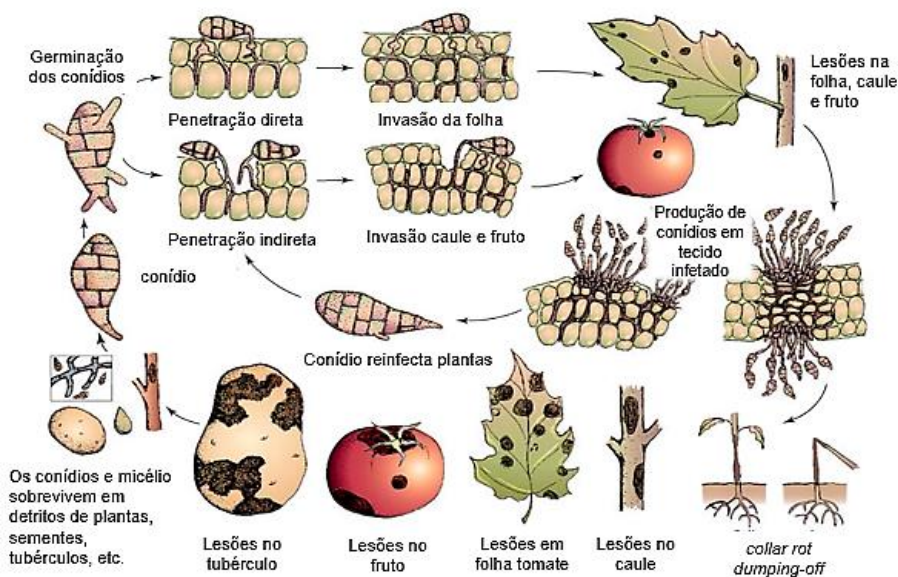


Fig. 3 - Ciclo da alternariose em batateira e tomateiro. (adaptado de Agrios (2005) e de Adhikari et al. (2017))

2.4.3 Patogenicidade de *Alternaria* spp.

A patogenicidade e a virulência dos fungos do gênero *Alternaria* são essencialmente determinadas pela produção de toxinas e, em alguns casos, pela produção de melanina. A produção de enzimas como cutinases permite diminuir a permeabilidade da cutícula dos tecidos do hospedeiro, facilitando o processo de penetração. A supressão de enzimas hidrolíticas como celulases, pectinases e cutinases pode levar a uma diminuição significativa na patogenicidade de algumas espécies (Srivastava et al., 2012).

A melanina aparenta ter um papel direto e indireto na virulência de algumas espécies de fungos, atuando como proteção contra condições ambientais desfavoráveis de temperaturas extremas, radiação ultravioleta ou ambientes híper-osmóticos e na defesa de compostos segregados por microrganismos antagonistas (Thomma, 2003). A melanização dos apressórios é uma característica essencial para a patogenicidade de algumas espécies de fungos, incapazes de penetrar o hospedeiro na ausência de estruturas melanizadas (Thomma, 2003). Contudo, a melanina nem sempre atua no processo da patogênese. Tanabe et al. (1995), mostraram que esporos de *A. alternata* que produzem apressórios não melanizados, comparativamente com outras produtoras de esporos pigmentados, não apresentam diminuição da virulência.

O fator de patogenicidade com maior importância em fungos são as toxinas, metabólitos secundários com baixo peso molecular, produzidas pelo agente patogénico. Existem duas categorias de toxinas, as toxinas específicas ou seletivas para o hospedeiro, essenciais na especificidade e na patogenicidade do agente patogénico produtor, e as toxinas não seletivas que se pensa terem um papel importante na virulência. A maioria das espécies patogénicas de *Alternaria* produzem toxinas não seletivas e, conseqüentemente, possuem uma gama de hospedeiros mais vasta. Todavia, as toxinas seletivas para o hospedeiro são mais virulentas e determinantes no processo da patogênese (Tsuge et al., 2013;

Bessadat et al., 2016). Certos isolados que não produzem toxinas específicas perdem a sua patogenicidade (Pinto et al., 2017). Estas são produzidas aquando a germinação dos conídios e pelas hifas que colonizam os tecidos do hospedeiro, afetando o metabolismo, a permeabilidade e outros mecanismos, suprimindo a indução das respostas de defesa pelo hospedeiro (Tsuge et al., 2013). Nishimura et al. (1978) propuseram a denominação das espécies morfológicamente indistinguíveis de *A. alternata* e produtoras de toxinas específicas dos hospedeiros como patótipos, mas a classificação não se manteve. Rotem (1994), por sua vez, nomeou esses patótipos como formas especializadas, referindo, por exemplo, *A. arborescens* f. sp. *lycopersici*, como o agente patogénico responsável pela formação de cancro nos caules de tomateiros, associados à produção da toxina AAL, específica para este hospedeiro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Prospecção, isolamento e conservação dos isolados

Com o objetivo de averiguar as espécies de *Alternaria* associadas a alternariose em solanáceas cultivadas em Portugal, elaborou-se uma coleção de isolados monospóricos recolhidos a partir de material vegetal na região do Ribatejo e Oeste. Foram realizadas prospeções em campos de cultura e observaram-se plantas de solanáceas em hortas onde surgiam plantas de solanáceas cultivadas. Foram colhidas amostras, quer de plantas inteiras quer de órgãos vegetativos (folhas, caules e frutos), preferencialmente com sintomas típicos de alternariose ou, na ausência de sintomas típicos, com lesões necróticas. O material colhido foi sujeito a uma inspeção cuidada à lupa binocular (LEICA M2 12s, Wetzlar, Alemanha) na tentativa de se encontrar esporos pertencentes a um fungo do género *Alternaria* e proceder de imediato ao isolamento monospórico a partir de conídios presentes no material. Ao não serem observados esporos procedeu-se à indução da sua esporulação. Para isto, cortaram-se fragmentos do material vegetal, contendo tecido infetado, que foram submetidos a uma desinfecção superficial numa solução de hipoclorito de sódio, durante um minuto, e de seguida mergulhados em água destilada esterilizada e secos em papel de filtro esterilizado. Os fragmentos de material vegetal desinfetados foram depois depositados à superfície de meio de gelose a 1% (Bacto-agar, Difco) e mantidos na bancada do laboratório à temperatura ambiente, entre 48 e 72 horas. Deste procedimento, resultou o desenvolvimento de diversas colónias, discriminadas à lupa binocular, de forma a se distinguirem, com base na morfologia dos conídios, esporos de fungos do género *Alternaria*.

A obtenção de culturas monospóricas foi realizada seguindo a técnica do esporo único a seguir descrita. Os conídios presentes à superfície do material vegetal amostrado ou formados à superfície dos fragmentos sujeitos à câmara húmida foram transferidos, com auxílio de uma pipeta de Pasteur com a ponta arredondada à chama, observando o material à lupa binocular, para uma placa de Petri contendo meio de gelose a 4%, no qual haviam sido marcados dois eixos ortogonais. Depois de depositados junto de um ponto de interseção dos eixos ortogonais, os esporos foram arrastados ao longo da superfície do meio e distribuídos de forma a ficarem isolados e a uma distância que permitisse destacar cubos de gelose contendo apenas um conídio. De seguida três a quatro cubos de gelose contendo um esporo foram depositados à superfície de meio de gelose de batata dextrosada (PDA, Difco; 29 g/L) contido (15 ml) numa placa de Petri, tendo em vista a obtenção de uma colónia pura para cada material vegetal selecionado.

Para a conservação dos isolados, o fungo foi posto a crescer sobre uma folha de papel de filtro esterilizada, depositada à superfície do meio de PDA, que foi posteriormente destacada da superfície do meio, seca à temperatura ambiente e cortada em quadrados com cerca de 6 mm de lado. Os quadrados de papel de filtro com crescimento do fungo foram posteriormente colocados em carteiras de papel esterilizado devidamente identificadas com o código em uso na micoteca do Laboratório de Patologia Vegetal Verissimo de Almeida no Instituto Superior de Agronomia (ISA/LPVVA) (PTXXX), postos em sacos de plástico e armazenados a uma temperatura de -20°C.

3.2 Características morfoculturais dos isolados

Todos os isolados da coleção foram sujeitos a estudos culturais e morfológicos onde se avaliaram atributos como o diâmetro, a coloração, a frente de crescimento, a textura e a densidade das colônias e a um nível microscópico, o padrão de esporulação e as características morfológicas e a biométrica dos conídios.

Para obtenção de colônias para os diferentes estudos efetuados, o crescimento dos isolados foi reativado, sempre que necessário, em meio PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) contido em placas mantidas à temperatura ambiente sobre a bancada de laboratório.

3.2.1 Características culturais

Para o estudo das características culturais dos isolados, um disco de gelose com 3 mm de diâmetro foi retirado da frente de crescimento da cultura com auxílio de um anel cortante e depositado no centro do meio de gelose de batata dextrosada (PDA, Difco; 29g/L) contido (15 ml) em placas de Petri descartáveis de cristal de Poliestireno com 9 cm de diâmetro. As placas foram posteriormente seladas com parafilm e colocadas em estufas de incubação sob condições de ausência de luz, a $25\pm 1^\circ\text{C}$. Foram realizadas três placas por isolado e duas séries de observação.

No sétimo dia de crescimento, realizaram-se medições do diâmetro das colônias segundo dois eixos ortogonais, com o objetivo de avaliar o crescimento de cada isolado.

As colônias foram de seguida fotografadas e descritas. Foram avaliadas características como a textura, densidade, natureza da frente de crescimento e presença de pigmentos difusíveis no meio. Adicionalmente, foram avaliadas as colorações das fases superior e inferior das colônias considerando a carta de cores de Rayner (1970).

3.2.2 Características morfológicas e biometria dos conídios

Para a avaliação do padrão de esporulação e morfologia das cadeias de esporos os crescimentos dos isolados foram obtidos em meio de gelose a 1% (Bacto-agar, Difco), tendo a incubação decorrido sob condições de ausência de luz a $25\pm 1^\circ\text{C}$. Ao sétimo dia de crescimento as placas foram observadas à lupa binocular com uma ampliação 40x e foram fotografados os campos de maior interesse.

Para o estudo da morfologia das cadeias de esporos, um cubo selecionado do meio de cultura com cerca de 1,5 cm de lado, foi destacado e depositado à superfície de uma lâmina de vidro. Sobre este, depositou-se uma gota de álcool com o objetivo de desidratar e fixar as estruturas e cadeias. Decorridos dois a três minutos, colocou-se uma lamela e captaram-se imagens com recurso a microscópio ótico (LEICA DM2500 Wetzlar, Alemanha) e ao sistema de aquisição de imagens (LEICA DFC295, Wetzlar, Alemanha), obtendo-se imagens com ampliação de 200x ou de 400x.

Para completar o estudo da morfologia das cadeias de esporos, bem como avaliar as características biométricas dos conídios, foram utilizados crescimentos dos fungos obtidos em folha de batateira. Para tal, um cubo de meio de cultura de gelose 1% contendo crescimento ativo de cada isolado foi repicado para o centro de uma placa com o mesmo meio de cultura, à superfície do qual se haviam depositado fragmentos de folha de batateira esterilizados. Foram realizadas duas repetições por isolado. Após 10 dias de crescimento na bancada, à temperatura ambiente, foram observadas frutificações sobre o material vegetal a partir das quais se realizaram preparações entre lâmina e lamela.

Para o estudo das características biométricas dos esporos destacou-se, com auxílio de uma agulha cirúrgica, uma massa de conídios que foi depositada numa gotícula de lactofenol, utilizado como líquido de montagem, disposta na superfície da lâmina e sobre a qual, posteriormente, se colocou uma lamela. No dia seguinte ao da montagem, após a estabilização das estruturas, observaram-se as lâminas e com recurso ao microscópio ótico e ao sistema de aquisição de imagens, referidos anteriormente, foram obtidas imagens com ampliação de 400x. Com o programa Leica Microsystems mediram-se o comprimento e a largura de 30 conídios por isolado. Foram igualmente contabilizados o número de septos transversais e longitudinais.

A caracterização morfológica dos conídios teve em conta a observação das preparações e a análise das fotografias obtidas.

3.3 Caracterização molecular dos isolados de *Alternaria* spp. estudados

Para o estudo molecular das espécies analisadas no presente trabalho, foram ampliadas 3 regiões distintas do DNA, para todos os isolados. As regiões ITS do DNA ribossomal e TEF1- α , locais do genoma extensivamente referenciados na bibliografia consultada para estudos de diversidade genética dentro do género (White et al., 1990; Woudenberg et al., 2013; Landschoot et al., 2017), e a região KOG1058, eleita por ser referenciada pela sua capacidade de diferenciar espécies dentro da secção *Alternata*, com especial interesse na distinção entre as espécies *A. alternata* e *A. arborescens* (Woudenberg et al., 2015).

3.3.1 Extração do DNA

O DNA de cada isolado foi extraído a partir de colónias desenvolvidas em meio de PDA, sob condições de ausência de luz, a $25\pm 1^\circ\text{C}$, com 10 dias de crescimento. Verificando-se crescimento micelial suficiente, foi realizado o processo de raspagem do micélio. Uma vez destacado o micélio e as estruturas do fungo do meio de cultura, estes foram colocados em tubos de eppendorf esterilizados. Os tubos foram mantidos a -15°C por 2h e transferidos, posteriormente, para o liofilizador (Liofilizador EDWARDS Micromodulyo, Edwards High Vacuum International, UK) por um período de 48h. Para cada isolado estudado foram macerados entre 20 a 40 g de micélio liofilizado com recurso a um almofariz, pilão e uma pequena porção de areia acidificada (sand sulphuric acid washed – VWR International bvba/sprl) de forma a facilitar a redução do micélio em pó. O material foi depois transferido para tubos

de eppendorf e sujeito ao protocolo de extração “DNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanha) (Anexo 1)

A quantificação do DNA extraído foi realizada diretamente por espectrofotometria com recurso ao Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, UK), onde foram depositados 2 µl de amostra para leitura, resultando numa matriz de valores organizados. Em algumas situações a quantificação foi realizada por comparação de bandas formadas em gel de agarose sujeito a eletroforese, dos isolados em estudo, com as bandas resultantes de quantidades conhecidas dos marcadores λ-DNA (Lambda Deoxyribonucleic Acid, Amersham Pharmacia Biotech). Foi preparado um gel de agarose 0,75% (v/p) (UltraPure Agarose, Gibco, Paisley, UK) em solução tampão TBE 0,5x (45 mM de Tris-base; 45 mM de ácido bórico; 1 mM de EDTA, pH 8,0) de acordo com o protocolo de Sambrook et al. (1989), ao qual se juntou Green Safe Premium (Nzytech, Lda., PT) na sua formulação, em substituição do brometo de etídio. Após solidificar, o gel de agarose foi colocado numa tina de eletroforese horizontal (Horizon 20.25, Gibso). A eletroforese ocorreu a uma voltagem de 100V durante um período de 90 minutos. As bandas resultantes foram visualizadas num transmissor de ultravioleta (BTX 20.M) de comprimentos de onda de 321 nm. Imprimiu-se uma fotografia dos resultados com uma impressora térmica (Mitsubishi, modelo P91), permitindo uma mais fácil comparação das bandas com o marcador molecular e concluir sobre a concentração aproximada dos isolados.

Em ambos os casos, quando se verificaram concentrações superiores a 15 ng DNA/µl, foram realizadas diluições das soluções adicionando água miliQ até uma concentração aproximada de 10 ng DNA/µl.

3.3.2 Sequenciação e análise da região ITS do DNA ribossomal

A região ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal foi ampliada em todos os isolados da coleção, de modo a comparar as sequências nucleotídicas resultantes. Para isto, foram utilizados os iniciadores universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). A mistura de reação sujeita à amplificação continha 2,5 µl de DNA do isolado, 12,5 µl de ReadyMix Red Taq (Sigma, St. Louis, EUA), 1,25 µl de cada iniciador (STAB-VIDA – Inv. e Serv. Ciências Biológicas, Lda.) e 7,5 µl de água de PCR de forma a perfazer o volume final de 25 µl. Os tubos foram colocados num termociclador (S1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Portugal) programado de acordo com as condições descritas por Ramos (2009): 1 ciclo de 2 min a 95°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C, terminando com um ciclo de 5 min a 72°C.

De seguida, o fragmento amplificado (aproximadamente 530 pb) foi submetido ao protocolo de purificação “QIAquick PCR Purification Kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanha) (Anexo 2). Finalmente, os fragmentos amplificados, juntamente com o iniciador ITS1 foram encaminhados, devidamente identificados, para sequenciação para a empresa STAB VIDA - Inv. e Serv. Ciências Biológicas, Lda.

As sequências obtidas foram compiladas num único ficheiro e alinhadas usando os programas BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5. (Hall, 1999) e ClustalW 2007 (Larkin et al., 2007). Foram produzidos

dendrogramas recorrendo ao programa MEGA 7.0.14 (Kumar et al., 2015) e geraram-se 1000 conjuntos de dados por *bootstrapping* sendo estes sujeitos a uma análise de agrupamento segundo o algoritmo *Maximum likelihood*, realizada sob matrizes de distância calculadas segundo o modelo evolutivo Jukes-Cantor (+G) por ser o modelo que, de acordo com a bibliografia consultada, melhor se adequa aos dados.

Os resultados da sequenciação foram inseridos na base de dados da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e comparados com as sequências nucleotídicas aí disponíveis através da ferramenta BLAST (Madden, 2002).

3.3.3 Sequenciação e análise de um fragmento da proteína TEF1- α

Com o objetivo de comparar as sequências nucleotídicas da proteína TEF1- α dos isolados, foi amplificado um fragmento da mesma. Foi formulada uma reação de ampliação para cada isolado, como descrito anteriormente para a região ITS, variando os iniciadores. Utilizaram-se os iniciadores descritos pelos autores Carbone & Kohn (1999) EF1-728F (5'- CATCGAGAAGTTCGAGAAGG – 3') e EF1-986R (5' – TACTTGAAGGAACCCTTACC – 3'), sendo que as reações de ampliação se processaram no mesmo termociclador sob as seguintes condições: uma fase de desnaturação de 5 min a 94°C seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 48°C e 90s a 72°C terminando com uma fase de alongação de 7 min a 72°C, como descrito por Woudenberg et al. (2013). O mesmo procedimento foi realizado na fase de sequenciação, onde se juntou o iniciador EF1-728F a uma porção de DNA de cada isolado.

Os resultados obtidos passaram pelo processo de edição, alinhamento e comparação com as sequências nucleotídicas disponíveis na base de dados do NCBI com recurso aos programas referidos anteriormente (subcapítulo 3.3.2.).

As sequências obtidas foram compiladas num único ficheiro e alinhadas usando os programas BioEdit 7.2.5. e ClustalW 2007. Foram produzidos dendrogramas recorrendo ao programa MEGA 7.0.14 e geraram-se 1000 conjuntos de dados por *bootstrapping* sendo estes sujeitos a uma análise de agrupamento segundo o algoritmo *Maximum likelihood*, realizada sob matrizes de distância calculadas segundo o modelo evolutivo Kimura 2-parameter por ser o modelo que, de acordo com a bibliografia consultada, melhor se adequa aos dados.

3.3.4 Sequenciação e análise da região KOG1058

O iniciador KOG1058, descrito e estudado por Woudenberg et al. (2015), foi também usado para amplificar uma região do DNA em todos os isolados. Os iniciadores utilizados foram os seguintes: KOG1058F2 (5' - GAGTCACGTTAYCGCASC – 3') e KOG1058R2 (5' - TGGCTKACGGARACG - 3'). A mistura de ampliação, idêntica às descritas anteriormente para as regiões ITS e TEF1- α , foi sujeita às condições descritas pelos mesmos autores: uma fase inicial de desnaturação de 5 min a 94°C, seguindo 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 59°C e 60s a 72°C, finalizando com uma fase de alongação de 7 min a 72°C. O mesmo procedimento foi realizado na fase de sequenciação, onde se juntou o iniciador KOG1085F2 a uma porção de DNA de cada isolado. Os resultados obtidos passaram pelo processo

de edição, alinhamento e comparação com as sequências nucleotídicas disponíveis na base de dados do NCBI com recurso aos programas referidos anteriormente (subcapítulo 3.3.2.).

As sequências obtidas foram compiladas num único ficheiro e alinhadas usando os programas BioEdit 7.2.5. e ClustalW 2007. Foram produzidos dendrogramas recorrendo ao programa MEGA 7.0.14 e geraram-se 1000 conjuntos de dados por *bootstrapping* sendo estes sujeitos a uma análise de agrupamento segundo o algoritmo *Maximum likelihood*, realizada sob matrizes de distância calculadas segundo o modelo evolutivo Kimura 2-parameter (+G) por ser o modelo que, de acordo com a bibliografia consultada, melhor se adequa aos dados.

3.4 Estudos de patogenicidade e virulência dos isolados de *Alternaria* spp.

Todos os isolados da coleção foram testados quanto à patogenicidade e quanto à virulência em folhas do hospedeiro de origem e, adicionalmente, em folhas de tomateiro e de batateira. Para tal, foram preparadas suspensões de esporos para cada isolado, para inoculação de discos de folhas dos seis diferentes hospedeiros: tomateiro, batateira, pimenteiro, malagueta, fisális e jiló.

3.4.1 Produção do material vegetal

Da totalidade de hospedeiros que foram utilizados nos ensaios de patogenicidade e virulência, apenas foram cultivadas plantas de tomateiro e de batateira. Folhas de jiló, fisális, pimenteiro e malagueta foram gentilmente fornecidas por um agricultor, proprietário de uma quinta em Alcochete.

As plantas de tomateiro (cv. Marmande) foram transplantadas para vasos três semanas após a sementeira nos tabuleiros, enquanto as plantas de batateira (cv. Désirée) se desenvolveram diretamente a partir de tubérculos nos vasos de polietileno com 5 L de substrato (Siro Strat Melhorado, Portugal) (Fig. 4), numa estufa de campo com sistema *cooling* para manutenção da temperatura ambiente.



Fig. 4 – Aspeto de tomateiros e batateiras tutoradas em vasos de polietileno, com três semanas de idade, produzidas em estufa com sistema *cooling* sob luz natural.

As plantas foram mantidas sob luz natural e foram regadas regularmente, de acordo com as suas necessidades hídricas. Procedeu-se ainda à sua fertilização (25-5-10 + 2MgO) (Agromaster, Everris) três semanas após transplantação. Estas plantas foram utilizadas na primeira série de inoculações (5 a 6 semanas de idade). Devido a um ataque de afídeos, dadas as condições ambientais atípicas, várias

plantas de batateira não sobreviveram pelo que na segunda série de inoculações utilizaram-se folhas de batateira da mesma cultivar provenientes de Alcochete.

3.4.2 Ensaio de patogenicidade e virulência em discos de folhas destacadas

Foram utilizados discos de folhas dos diferentes hospedeiros de interesse para construir os ensaios de patogenicidade e virulência. As folhas, imediatamente após a colheita, foram transportadas para o laboratório onde foram sujeitas a uma desinfecção superficial. Para isto, o material vegetal necessário foi imerso em álcool 70%, durante 30 segundos, e depois numa solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 90 segundos, agitando de forma a molhar toda a superfície do material. Seguidamente, o material vegetal foi mergulhado em água destilada esterilizada duas vezes e seco em papel de filtro esterilizado. Foram destacados discos das folhas com 18 mm de diâmetro usando um cortador esterilizado.

Cinco discos de um determinado hospedeiro vegetal foram dispostos espaçadamente à superfície de meio de gelose a 0,75% (15 ml), contido numa placa de Petri. Para cada hospedeiro a inocular utilizaram-se 10 discos de folhas. Os discos foram posteriormente inoculados com 10 µl de uma suspensão de conídios preparada previamente (1×10^4 conídios/ml) do respetivo isolado, sendo depositadas no centro do disco (Fig. 5). Para os isolados obtidos a partir de pimenteiro, malagueta, fisális e jiló, procedeu-se à inoculação de 30 discos, isto é, duas caixas de Petri contendo discos do hospedeiro de origem de cada isolado, mais duas caixas de Petri com discos de folha de tomateiro e mais duas caixas de Petri com discos de folhas de batateira. Para os restantes 20 isolados, uma vez que o seu hospedeiro de origem correspondia a batateira ou tomateiro, apenas foram procedidas inoculações em 20 discos, isto é, duas caixas de Petri com discos de folha de tomateiro e duas adicionais com discos de folha de batateira. Com isto, para todos os isolados foram feitas inoculações em folha de tomateiro e de batateira. Foram realizadas duas séries de inoculações. O controlo foi realizado paralelamente a cada série, onde se inocularam 10 discos por hospedeiro testado com 10 µl de água destilada esterilizada. As placas foram mantidas sobre a bancada de laboratório, à temperatura ambiente e os discos foram avaliados sete dias após inoculação.



Fig. 5 - Inoculação de discos de folhas destacadas dos hospedeiros em estudo por deposição de uma gotícula de suspensão de conídios do respetivo isolado de *Alternaria* spp.

De acordo com a sintomatologia observada foi elaborado uma escala de severidade, tendo como objetivo avaliar quantitativamente a severidade da doença provocada pelo isolado nos diferentes hospedeiros (Quadro 5). Como se constata, não foram especificados os hospedeiros nas imagens dada a transversalidade dos sintomas observados entre todos os hospedeiros avaliados.

3.4.3 Preparação da suspensão de conídios

A suspensão de esporos foi obtida a partir de placas de PDA com 10 a 12 dias de crescimento em estufa sob condições de ausência de luz, a $25\pm 1^\circ\text{C}$. Foram adicionados 10 ml de solução de água destilada e TWEEN80 (0,01%) às placas de Petri e, com o objetivo de desalojar os conídios do meio de cultura, procedeu-se a uma raspagem com a extremidade de uma lâmina esterilizada. A suspensão obtida foi seguidamente filtrada através de duas camadas de gaze esterilizada, com auxílio de um funil, para um Erlenmeyer, de forma a remover hifas e restos do meio de cultura.

As concentrações das suspensões resultantes foram medidas com recurso a um hemacitómetro (NEWBOWER Improved, *Brand, Germany*), e ajustadas a 1×10^4 conídios/ml.










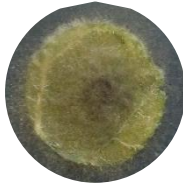
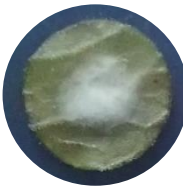


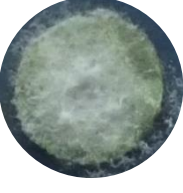

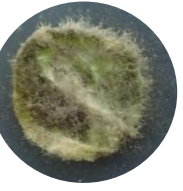


3.5 Tratamento estatístico

Com auxílio do Microsoft Excel foram calculados os valores mínimos, médios, máximos e o desvio padrão para a largura e comprimento dos esporos e valores mínimos, da moda e máximos para o número de septos. Com recurso ao programa estatístico Minitab realizou-se, separadamente para os isolados de *A. alternata* e para os isolados de *A. infectoria*, o teste de comparação de médias ao comprimento e à largura (μm) dos conídios.

Os resultados dos testes de patogenicidade e virulência tiveram como base uma escala de severidade, entre 0 e 5 (Quadro 5) produzida de acordo com os resultados das inoculações. Dos resultados das duas séries de inoculação, recorrendo à ferramenta Microsoft Excel, foram determinados índices de doença (ID) com base na fórmula referida por McKinney (1923):

$$\text{Índice de Doença (ID)} = \frac{\sum(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}}$$

Quadro 5 - Escala de severidade com a descrição sintomatológica correspondente a cada grau de doença, com fotografias, após sete dias de inoculação com isolados de *Alternaria* spp.

| Severidade da doença | Descrição dos sintomas | Sintomas 7 dias após inoculação | | |
|----------------------|---|---|---|---|
| 0 | Ausência de sintomas |  |  |  |
| 1 | Baixo crescimento micelial na zona de inoculação; ausência de esporulação; |  |  |  |
| 2 | Baixo crescimento micelial e baixa esporulação; cobrindo até 30% da área total do disco; |  |  |  |
| 3 | Abundante crescimento micelial e/ou abundante esporulação; cobrindo até 30% da área total do disco; |  |  |  |
| 4 | Abundante crescimento micelial, cobrindo 100% da área do disco; baixa esporulação; |  |  |  |
| 5 | Abundante crescimento micelial, cobrindo 100% da área do disco; abundante esporulação; |  |  |  |

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleção de isolados e dados de passaporte

A coleção de isolados de fungos do género *Alternaria* obtida no presente estudo é formada por 30 isolados que foram obtidos de *C. annuum* (um isolados), *C. frutescens* (dois isolados), *P. peruviana* (um isolado), *S. aethiopicum* (seis isolados), *S. lycopersicum* (12 isolados) e *S. tuberosum* (oito isolados). Na identificação dos referidos isolados com base em critérios morfológicos (subcapítulo 4.2) e caracterização molecular (subcapítulo 4.3) registou-se que se enquadravam nas espécies *A. alternata* (19 isolados), *A. arborescens* (um isolado), *A. consortialis* (um isolado), *A. infectoria* (oito isolados) e *A. tenuissima* (um isolado) (Quadro 6). Obtiveram-se isolados de *A. alternata* a partir de todos os hospedeiros em estudo.

Quadro 6 - Dados de passaporte dos isolados considerados no presente estudo, com referência ao hospedeiro de origem, órgão vegetativo a partir do qual foi obtido, local e data de colheita e sua identificação à espécie.

| Código | Hospedeiro | Espécie * | Órgão vegetativo | Local de colheita | Data de colheita |
|--------|-----------------------------|------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| PT574 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Alcochete | Jan-2017 |
| PT575 | <i>Capsicum frutescens</i> | <i>A. alternata</i> | Sépalas | Tapada da Ajuda | Jan-2017 |
| PT579 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jan-2017 |
| PT580 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. arborescens</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jan-2017 |
| PT583 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. infectoria</i> | Folha | Alcochete | Jan-2017 |
| PT585 | <i>Physalis peruviana</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jan-2017 |
| PT587 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Alcochete | Jan-2017 |
| PT589 | <i>Capsicum frutescens</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jan-2017 |
| PT600 | <i>Solanum aethiopicum</i> | <i>A. alternata</i> | Fruto | Alcochete | Jan-2017 |
| PT601 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | Folha | Alcochete | Fev-2017 |
| PT602 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. consortialis</i> | Folha | Alcochete | Abril-2017 |
| PT603 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | Folha | Alcochete | Abril-2017 |
| PT604 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Alcochete | Abril-2017 |
| PT605 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Abril-2017 |
| PT606 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Mai-2017 |
| PT608 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Mai-2017 |
| PT611 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Mai-2017 |
| PT612 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Mai-2017 |
| PT615 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | Fruto | Tapada da Ajuda | Mai-2017 |
| PT616 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jun-2017 |
| PT619 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jun-2017 |
| PT620 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jun-2017 |
| PT621 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jun-2017 |
| PT622 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jun-2017 |
| PT623 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. infectoria</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jun-2017 |
| PT624 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. tenuissima</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jun-2017 |
| PT625 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. infectoria</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jun-2017 |
| PT626 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. infectoria</i> | Folha | Tapada da Ajuda | Jun-2017 |
| PT627 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Silveira, Torres Vedras | Jun-2017 |
| PT628 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | Folha | Silveira, Torres Vedras | Jun-2017 |

*A identificação à espécie dos isolados, foi feita com base no cruzamento entre as suas características morfológicas e os resultados da sequenciação da região ITS do DNA ribossomal e dos genes que codificam EF- α e KOG1058

4.2 Caracterização morfocultural

Como se pode verificar na análise do Quadro dos dados de passaporte dos isolados (Quadro 6), os isolados identificados como *A. alternata* representam mais de 60% da totalidade dos isolados obtidos. Considerando a importância desta espécie como agente patogénico em doenças em solanáceas, a sua representatividade na coleção e a grande variabilidade de características entre os isolados, na caracterização morfocultural optou-se por realizar o teste de comparação de médias (Teste de Tukey com 95% de confiança) para os isolados identificados como *A. alternata* separadamente dos isolados das demais espécies.

4.2.1 Crescimento das colónias

Os resultados obtidos no estudo do crescimento das colónias para os isolados identificados como *A. alternata* encontram-se resumidos no Quadro 7.

Quadro 7 - Sieriação dos isolados de *Alternaria alternata* de acordo com o teste de comparação do diâmetro médio das colónias (mm) em PDA, após incubação sob condições de ausência de luz, a $25\pm 1^\circ\text{C}$, ao fim de sete dias de crescimento (Teste de Tukey, 95% de confiança)

| Isolado | Espécie | Hospedeiro de origem | Média do diâmetro das colónias ao fim de 7 dias* |
|---------|---------------------|-----------------------------|--|
| PT627 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 74,2 a |
| PT621 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 71,3 ab |
| PT611 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 63,8 bc |
| PT575 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum frutescens</i> | 62,0 bcd |
| PT628 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 60,2 cde |
| PT612 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 58,7 cdef |
| PT600 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum aethiopicum</i> | 53,7 defg |
| PT604 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 51,5 efgh |
| PT622 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 50,8 efgh |
| PT608 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 50,5 efgh |
| PT620 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 50,3 fgh |
| PT616 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 48,0 ghi |
| PT579 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 47,7 ghi |
| PT587 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 47,5 ghi |
| PT574 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 46,8 ghi |
| PT615 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 45,7 ghi |
| PT589 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum frutescens</i> | 43,3 hi |
| PT585 | <i>A. alternata</i> | <i>Physalis peruviana</i> | 41,8 hi |
| PT605 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 40,2 i |

* Os isolados com uma ou mais letras em comum não diferem significativamente de acordo com Teste de Tukey com um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$)

Para a totalidade dos isolados de *A. alternata* registaram-se diâmetros das colónias a variar entre os 74,2 mm e os 40,2 mm, correspondendo aos isolados PT627 e PT605 que, conseqüentemente, atingiram os valores máximo e mínimo de crescimento cultural em PDA deste estudo. A média do

crescimento na totalidade dos isolados de *A. alternata* é de 53 mm de diâmetro. Na análise estatística dos valores de crescimento registaram-se diferenças significativas entre isolados. A disparidade nos resultados de crescimento das colónias de *A. alternata* foi igualmente registada por Durand (2017) que, em PDA e para as mesmas condições de crescimento, obteve isolados com diâmetros compreendidos entre 33 mm e 72 mm. Marak et al. (2014), num estudo sobre *A. solani*, registaram igualmente diferenças na cinética de crescimento nessa espécie de acordo com o hospedeiro de origem.

Verificou-se que os isolados obtidos a partir de pimenteiro (*Capsicum annuum*) se agrupam em posições inferiores do Quadro 7, o que corresponde a menores valores de diâmetro das colónias atingidos em sete dias de crescimento em PDA. Contudo, apesar desta diferença, não se registou uma variação significativa entre os isolados de *A. alternata* com origem em pimenteiro (PT579, PT587, PT574, PT615) e os isolados da mesma espécie com origem noutros hospedeiros, nomeadamente jiló (PT600), malagueta (PT589), fisális (PT585), batateira (PT604, PT608 e PT605) ou tomateiro (PT622, PT608 e PT605). Da mesma forma, verificou-se um agrupamento dos isolados com origem em tomateiro nas posições médias e superiores do Quadro 7. Marak et al. (2014), num estudo sobre *A. solani*, registaram a variabilidade cultural dentro da espécie de acordo com o hospedeiro de origem, noção ligeiramente presente nesta análise. Contudo, os isolados PT575 e PT589, obtidos a partir de malagueta, atingiram 62 mm e 43 mm de diâmetro e, apesar de diferirem significativamente entre si, não diferiram dos restantes isolados de *A. alternata* provenientes de outros hospedeiros.

No Quadro 8, encontram-se resumidos os resultados do crescimento das colónias para os isolados identificados como *A. infectoria*, *A. consortialis*, *A. tenuissima* e *A. arborescens*. Pela análise dos resultados das duas séries, registou-se o crescimento das colónias dos isolados de *A. infectoria* com origem em pimenteiro, tomateiro e batateira, a variar entre 72 mm e 60 mm de diâmetro, com um valor médio de 66 mm. Este intervalo de valores mostrou-se mais restrito e menos variável que o intervalo de valores registado para os isolados de *A. alternata* (Quadro 7). No entanto, o crescimento de isolados de *A. infectoria* variou significativamente entre si. Note-se que, apesar dos isolados *A. alternata* PT627 e PT621 terem apresentado os maiores valores de diâmetro atingido (74,2 e 71,3 mm), a totalidade dos isolados de *A. infectoria* apresentou um valor de diâmetro superior a 65 mm. Os resultados deste estudo para *A. infectoria* estão exatamente de acordo com os valores registados para esta espécie, por Durand (2017) e Rahimboo, et al. (2015), em meio PDA e PCA, respetivamente.

O isolado PT583 (*A. infectoria*), obtido a partir de pimenteiro, foi o isolado que atingiu o maior valor de crescimento de entre os isolados estudados, 71,5 mm de diâmetro. Contudo, não diferiu significativamente dos isolados de *A. infectoria* PT623, PT619, PT601 e PT605 obtidos a partir de folha de batateira e de tomateiro. Pela análise dos resultados verificou-se que, neste estudo, não se encontrou nenhuma associação entre o crescimento das culturas de *A. infectoria* e os hospedeiros de origem ou a sua origem geográfica.

Os isolados PT602 (*A. consortialis*) e PT624 (*A. tenuissima*), em sete dias de crescimento, atingiram 58 mm e 55 mm de diâmetro, respetivamente, não variando significativamente entre si, nem com o

isolado de *A. infectoria*, PT603. Wee et al. (2016), em meio PDA, registou um crescimento de 50 mm em apenas cinco dias de crescimento, para isolados de *A. tenuissima*.

Quadro 8 - Sieriação dos isolados de *Alternaria infectoria*, *A. consortialis*, *A. tenuissima* e *A. arborescens* de acordo com o teste de comparação do diâmetro médio das colónias (mm) em PDA, após incubação sob condições de ausência de luz, a 25±1°C, ao fim de sete dias de crescimento (Teste de Tukey, 95% de confiança)

| Isolado | Espécie | Hospedeiro de origem | Média do diâmetro das colónias ao fim de 7 dias* |
|---------|------------------------|-----------------------------|--|
| PT583 | <i>A. infectoria</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 71,5 a |
| PT623 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 67,5 ab |
| PT619 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 67,0 ab |
| PT601 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 66,8 ab |
| PT625 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 66,2 ab |
| PT626 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 63,7 bc |
| PT606 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 62,8 bcd |
| PT603 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 60,0 cde |
| PT602 | <i>A. consortialis</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 57,7 de |
| PT624 | <i>A. tenuissima</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 55,2 e |
| PT580 | <i>A. arborescens</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 47,5 f |

* Os isolados com uma ou mais letras em comum não diferem significativamente de acordo com Teste de Tukey com um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$)

O isolado PT580 (*A. arborescens*) obtido a partir de pimento, apresentou menor valor de crescimento dentro do grupo considerado no Quadro 8, com 47,5 mm de diâmetro, variando significativamente dos restantes isolados de *A. infectoria*, *A. consortialis* e *A. tenuissima*. Contudo, aproximadamente 37% dos isolados de *A. alternata* considerados no estudo apresentaram um crescimento inferior ao registado para o isolado de *A. arborescens*.


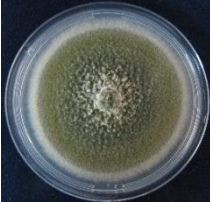
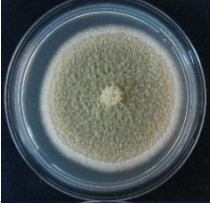
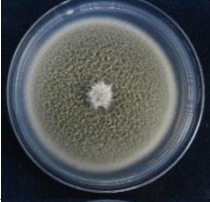
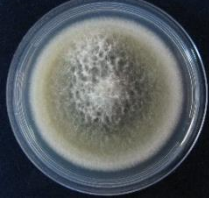
Adicionalmente, os isolados *A. tenuissima*, *A. arborescens* e *A. consortialis* encontram-se dentro da gama de variação de valores de diâmetro atingidos pelos isolados identificados como *A. alternata*.

4.2.2 Características culturais




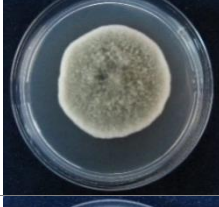
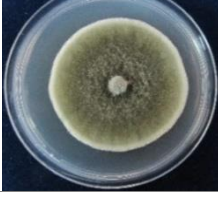
Visualmente foram distinguidos, com base na coloração da face superior, na densidade da colónia e na frente de crescimento, diversos grupos culturais de isolados. As características da face inferior das colónias não foram consideradas muito relevantes, uma vez que apresentaram um elevado grau de variabilidade mesmo dentro dos grupos mais homogêneos respeitantes às características anteriormente referidas. Os resultados deste estudo encontram-se resumidos no Quadro 9, sendo a numeração para a cor referente à carta de cores de Rayner (1970).

Os oito isolados identificados como *A. infectoria* (PT583, PT601, PT603, PT606, PT619, PT623, PT625 e PT626) destacaram-se por apresentarem um crescimento uniforme com uma coloração em tons cinzento, frequentemente com afloramentos cotonosos brancos no centro das colónias, formando

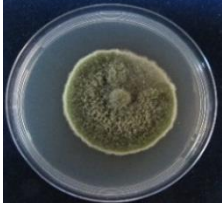
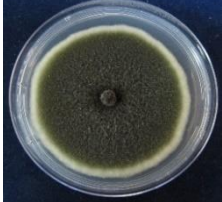

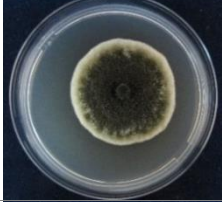
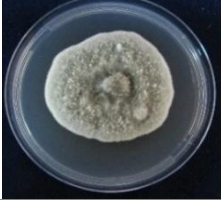
Quadro 9 - Descrição das colónias dos isolados da coleção e fotografias, ao fim de 8 dias de crescimento, incubadas sob condições de ausência de luz, a 25±1°C.

| Isolado e espécie | Fase superior | | | | | Face inferior |
|--------------------------------------|---|-----------------------|----------|-----------|---|--|
| | Cor | Frente de crescimento | Textura | Densidade | Fotografia | |
| PT583 <i>A. infectoria</i> | Oliváceo-claro (89) a cinzento-escuro (105) com afloramentos cotonosos cinzento-claro (117) na zona central | Regular | Feltrosa | Forte |  | Oliváceo-escuro (48) |
| PT601 <i>A. infectoria</i> | Cinzento-claro (117) a oliváceo (90) com afloramentos cotonosos cinzento-claro (117) na zona central | Difusa | Feltrosa | Forte |  | Oliváceo-escuro (48) |
| PT603 <i>A. infectoria</i> | Cinzento-claro (117) com margem bege (45) com afloramentos cotonosos na zona central | Regular | Feltrosa | Forte |  | Oliváceo (90) com margem bege (45) |
| PT606 <i>A. infectoria</i> | Oliváceo-claro (89) com margem bege (45) | Regular | Feltrosa | Forte |  | Oliváceo (90) com margem bege (45) |
| PT619 <i>A. infectoria</i> | Cinzento-oliváceo (107) a bege (45) com afloramentos cotonosos cinzento-claro (117) | Regular | Feltrosa | Média |  | Oliváceo-escuro (48) a cor canela (62) e bege (45) |


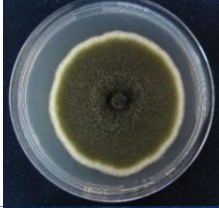



Quadro 9 - Descrição das colônias dos isolados da coleção e fotografias, ao fim de 8 dias de crescimento, incubadas sob condições de ausência de luz, a 25±1°C (cont.)

| Isolado e espécie | Fase superior | | | | | Face inferior |
|---------------------------------------|--|-----------------------|---------------|-------------|---|--|
| | Cor | Frente de crescimento | Textura | Densidade | Fotografia | |
| PT623 <i>A. infectoria</i> | Entre isabelino (65) a cor mel (64) com afloramentos cotonosos altos cinzento-claro (117) na zona central | Regular | Feltrosa | Média |  | Oliváceo-escuro (48) com margem cor canela-isabelino (62-65) |
| PT625 <i>A. infectoria</i> | Entre isabelline (65) a cor mel (64) com afloramentos cotonosos altos cinzento-claro (117) na zona central | Regular | Feltrosa | Média |  | Cor canela (62) |
| PT626 <i>A. infectoria</i> | Oliváceo (90) a beje (45), com afloramentos cotonosos cinzento-claro (117) | Regular | Feltrosa | Média |  | Oliváceo (90) a beje (45) |
| PT580 <i>A. arborescens</i> | Cinzento-claro (117) | Regular | Feltrosa alta | Muito forte |  | Oliváceo-escuro (48) a oliváceo-claro (89) |
| PT624 <i>A. tenuissima</i> | Oliváceo (90) | Regular | Feltrosa | Forte |  | Oliváceo-escuro (48) |




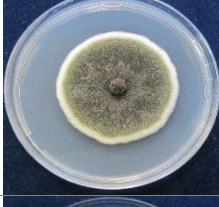
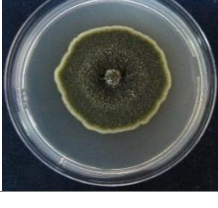
Quadro 9 - Descrição das colônias dos isolados da coleção e fotografias, ao fim de 8 dias de crescimento, incubadas sob condições de ausência de luz, a 25±1°C (cont.)

| Isolado e espécie | Fase superior | | | | | Fotografia | Face inferior |
|-------------------------------------|---|-----------------------|---------------|-------------|--|---|---|
| | Cor | Frente de crescimento | Textura | Densidade | | | |
| PT574 <i>A. alternata</i> | Oliváceo (90) com afloramentos cotonosos cinzento-oliváceos (107) | Regular | Feltrosa | Forte | |  | Oliváceo-escuro (48) com pigmentos difusíveis no meio de cultura cor de ferrugem (39) |
| PT575 <i>A. alternata</i> | Oliváceo-escuro (48) | Regular | Feltrosa | Forte | |  | Oliváceo-escuro (48) a oliváceo-claro (89) |
| PT579 <i>A. alternata</i> | Cinzento-escuro (105) | Regular | Feltrosa alta | Forte | |  | Oliváceo (90) |
| PT585 <i>A. alternata</i> | Oliváceo-escuro (48) | Regular | Feltrosa | Forte | |  | Oliváceo-claro (89) |
| PT587 <i>A. alternata</i> | Cinzento-claro (117) | Regular | Feltrosa | Muito forte | |  | Oliváceo-escuro (48) |

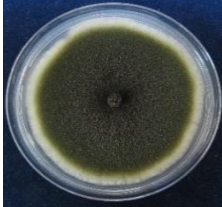
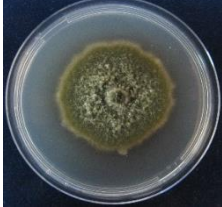
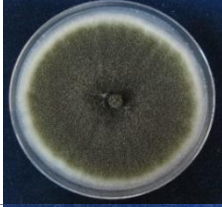

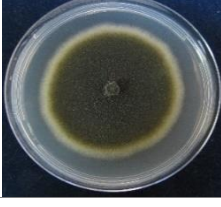
Quadro 9 - Descrição das colônias dos isolados da coleção e fotografias, ao fim de 8 dias de crescimento, incubadas sob condições de ausência de luz, a 25±1°C (cont.)

| Isolado e espécie | Fase superior | | | | | Fotografia | Face inferior |
|-------------------------------------|--|-----------------------|---------------|-------------|--|---|---|
| | Cor | Frente de crescimento | Textura | Densidade | | | |
| PT589 <i>A. alternata</i> | Cinzeno-claro (117) com afloramentos cotonosos cinzeno-oliváceos (107) | Regular | Feltrosa alta | Muito forte | |  | Cor avelã (88) com pigmentos difusíveis no meio de cultura com cor ferugem (39) |
| PT600 <i>A. alternata</i> | Oliváceo-escuro (48) | Regular | Feltrosa | Forte | |  | Oliváceo-escuro (48) a oliváceo-claro (89) |
| PT604 <i>A. alternata</i> | Oliváceo-claro (89) | Regular | Feltrosa | Forte | |  | Cor avelã (88) com pigmentos difusíveis no meio de cultura com cor ferugem (39) |
| PT605 <i>A. alternata</i> | Cinzeno-claro (117) | Regular | Feltrosa alta | Muito forte | |  | Cor avelã (88) com pigmentos difusíveis no meio de cultura com cor ferugem (39) |
| PT608 <i>A. alternata</i> | Cinzeno-oliváceo (107) | Regular | Feltrosa | Forte | |  | Cor avelã (88) |

Quadro 9 - Descrição das colônias dos isolados da coleção e fotografias, ao fim de 8 dias de crescimento, incubadas sob condições de ausência de luz, a 25±1°C (cont.)

| Isolado e espécie | Fase superior | | | | | Fotografia | Face inferior |
|-------------------------------------|---|-----------------------|---------------|-----------|--|---|--|
| | Cor | Frente de crescimento | Textura | Densidade | | | |
| PT611 <i>A. alternata</i> | Oliváceo-escuro (48) a oliváceo (90) com margem bege (45) | Regular | Feltrosa alta | Forte | |  | Oliváceo-escuro (89) a cinzento-oliváceo (107) |
| PT612 <i>A. alternata</i> | Oliváceo-escuro (48) | Regular | Feltrosa | Forte | |  | Oliváceo-claro (89) |
| PT615 <i>A. alternata</i> | Cinzento-oliváceo (107) | Regular | Feltroso alto | Forte | |  | Cinzento-oliváceo (107) |
| PT616 <i>A. alternata</i> | Cinzento-oliváceo (107) a oliváceo (90) | Regular | Feltrosa | Forte | |  | Oliváceo-escuro (48) com margem oliváceo-claro (89) |
| PT620 <i>A. alternata</i> | Oliváceo-escuro (48) | Regular | Feltrosa | Forte | |  | Oliváceo-escuro (48) com margem cinzento-claro (117) |

Quadro 9 - Descrição das colônias dos isolados da coleção e fotografias, ao fim de 8 dias de crescimento, incubadas sob condições de ausência de luz, a 25±1°C (cont.)

| Isolado e espécie | Fase superior | | | | | Face inferior |
|--|---|-----------------------|-----------------------------|-----------|---|---|
| | Cor | Frente de crescimento | Textura | Densidade | Fotografia | |
| PT621 <i>A. alternata</i> | Oliváceo-escuro (48) | Regular | Feltrosa | Forte |  | Oliváceo-escuro (48) a cinzento-oliváceo (107) |
| PT622 <i>A. alternata</i> | Oliváceo-escuro (48) com afloramentos cotonosos cinzento-oliváceos (107) no centro | Difusa | Feltrosa | Forte |  | Oliváceo escuro (48) com pigmentos difusíveis no meio de cultura com cor mel (64) |
| PT627 <i>A. alternata</i> | Oliváceo-escuro (48) | Regular | Feltrosa | Forte |  | Oliváceo-escuro (48) a cinzento-oliváceo (107) |
| PT628 <i>A. alternata</i> | Cinzento-oliváceo (107) a oliváceo (90) | Regular | Feltrosa, alta no centro | Forte |  | Oliváceo-escuro (48) a cinzento-oliváceo (107) |
| PT602 <i>A. consortialis</i> | Oliváceo-escuro (48) | Difusa | Feltroso baixo | Forte |  | Oliváceo-escuro (48) |

uma margem regular, textura feltrosa e densidade média a forte. Estas características, nomeadamente a coloração das colónias, encontram-se em conformidade com a informação recolhida na revisão bibliográfica que descreve para esta espécie culturas esbranquiçadas a acinzentadas e feltrosas (Rahimloo et al., 2015; Andersen et al., 2002).

O isolado PT580 (*A. arborescens*) apesar de se encontrar dentro da gama de cores dos isolados identificados como *A. infectoria*, apresentou menor crescimento e originou uma colónia com uma textura feltrosa alta e densidade superior, contradizendo a informação recolhida na revisão bibliográfica. Os autores Wenneker et al.(2018), em PDA e na ausência de luz a 20°C, verificaram colónias castanho-bronzeadas a pretas, com margens irregulares e textura feltrosa. As características dos isolados PT579, PT587 e PT615 aproximam-se das características do isolado identificado como *A. arborescens* (PT580), no entanto, de acordo com as suas características morfológicas e moleculares, estes foram identificados como *A. alternata*.

Os isolados PT575, PT600, PT612, PT621 e PT627 formaram o grupo mais uniforme e que mais se assemelhou às características descritas na revisão da bibliografia para os isolados de *A. alternata*, apresentando tipicamente um crescimento regular e coloração oliváceo-escura. O isolado identificado como *A. consortialis* (PT602) diferenciou-se destes isolados pela formação de uma frente de crescimento com cor difusa. No isolado desta espécie ocorreu esporulação abundante, o que conferiu aspeto granuloso e tonalidade escura à colónia, nomeadamente oliváceo-escuro a preto, em conformidade com a revisão bibliográfica, ("Mycobank Database," 2017).

O isolado PT624, identificado como *A. tenuissima*, agrupou-se aos isolados PT611 e PT616 (*A. alternata*) devido à sua coloração entre oliváceo a cinzento com margens esbranquiçadas, em concordância com alguma bibliografia consultada (Đisalov et al., 2015; Lin et al., 2016). Por outro lado, os isolados PT611 e PT616 mostraram textura feltrosa a feltrosa alta.

Pelo estudo das características morfológicas e moleculares, os restantes isolados foram identificados como *A. alternata*. Na generalidade dos casos para esta espécie as colónias mostraram-se com diferentes tonalidades entre o oliváceo-claro e oliváceo-escuro a cinzento, com uma frente de crescimento regular, textura feltrosa e densidade forte (PT585, PT604, PT608, PT620, PT628, entre outros). No entanto ocorreram exceções, a frente de crescimento da colónia produzida pelo isolado PT622 mostrou-se difusa e apresentou afloramentos cotonosos cinzento-oliváceo na zona central e o isolado PT628 formou anéis concêntricos com uma textura feltrosa alta na zona central. Estes casos mostram a elevada variabilidade cultural possível dentro da espécie *A. alternata*. Adicionalmente, e de acordo com Devi et al. (2014), alguns isolados de *A. alternata* produziram pigmentos cor de mel difusíveis no meio de cultura, nomeadamente, os isolados PT574, PT589, PT605 e PT622.

4.2.3 Características morfológicas dos conídios e padrão de esporulação

Os resultados obtidos para o estudo da biometria dos esporos dos isolados identificados como *A. alternata* e para os restantes isolados em estudo encontram-se resumidos no Quadro 10. Na Fig. 6

apresentam-se aspetos do padrão de esporulação e das características morfológicas dos conídios de *A. alternata*, *A. infectoria*, *A. arborescens*, *A. tenuissima* e *A. consortialis*, em gelose 1%, complementadas com fotografias à escala 200x e 400x.

Para os isolados identificados como *A. alternata*, dada a elevada variabilidade dos valores de comprimento e de largura dos conídios, não foi possível distinguir grupos homogêneos com base nestas características. O comprimento dos conídios da totalidade dos isolados de *A. alternata* variou entre 17,5 e 55,7 μm , com uma média compreendida entre 33,8 e 26,6 μm . Ambos os isolados com origem em *C. frutescens*, PT575 e PT598, obtiveram valores de médias de comprimento significativamente diferentes dos isolados PT605 e PT615 com origem em *S. tuberosum* e *C. annuum*, respetivamente. Contudo, o comprimento não é uma característica que permite diferenciar as espécies de *Alternaria* de acordo com o hospedeiro de origem uma vez que estas médias (PT575 e PT598) não variaram significativamente com a maioria dos isolados, incluindo outros isolados com origem em *S. tuberosum* (PT608, PT628 e PT604) e *C. annuum* (PT587 e PT574) e ainda, dos isolados obtidos a partir de *S. lycopersicum* (PT612, PT627, PT622, entre outros), jiló (PT600) ou do isolado PT585, de *P. peruviana*. Os autores Ali et al. (2006) e Vasconcelos et al. (2014), a partir dos hospedeiros *S. lycopersicum* e *S. tuberosum*, obtiveram isolados de *A. alternata* com valores de comprimento entre 19,7 e 63,0 μm , idênticos aos valores registados no presente estudo. Relativamente à bibliografia anteriormente referida, os autores Bessadat et al. (2014b) registaram valores de comprimento com uma maior variabilidade, entre 7,0 e 60,0 μm , em meio PCA.

Os valores de largura dos conídios da espécie *A. alternata* variaram entre 7,0 e 18,4 μm . Desta característica podem retirar-se as mesmas conclusões que anteriormente, relativas à impossibilidade de distinção de grupos homogêneos de isolados. A bibliografia consultada regista valores entre 9,0 e 19,0 μm (Ali et al., 2006; Vasconcelos et al., 2014).

O número de septos dos esporos dos isolados de *A. alternata* variou entre 1 a 8 septos transversais e 0 a 4 septos longitudinais ou oblíquos. Bessadat et al. (2014b) obtiveram conídios com um máximo de 8 septos transversais e até 3 septos longitudinais, em meio PCA. Vasconcelos et al. (2014) obtiveram valores entre 2 e 6 septos transversais e 1 a 5 septos longitudinais.

Os conídios de *A. alternata* mostraram-se castanho-claro a castanho, obclavados, obpiriformes ou elipsóidais, sem bico e muriformes. As características descritas estão de acordo com as descrições de diversos autores para esta espécie. Contudo, Dube (2014) faz referência à formação de bicos curtos para a espécie *A. alternata*, em meio de cultura PCA.

Os isolados identificados como *A. alternata* mostraram conidióforos primários relativamente curtos, com até 3 septos, conídios em cadeias, simples ou ramificadas, mais ou menos longas entre 5 e 12 esporos, originadas diretamente a partir da superfície do meio, formando conidióforos secundários curtos a partir do corpo do conídio originando cadeias ramificadas curtas, com 2 a 5 esporos (Fig. 6 A-C). Estas características e padrão de esporulação, encontram-se de acordo com o descrito pelos

Quadro 10 – Parâmetros dendrométricos dos conídios dos isolados identificados neste estudo, em gelose 1%, com 10 dias de crescimento na ausência de luz a 25±1°C. Referência ao hospedeiro de origem e aos valores de comprimento e largura dos conídios, do número de septos transversais e do número de septos longitudinais.

| Isolado | Espécie | Hospedeiro | Comprimento (µm)* | Largura (µm)* | Septos transversais** | Septos longitudinais** |
|---------|------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|
| PT615 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 21,6-(33,8±6,9)-55,0 a | 8,5-(13,0±2,5)-16,7 ab | 3-(3)-7 | 0-(2)-3 |
| PT605 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 17,5-(33,0±6,9)-46,4 a | 10,4-(13,3±1,5)-16,3 a | 1-(4)-6 | 0-(0)-4 |
| PT612 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 22,6-(32,7±6,6)-49,1 ab | 8,9-(13,1±2,3)-17,2 ab | 2-(3)-6 | 0-(1)-3 |
| PT608 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 19,3-(32,3±7,9)-55,7 abc | 9,4-(12,7±1,7)-15,1 ab | 2-(3)-8 | 0-(1)-3 |
| PT585 | <i>A. alternata</i> | <i>Physalis sp.</i> | 20,7-(31,2±7,1)-51,2 abcd | 8,9-(12,7±1,7)-15,7 ab | 1-(3)-5 | 0-(1)-4 |
| PT627 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 22,0-(31,1±7,7)-52,6 abcd | 8,8-(12,5±1,9)-16,5 abc | 2-(3)-5 | 0-(1)-3 |
| PT622 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 21,7-(31,0±6,0)-43,9 abcd | 7,0-(13,0±2,5)-17,1 ab | 2-(3)-6 | 0-(1)-3 |
| PT579 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 19,0-(30,7±7,0)-46,1 abcd | 7,5-(10,9±2,4)-16,4 cde | 2-(3)-7 | 0-(1)-2 |
| PT616 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 20,1-(30,5±8,2)-47,8 abcd | 7,5-(11,6±1,9)-15,2 bcde | 1-(3)-6 | 0-(1)-3 |
| PT611 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 19,4-(30,0±5,5)-40,7 abcd | 8,2-(12,1±1,9)-15,7 abcde | 2-(3)-6 | 0-(0)-3 |
| PT600 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum aethiopicum</i> | 19,0-(29,3±6,1)-42,0 abcd | 8,3-(12,0±1,9)-16,9 abcde | 2-(3)-6 | 0-(2)-3 |
| PT574 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 21,4-(28,9±5,6)-41,7 abcd | 9,5-(12,5±1,6)-15,1 abcd | 2-(3)-4 | 0-(1)-2 |
| PT628 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 18,7-(28,8±5,2)-43,1 abcd | 8,5-(12,2±2,1)-16,5 abcde | 3-(3)-7 | 0-(1)-3 |
| PT587 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 21,8-(28,6±5,1)-43,1 abcd | 9,5-(13,1±2,0)-17,2 ab | 2-(3)-4 | 0-(1)-3 |
| PT575 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum frutescens</i> | 19,8-(27,4±5,2)-46,2 bcd | 7,8-(10,7±1,9)-14,7 e | 2-(3)-4 | 0-(0)-4 |
| PT621 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 20,0-(27,3±4,3)-36,1 bcd | 8,6-(13,0±2,3)-18,4 ab | 2-(3)-4 | 0-(1)-3 |
| PT604 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 18,4-(27,3±4,5)-37,2 bcd | 8,3-(10,7±1,7)-14,9 ab | 1-(3)-5 | 0-(1)-3 |
| PT620 | <i>A. alternata</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 20,7-(26,9±3,4)-32,7 cd | 7,7-(10,5±1,4)-13,8 e | 2-(3)-4 | 0-(0)-3 |
| PT589 | <i>A. alternata</i> | <i>Capsicum frutescens</i> | 18,4-(26,6±5,0)-37,2 d | 7,0-(10,5±1,3)-15,6 e | 1-(3)-6 | 0-(0)-3 |
| PT626 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 23,3-(54,3±16,5)-89,8 a | 8,2-(11,8±1,9)-15,5 bcd | 3-(7)-15 | 0-(0)-4 |
| PT625 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 20,4-(45,1±10,6)-68,4 b | 9,8-(12,9±1,9)-18,0 ab | 2-(5)-8 | 0-(1)-5 |
| PT623 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 18,6-(34,4±12,5)-56,5 c | 7,2-(10,8±2,1)-14,4 cdef | 2-(3)-8 | 0-(1)-4 |
| PT583 | <i>A. infectoria</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 19,4-(33,2±9,1)-54,8 cd | 6,7-(10,1±2,0)-16,1 efg | 3-(6)-7 | 0-(0)-3 |
| PT606 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 19,3-(31,1±9,1)-50,2 cd | 8,3-(10,6±1,6)-14,4 def | 1-(3)-8 | 0-(0)-2 |
| PT603 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 19,9-(30,8±5,7)-43,0 cd | 8,3-(11,5±1,6)-16,3 bcde | 3-(3)-7 | 0-(1)-4 |
| PT619 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 17,2-(26,9±7,0)-51,4 cde | 6,0-(10,0±1,9)-13,8 fg | 3-(3)-8 | 0-(0)-4 |
| PT601 | <i>A. infectoria</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 15,5-(21,5±3,7)-31,0 e | 7,0-(8,9±1,3)-12,1 g | 2-(3)-4 | 0-(0)-3 |
| PT580 | <i>A. arborescens</i> | <i>Capsicum annuum</i> | 17,3-(29,3±7,0)-44,9 | 8,4-(12,2±2,0)-16,0 | 1-(3)-5 | 0-(1)-4 |
| PT602 | <i>A. consortialis</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 18,3-(25,8±6,4)-39,7 | 11,3-(14,1±1,6)-17,8 | 1-(4)-5 | 0-(1)-2 |
| PT624 | <i>A. tenuissima</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | 22,8-(31,1±4,7)-39,3 | 9,7-(13,0±2,1)-18,1 | 2-(3)-5 | 0-(1)-3 |

* Os isolados das espécies *A. alternata* e *A. infectoria* com uma ou mais letras em comum não diferem significativamente, de acordo com Teste de Tukey com um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$). Os dados para o comprimento e a largura dos conídios são apresentados como "mínimo-(média±desvio padrão)-máximo.

** Os dados para o número de septos são apresentados como mínimo-(moda)-máximo

autores Andersen et al. (2002), Serdani et al. (2002) e Besadat et al. (2016) para *A. alternata*. Contudo, Landschoot et al. (2017), não registou ramificação para os isolados desta espécie e Dube (2014) registou para além de um número superior de septos presentes nos conidióforos primários, a formação de ramificação secundária e terciária a partir do bico dos esporos. O isolado PT615 formou frequentemente conidióforos secundários na zona apical dos conídios, por vezes, geniculados.

No que diz respeito a *A. infectoria* a divisão entre os isolados com origem em folha de tomateiro e com origem em folha de batateira, relativamente ao comprimento dos conídios, foi evidente (Quadro 10). Porém, os isolados PT626, PT625 e PT623 diferiram significativamente, mesmo tendo sido isolados a partir da mesma espécie hospedeira, tomateiro. Por outro lado, fora as diferenças entre os isolados de tomateiro, a média de comprimento dos conídios do isolado PT623 apenas se mostrou significativamente diferente da do isolado PT601, isolado da batateira.

Apesar da disparidade de valores de comprimento dos conídios, as médias da maioria dos isolados de *A. infectoria* não variam significativamente com os isolados *A. tenuissima* (PT624), *A. arborescens* (PT580) ou com o isolado de *A. consortialis* (PT602). Relativamente aos valores de largura dos conídios registou-se uma diferença de médias significativa entre o isolado *A. consortialis* (PT602) e os restantes isolados, excecção dos isolados *A. tenuissima* (PT624) e *A. infectoria* (PT625). Mais uma vez se verificou uma diferença significativa da média da largura dos conídios do isolado PT601 (*A. infectoria*) com os restantes isolados, excecção com o isolado PT619 (*A. infectoria*). A maioria dos isolados apresentou 3 septos transversais, sendo que os isolados *A. infectoria* PT626 e PT583 se destacaram por apresentarem valores de modas de 7 e 6 septos transversais, respetivamente. O número de septos longitudinais variou usualmente entre zero e um.

Para o isolado *A. arborescens* (PT580) obtiveram-se valores de comprimento dos conídios a variar entre 17,3 e 44,9 μm . Para este isolado foram registados valores para a largura entre 8,4 e 16,0 μm . Em meio PSA, Bessadat et al. (2014b) referiram um máximo de comprimento de 38,4 μm e um intervalo de valores de largura entre 3,2 e 12,8 μm . Outros autores referem menor variabilidade, tendo obtido valores de comprimento a variar entre 10,0 e 30,0 μm e valores de largura a variar entre 5,0 e 14,0 μm (Akhtar et al., 2014; Wenneker et al., 2018). Este isolado registou 1 a 5 septos transversais e até 4 septos longitudinais. De acordo com a bibliografia consultada os conídios desta espécie possuem entre 1 e 5 ou 6 septos transversais e até 3 septos longitudinais (Quadro 2).

O isolado *A. arborescens* apresentou conidióforos primários septados, médios a longos, com formação aérea e conídios em cadeias curtas, simples ou ramificadas, ocorrendo formação de conidióforos secundários curtos na zona apical do esporo. As características observadas estão de acordo com as descrições de Andersen et al. (2002) e Serdani (2002) para *A. arborescens*. Os conídios do isolado de *A. arborescens* mostraram-se com forma elipsoidal, ovóides ou ovóide-oblongos, castanhos a castanhos-escuro e muriformes (Fig. 6 D). Contrariando a bibliografia consultada, não se observaram esporos com bico afunilado que, por vezes, apresentavam uma tonalidade mais escura (Bessadat et al., 2014a). Contudo, as características observadas estão de acordo com as descrições de Andersen et al. (2002) e Serdani (2002) para esta espécie.

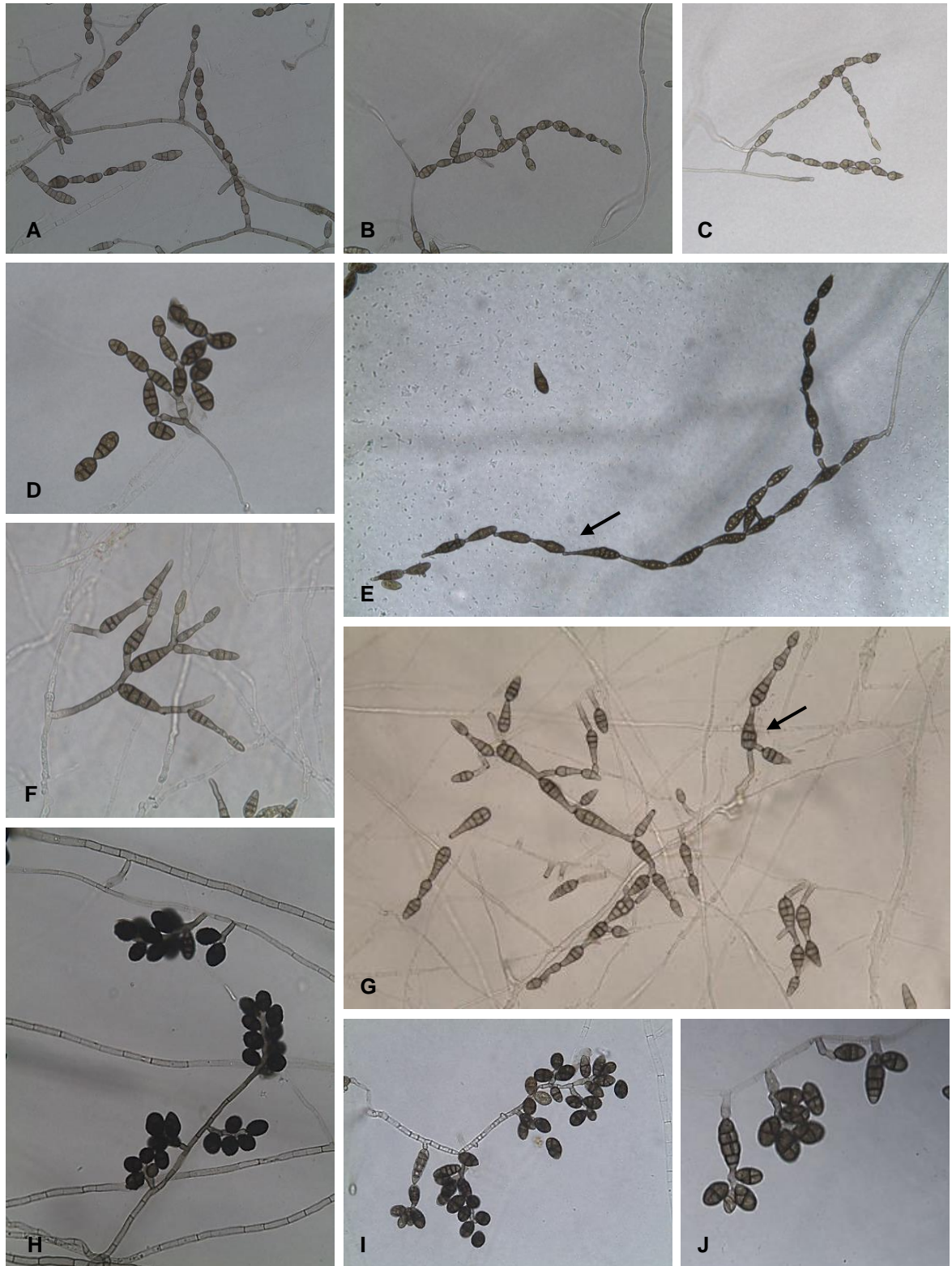


Fig. 6 – Fotografias do padrão de ramificação, conídios e conidióforos de *A. alternata* (A, B e C), *A. arborescens* (D), *A. tenuissima* (E), *A. infectoria* (F e G) e *A. consortialis* (H, I e J), obtidas a partir de colónias com 7 dias de crescimento em meio de cultura de gelose 1%, na obscuridade, a $25\pm 1^\circ\text{C}$. Nas fotografias identificadas como E e G estão evidenciadas características como a produção de conídios com bico no isolado identificado como *A. tenuissima* (PT624) e a formação lateral de um conidióforo secundário no isolado identificado como *A. infectoria*, respetivamente.

Para o isolado identificado como *A. tenuissima* (PT624) registaram-se valores de comprimento a variar entre 22,8 e 39,3 μm , um intervalo de valores mais restrito comparando com a bibliografia consultada, com intervalo de valores de comprimento entre 13,2 e 45,5 μm , em meio PDA, e 9,8 e 60,2 μm , em meio de cultura PSA. Para o mesmo isolado foram registados valores de largura entre 9,7 e 18,1 μm . Durand (2017) registou um valor mínimo para a largura dos conídios de 6,4 μm , em meio PDA, e os autores Lin et al.(2016) um máximo de 17,7 μm para o mesmo meio de cultura. Os conídios registaram 2 a 5 septos transversais e até 3 septos longitudinais. De acordo com os autores Bessadat et al. (2014b) e Durand (2017), os conídios de *A. tenuissima* possuem entre 1 a 9 septos transversais, contrariando outros autores como Lin et al. (2016) e Wee et al. (2016) que registaram um máximo de 4 septos transversais. Durand (2017) observou conídios com até 6 septos longitudinais, todavia, a maioria dos autores registou valores máximos de 1, 2 ou 3 septos longitudinais (Quadro 3). Por outro lado, os conídios surgiram castanhos a castanhos claro, elipsóidais, obclavados ou ovóides, muriformes e com formação ocasional de um bico (Fig. 6 E) . Estas características identificaram-se, na sua maioria, com a informação recolhida na bibliografia. Contudo, Durand (2017) não registou a ocorrência de bicos nos conídios do isolado estudado, contrariamente aos autores Đisalov et al. (2015). Adicionalmente, os autores Bessadat et al. (2014a), registaram a formação de conídios com as paredes verrugosas, em meio de cultura PSA.

No isolado em estudo, os conidióforos primários apresentaram-se médios a longos, conídios em cadeias longas com um baixo grau de ramificação formando cadeias aéreas. Conidióforos secundários formaram-se, por vezes, a partir do corpo dos primeiros conídios da cadeia formando ramificações com até 3 a 5 conídios secundários (Fig. 6 .E). Lin et al. (2016) e Wee et al (2016) registaram a formação de cadeias com até 12 e 17 conídios, respetivamente, em meio PDA. Durand (2017) verificou a formação de cadeias não ramificadas mais curtas, com até 10 conídios, formadas a partir de um conidióforo simples e geralmente curto. Adicionalmente, certos autores registaram também um baixo grau de ramificação secundária que se estendeu a um máximo de 4 conídios secundários (Lin et al., 2016; Vakalounakis et al., 2016; Wee et al., 2016). Serdani (2002) e Rahimloo et al. (2015), registaram a formação de conidióforos primários para a espécie *A. tenuissima* diretamente à superfície do meio de cultura.

Os isolados identificados como *A. infectoria* registaram valores de comprimento dos conídios entre 15,5 e 89,8 μm . Os isolados PT626 e PT625 mostraram valores médios de comprimento de 54,3 μm e 45,1 μm , diferindo significativamente dos restantes isolados identificados como *A. infectoria*, sendo que as restantes médias variaram entre 21,5 e 34,4 μm . Foram obtidos valores de largura entre 6,0 e 18,0 μm , com médias a variar entre 8,9 e 12,9 μm (Quadro 10). Outros autores referiram um intervalo de valores mais restrito, com o comprimento a variar entre 30,0 e 45,0 μm (Rahimloo et al., 2015) e a largura apenas entre 3,0 e 8,0 μm (Rodríguez-Roa et al., 2013). Durand (2017) apresentou uma maior variabilidade de valores, com o comprimento dos conídios a variar entre 12,0 e 78,8 μm e largura entre 10,6 e 24,8 μm , em meio de cultura PDA. O número de septos dos esporos dos isolados de *A. infectoria* variou entre 1 a 15 septos transversais, com moda frequente de 3 septos transversais e até 5 septos longitudinais, com moda zero. De acordo com a bibliografia consultada, os autores registaram um valor

mínimo de 3 e um máximo de 11 septos transversais e até 6 septos longitudinais (Quadro 4).

Os isolados de *A. infectoria* desenvolveram conidióforos primários curtos, cadeias de conídios castanhos que se mostraram elipsoidais, ovóides longos ou obclavados, com extensa ramificação formando cadeias com até 9 conídios. Ocorreu, geralmente, formação de um conidióforo secundário longo e septado, por vezes geniculado, na extremidade dos conídios (Fig. 6 F-G). Em conformidade com o descrito pelos autores Andersen et al. (1996), também neste isolado ocorreu a formação ocasional de conidióforos secundários a partir do corpo do esporo (Fig. 6 G). Rahimloo et al. (2015), descreveram a espécie *A. infectoria* como produtora de conídios em cadeias ramificadas curtas.

O isolado identificado como *A. consortialis* (PT602) obteve valores de comprimento dos conídios a variar entre 18,3 e 39,7 μm . Para o mesmo isolado foram registados valores de largura entre 11,3 e 17,8 μm . A bibliografia consultada registou valores de comprimento entre 14,0 e 40,0 μm e um intervalo de valores para a largura menos restrito, entre 7,0 e 21,0 μm (Lawrence et al., 2016). Verificou-se a presença de um máximo de 5 septos transversais e 2 septos longitudinais ou oblíquos. De acordo com Runa et al. (2009) o isolado de *A. consortialis* possui commumente mais de 4 septos transversais.

O isolado *A. consortialis* produziu conidióforos primários curtos e conídios solitários castanho a castanho-escuro de forma ovóide ou elipsoidal apresentando-se, por vezes, verrugosos (Fig. 6 H-J). A bibliografia descreve nesta espécie conídios obovóides e sem bico, solidários, formados a partir de conidióforos curtos ou em cadeia existindo a possibilidade de formação de conidióforos secundários na extremidade dos esporos, em meio de cultura PCA (Bessadat et al., 2016).

4.3 Caracterização molecular

No decurso do presente trabalho procedeu-se à extracção de DNA, amplificação e sequenciação da região ITS do DNA ribossomal dos 30 isolados estudados, de 29 isolados para o caso do fragmento da proteína TEF1- α e de 27 isolados para o caso da região KOG1058.

As sequências obtidas foram editadas e submetidas, através da ferramenta BLASTn, a confronto com a base de dados pública NCBI para identificação à espécie dos isolados em causa (Quadro 11).

Após a edição e alinhamento das sequências obtidas, foi executada uma análise filogenética tendo-se incluído nessa análise diversas sequências de referência depositadas na base de dados do NCBI para a elaboração das respetivas árvores filogenéticas.

4.3.1 Sequenciação de fragmentos da região ITS do DNA ribossomal

O confronto das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA obtidas para os isolados identificados como *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. consortialis*, *A. infectoria* (= *Lewia infectoria*) e *A. tenuissima* com a base de dados pública NCBI, confirmou a identidade dos mesmos.

Quadro 11– Lista de isolados para os quais se obtiveram sequências das regiões ITS do DNA ribossomal, para o gene da proteína TEF1- α e para a região KOG1058, com a respectiva identificação com base nas características morfológicas e por confronto com a base de dados pública NCBI, com recurso à ferramenta BLASTn

| Código Isolado | Espécie | Identificação Molecular (BLAST) | | | | | |
|----------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | | ITS ^(a) | Homol. ^(b) | EF1- α ^(a) | Homol. ^(b) | KOG1058 ^(a) | Homol. ^(b) |
| PT574 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT575 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 98 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT579 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 98 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT580 | <i>A. arborescens</i> | <i>A. arborescens</i> | 99 | <i>A. arborescens</i> | 99 | <i>A. arborescens</i> | 99 |
| PT583 | <i>A. infectoria</i> | <i>A. infectoria</i> | 99 | <i>Lewia infectoria</i> | 97 | <i>A. alternata</i> | 87 |
| PT585 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 98 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT587 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 100 | <i>A. alternata</i> | 98 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT589 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 98 | <i>A. alternata</i> | 100 | <i>A. alternata</i> | 98 |
| PT600 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT601 | <i>A. infectoria</i> | <i>A. infectoria</i> | 99 | <i>Lewia infectoria</i> | 97 | (c) | |
| PT602 | <i>A. consortiale</i> | <i>A. consortiale</i> | 99 | (c) | | (c) | |
| PT603 | <i>A. infectoria</i> | <i>A. infectoria</i> | 99 | <i>Lewia infectoria</i> | 98 | <i>A. alternata</i> | 87 |
| PT604 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 100 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT605 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 100 | <i>A. alternata</i> | 100 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT606 | <i>A. infectoria</i> | <i>A. infectoria</i> | 99 | <i>Lewia infectoria</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 87 |
| PT608 | <i>A. alternata</i> | (c) | | <i>A. alternata</i> | 98 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT611 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 98 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT612 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT615 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 97 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT616 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 100 | <i>A. alternata</i> | 100 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT619 | <i>A. infectoria</i> | <i>A. infectoria</i> | 99 | <i>Lewia infectoria</i> | 98 | <i>A. alternata</i> | 87 |
| PT620 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT621 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 100 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT622 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 100 | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT623 | <i>A. infectoria</i> | <i>A. infectoria</i> | 99 | <i>Lewiz infectoria</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 87 |
| PT624 | <i>A. tenuissima</i> | <i>A. tenuissima</i> | 99 | <i>A. tenuissima</i> | 99 | (c) | |
| PT625 | <i>A. infectoria</i> | <i>A. infectoria</i> | 99 | <i>Lewia infectoria</i> | 100 | <i>A. alternata</i> | 87 |
| PT626 | <i>A. infectoria</i> | <i>A. infectoria</i> | 99 | <i>Lewia infectoria</i> | 97 | <i>A. alternata</i> | 87 |
| PT627 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 |
| PT628 | <i>A. alternata</i> | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 | <i>A. alternata</i> | 99 |

(a) Identificação molecular por confronto com a base de dados NCBI, com recurso à ferramenta BLASTn; (b) Homologia expressa em % segundo a identificação fornecida pela base de dados NCBI; (c) a região em causa não foi sequenciada para o isolado.

No Anexo 4 apresenta-se o alinhamento das 63 sequências nucleotídicas utilizadas na análise filogenética (total de 437 pb após eliminação de *gaps*).

Os resultados da análise filogenética (Fig. 7) mostram uma separação significativa entre dois grupos. O grupo maior é composto pelos isolados filogeneticamente próximos de *A. alternata*, pelos isolados de *A. consortialis* e ainda a sequência referência de *A. solani*, sendo suportado por um valor de *bootstrap* de 54%. O segundo grupo (93% de *bootstrap*) é constituído pelos isolados que agruparam com as sequências referência de *A. infectoria*. Já os isolados PT574 e PT587 (*A. alternata*) agruparam separados dos restantes (98% de *bootstrap*).

Os resultados obtidos mostraram-se idênticos aos de Woudenberg et al. (2013 & 2015), não tendo sido possível discriminar entre *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. gaisen* e *A. tenuissima*, espécies pertencentes à secção *Alternata*. Da mesma forma, as sequências de *A. consortialis* e de *A. solani* agruparam separadas entre si e dos demais isolados, constituindo dois grupos mais próximos filogeneticamente da secção *Alternata* do que da *Infectoriae*.

4.3.2 Sequenciação de fragmentos do gene TEF-1 α e da região KOG1058

O confronto das sequências nucleotídicas de fragmentos do gene TEF-1 α e da região KOG1058 obtidas para os isolados identificados como *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. consortialis*, *A. infectoria* (= *Lewia infectoria*) e *A. tenuissima* com a base de dados pública NCBI, confirmou a identidade dos mesmos.

No Anexo 5 apresenta-se o alinhamento das sequências nucleotídicas utilizadas na análise filogenética de fragmentos do gene TEF-1 α e da região KOG1058 com um total de 209 pb e de 863 pb, respetivamente, após eliminação de *gaps*.

Os dados da sequenciação para o gene TEF1- α (Fig. 8) permitiram, à semelhança do observado para a região ITS, a separação entre os isolados pertencentes às secções *Alternata* e *Infectoriae*, não sendo possível discriminar entre isolados dentro da primeira secção. Tal como se verificou para a análise da região ITS, os isolados de *A. consortialis* e de *A. solani* agruparam separados entre si e dos isolados de *A. alternata*, ainda que com baixo valor de *bootstrap*.

Os resultados da análise filogenética das sequências nucleotídicas da região KOG1058 não diferiram dos resultados obtidos para as duas regiões anteriores (Fig. 9). Apesar de não se terem incluído na análise sequências de referência de *A. infectoria*, por não se encontrarem disponíveis nas bases de dados, os isolados que morfologicamente apresentaram características coerentes com as daquela espécie, e que nas análises filogenéticas anteriores agruparam com sequências da secção *Infectoriae*, constituem um grupo à parte dos isolados colocados na secção *Alternata* de Woudenberg et al. (2013 & 2015). No grupo onde se encontraram os isolados de *A. alternata* foi possível observar uma maior variabilidade quando comparado com as análises filogenéticas para as regiões ITS e TEF-1 α . Assim, por exemplo, os isolados PT627 e PT628 parecem mais próximos de *A. arborescens* do que das restantes referências de *A. alternata* utilizadas. Segundo Woudenberg et al. (2015), a região KOG1058 do DNA, sendo uma região pouco conservada, permitirá discriminar entre espécies da secção *Alternata*. Neste estudo não foi possível confirmar tal poder discriminante.

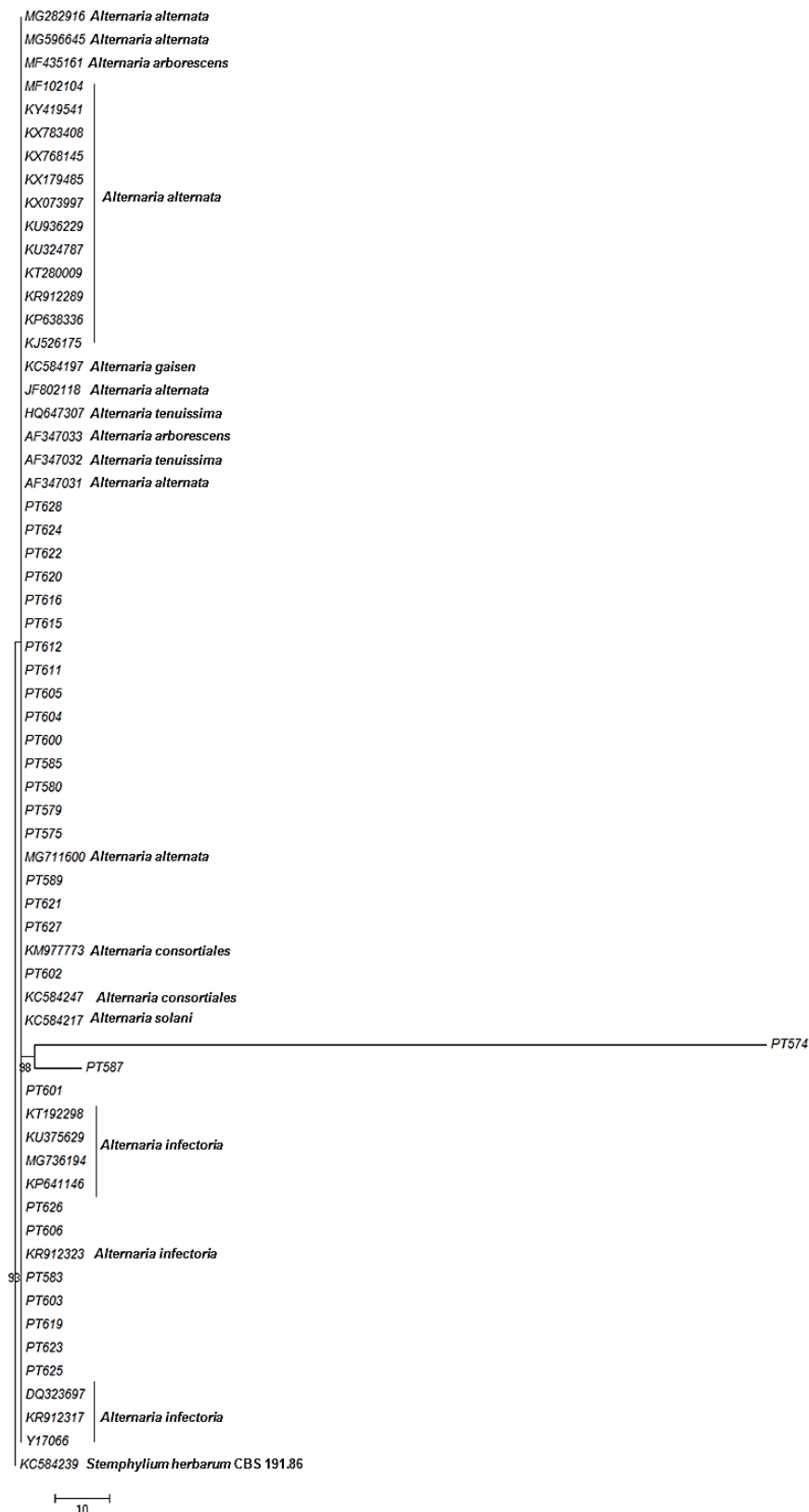


Fig. 7 - Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas da região ITS do DNA ribossomal para isolados de *Alternaria* spp., obtido através do agrupamento por *Maximum Likelihood method*; foram utilizadas 1000 *bootstraps* e matrizes de distância de acordo com o modelo Jukes-Cantor; em cada nó, os valores apresentados representam o respectivo valor de *bootstrap* (valores superiores a 50 %); sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de *Stemphylium herbarum* foi utilizada como *outgroup*.



Fig. 8 - Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas de fragmentos do gene TEf-1 α para isolados de *Alternaria* spp., obtido através do agrupamento por *Maximum Likelihood method*; foram utilizadas 1000 *bootstraps* e matrizes de distância de acordo com o modelo evolutivo Kimura 2; em cada nó os valores apresentados representam o respectivo valor de *bootstrap* (valores superiores a 50 %); sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respectiva referência; a sequência de *Stemphylium herbarum* foi utilizada como *outgroup*.

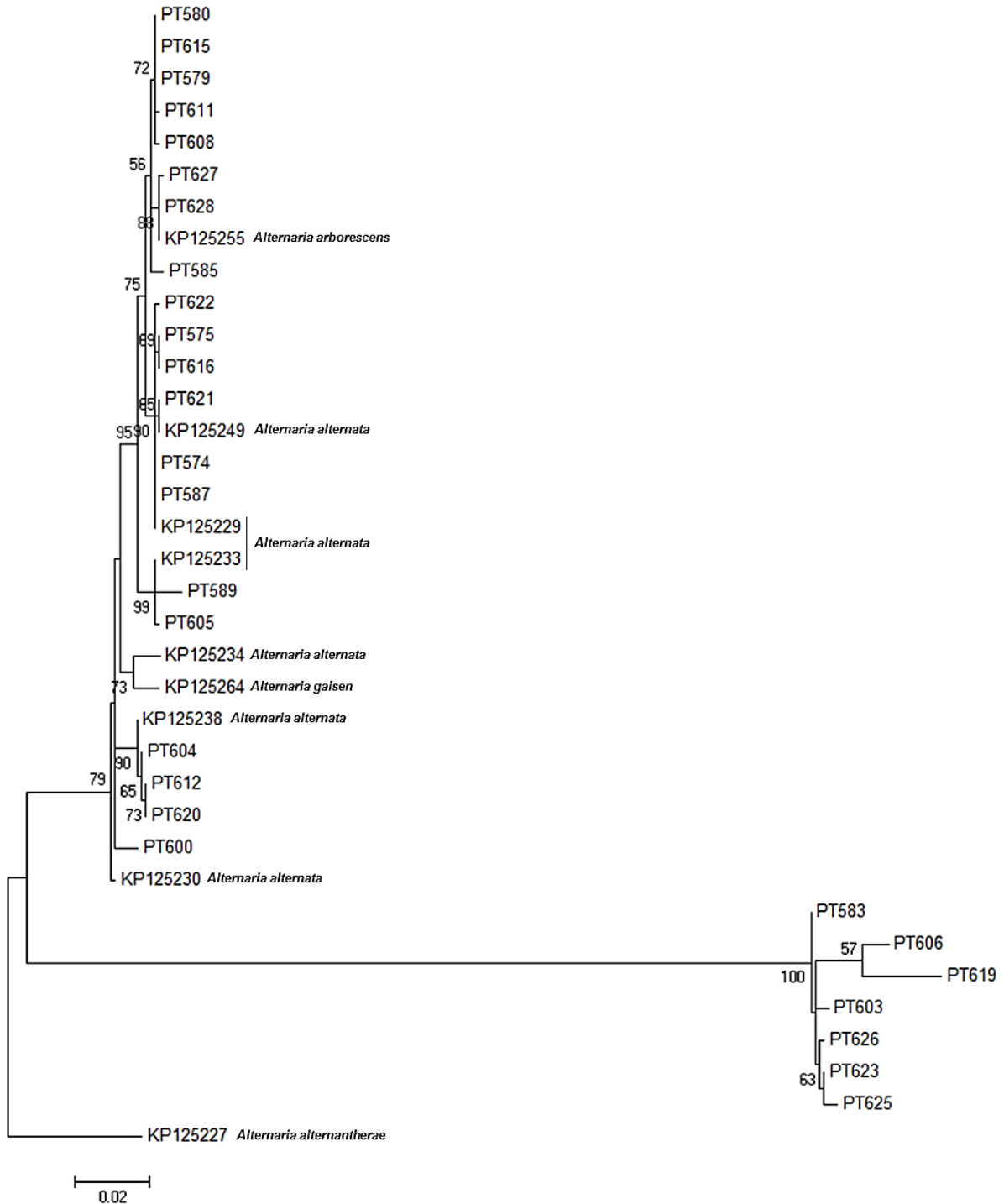


Fig. 9 - Dendrograma consenso resultante da análise das sequências nucleotídicas de fragmentos da região KOG1058 para isolados de *Alternaria* spp., obtido através do agrupamento por *Maximum Likelihood method*; foram utilizadas 1000 *bootstraps* e matrizes de distância de acordo com o modelo evolutivo Kimura 2 (+G); em cada nó os valores apresentados representam o respetivo valor de *bootstrap* (valores superiores a 50 %); sequências obtidas de base de dados são identificadas com a respetiva referência; a sequência de *Alternaria alternantherae* foi utilizada como *outgroup*.

4.4 Estudos de patogenicidade e virulência dos isolados de *Alternaria* spp.

Como resultado das inoculações dos discos de folhas de malagueta, pimento, fisális, jiló, tomateiro e batateira obteve-se uma escala de severidade com os valores 0, 1, 2, 3, 4 e 5 de acordo com o grau de doença observado nos discos sete dias após a inoculação (Quadro 5), o qual permitiu obter para os 30 isolados os Índices de Doença quando inoculados no seu hospedeiro de origem, no tomateiro e na batateira (Quadro 12).

Como referido anteriormente, apenas as folhas de tomateiro utilizadas neste estudo e as folhas de batateira utilizadas na primeira série de inoculações, provieram na totalidade de plantas produzidas na estufa do ISA. O restante material vegetal teve origem numa quinta em Alcochete. Por conseguinte, apesar da utilização de material vegetal assintomático, em muitos casos ocorreu o aparecimento de esporos de *Alternaria* na testemunha. Nestes casos, sempre que possível, concluiu-se sobre o grau de doença tendo em consideração a proximidade das estruturas das espécies de *Alternaria* ao local de inoculação e o seu padrão de esporulação, dada ser esta a característica morfológica com maior poder discriminativo entre as espécies sob análise. Todavia, a primeira série de inoculações em folhas de pimenteiro ficou inviabilizada, dada a impossibilidade de distinção das espécies de *Alternaria* tornando os resultados inconclusivos.

Pela análise do Quadro 12 verificou-se que os dois isolados obtidos de malagueta (*A. alternata* PT575 e PT589) originaram ID de 26% e 24% no hospedeiro de origem e que dos seis isolados obtidos do pimento, quatro (*A. alternata* PT574, PT579 e PT587 e *A. arborescens* PT580) não originaram sintomas nos discos de folhas deste hospedeiro, tendo o isolado de *A. infectoria* (PT583) e o isolado PT587 de *A. alternata* induzido um ID de 6%. Para o isolado PT600 (*A. alternata* proveniente do jiló) o ID foi de 41% na inoculação de discos de folhas desta solanácea e para o isolado PT585 (*A. alternata* proveniente de fisális) não houve sintomas de doença. Apesar dos valores de ID obtidos para alguns dos isolados estudados serem superior a 0%, os resultados não permitem garantir a patogenicidade dos isolados dessas espécies de *Alternaria*, obtidos a partir de *C. annuum*, *C. frutescens*, *P. peruviana* e *S. aethiopicum*, apesar de existirem estudos que mostram que *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. infectoria* têm sido isoladas em folhas de solanáceas (Bessadat et al., 2016; Kokaeva et al., 2017) e que isolados dessas espécies têm capacidade para provocar infeção em várias espécies desta família botânica (Bessadat et al., 2014a, 2014b, 2016; Dube, 2014).

De notar que nas inoculações dos discos das folhas de batateira e do tomateiro, os mesmos isolados originaram valores de ID que variaram entre 62 e 100%, nas folhas da batateira, e entre 2 e 41%, nas folhas de tomateiro.

As inoculações em discos de folha de batateira dos isolados de *A. alternata* obtidos a partir deste hospedeiro (PT604, PT605 e PT608) revelaram-se menos virulentos, com valores de ID entre 33 e 60%, que os isolados da mesma espécie obtidos a partir de tomateiro, com valores de ID geralmente superiores a 50%, com o isolado PT620 a produzir um índice de 70%.

As inoculações em discos de folha de tomateiro dos isolados de *A. alternata* obtidos a partir deste hospedeiro, nomeadamente os isolados PT612, PT620 e PT621, revalaram-se mais virulentos, com valores de ID de 21%, 15% e 50% respetivamente. Para os restantes isolados (*A. alternata* PT611, PT616, PT622, PT627 e PT628) e para os isolados provenientes de batateira (PT604, PT606 e PT608) não se conseguiu provar a patogenicidade dado que o ID se mostraram inferior a 10%.

Os isolados das espécies *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. infectoria*, provenientes de pimenteiro e malagueta, mostraram-se mais virulentos em tomateiro e batateira que nos hospedeiros de origem e que os outros isolados destas espécies, obtidos a partir de tomateiro e batateira. O isolado PT583 foi de entre os isolados da espécie *A. infectoria* que se mostrou virulento em tomateiro e batateira. gerando um ID de 23% e de 80%, respetivamente. Os restantes isolados desta espécie provocaram ID menos significativos em batateira, com um máximo de 32% (PT623 proveniente de tomateiro), e em tomateiro, com um ID máximo de apenas 8% (PT603 proveniente de batateira). O isolado PT580 (*A. arborescens*) provocou um ID de 92% e de 29%, em batateira e em tomateiro. Já a espécie *A. consortialis*, mostrou-se patogénica para o hospedeiro de origem, provocando um ID de 46% em batateira, no entanto, apesar de na bibliografia ter sido associada ao tomateiro (Bessadat et al. 2016), neste hospedeiro revelou um ID pouco relevante (ID=11%).

Pela análise do Quadro 12, a diferença de patogenicidade e virulência entre isolados da mesma espécie é evidente, nomeadamente, entre os isolados de *A. alternata*.

No entanto, todos os isolados, independentemente da espécie e do hospedeiro de origem, mostraram-se mais virulentos em batateira que em qualquer outro hospedeiro inoculado. Estes resultados podem estar estreitamente associados à maior senescência observada nos discos de batateira e ao facto de em laboratório se inocular os discos de folhas com uma suspensão de conídios com um concentração superior à encontrada na natureza.

Por outro lado, o fator da idade das plantas, cujo influencia diretamente a sua suscetibilidade, é contrariado com os resultados deste teste uma vez que, de acordo com a bibliografia consultada, a batateira possui um pico de menor suscetibilidade a alternariose nas primeiras fases de crescimento.

Quadro 12– Índice de doença (%) dos isolados de *Alternaria* estudados nos diferentes hospedeiros inoculados, calculados com base na escala de severidade proposta em Materiais e Métodos.

| Isolado | Hospedeiro de origem | Espécie | Índice de doença (%) | | | | | |
|---------|-----------------------------|------------------------|----------------------|-----------|----------|---------|------|-----------|
| | | | Bataeira | Tomateiro | Pimento* | Fisális | Jiló | Malagueta |
| PT575 | <i>Capsicum frutescens</i> | <i>A. alternata</i> | 62 | 41 | - | - | - | 26 |
| PT589 | <i>Capsicum frutescens</i> | <i>A. alternata</i> | 100 | 17 | - | - | - | 24 |
| PT574 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | 98 | 2 | 0 | - | - | - |
| PT579 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | 100 | 26 | 0 | - | - | - |
| PT580 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. arborescens</i> | 92 | 29 | 0 | - | - | - |
| PT583 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. infectoria</i> | 80 | 23 | 6 | - | - | - |
| PT587 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | 92 | 27 | 6 | - | - | - |
| PT615 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | 100 | 22 | 0 | - | - | - |
| PT585 | <i>Physalis peruviana</i> | <i>A. alternata</i> | 92 | 17 | - | 0 | - | - |
| PT600 | <i>Solanum aethiopicum</i> | <i>A. alternata</i> | 92 | 9 | - | - | 41 | - |
| PT611 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 62 | 7 | - | - | - | - |
| PT612 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 64 | 21 | - | - | - | - |
| PT616 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 57 | 7 | - | - | - | - |
| PT620 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 70 | 15 | - | - | - | - |
| PT621 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 29 | 50 | - | - | - | - |
| PT622 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 54 | 6 | - | - | - | - |
| PT623 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. infectoria</i> | 32 | 1 | - | - | - | - |
| PT624 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. tenuissima</i> | 60 | 1 | - | - | - | - |
| PT625 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. infectoria</i> | 18 | 0 | - | - | - | - |
| PT626 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. infectoria</i> | 12 | 0 | - | - | - | - |
| PT627 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 56 | 11 | - | - | - | - |
| PT628 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 50 | 10 | - | - | - | - |
| PT601 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | 30 | 6 | - | - | - | - |
| PT602 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. consortialis</i> | 46 | 11 | - | - | - | - |
| PT603 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | 29 | 8 | - | - | - | - |
| PT604 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. alternata</i> | 60 | 1 | - | - | - | - |
| PT605 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. alternata</i> | 47 | 9 | - | - | - | - |
| PT606 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | 3 | 2 | - | - | - | - |
| PT608 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. alternata</i> | 33 | 3 | - | - | - | - |
| PT619 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | 28 | 0 | - | - | - | - |

*valores calculados apenas com os resultados da segunda série de inoculações

Pela análise do Quadro 13, verifica-se que as espécies *A. tenuissima* e *A. infectoria*, bem como *A. consortialis*, mostraram-se nada ou pouco virulentas em tomateiro e que, para este hospedeiro, os maiores valores de patogenicidade foram registados para a espécie *A. arborescens* (29%). No entanto, apesar desta espécie se encontrar associada a tomateiro na bibliografia, para além de ter sido isolada a partir do pimenteiro (ID=41%) mostrou-se altamente virulenta em folhas de batateira, com um índice superior a 90%. Assim, o isolado *A. arborescens* (PT580 proveniente de pimenteiro) mostra-se mais virulento em batateira que a espécie *A. alternata*, cuja gerou um ID de 70,3%.

A espécie *A. alternata* também se mostrou virulenta em jiló e malagueta, com valores de ID de 41% e 25%.

Quadro 13 – Índice de doença (%) de cada espécie de *Alternaria* no hospedeiro de origem, em batateira e em tomateiro, calculados com base na escala de severidade proposta em Materiais e Métodos.

| Espécie | Índice de doença (%)* | | | | | |
|------------------------|-----------------------|-----------|-----------|---------|----------|-----------|
| | Batateira | Tomateiro | Pimento** | Fisális | Jiló | Malagueta |
| <i>A. alternata</i> | 70,3±1,6 | 16,3±1,5 | 1,2±0,2 | 0,0±0,0 | 41,0±1,7 | 25,0±2,0 |
| <i>A. infectoria</i> | 29,0±1,4 | 5,0±0,8 | 6,0±0,5 | - | - | - |
| <i>A. arborescens</i> | 92,0±0,9 | 29,0±1,6 | 0,0±0,0 | - | - | - |
| <i>A. tenuissima</i> | 60,0±1,6 | 1,0±0,2 | - | - | - | - |
| <i>A. consortialis</i> | 46,0±1,0 | 11±0,5 | - | - | - | - |

*os resultados estão apresentados sob a forma de (média ponderada±desvio padrão ponderados);**valores calculados apenas com os resultados da segunda série de inoculações;

Não foi feito nenhum ensaio para avaliar a produção e/ou ação de enzimas específicas ou não específicas na patogenicidade e virulência. Nos discos de folhas inoculados não se verificaram sintomas que indiquem a proliferação de toxinas, nomeadamente a formação de halos cleróticos em torno da zona de inoculação. No entanto, os casos em que as espécies de *Alternaria* não se mostraram patogénicas nos hospedeiros de origem e que se mostram virulentos noutros hospedeiros, sugerem que tenham capacidade para atuar como saprófitas ou agentes patogénicos fracos.

5 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS

Da prospeção realizada em distintos campo de cultura e estufas de produção de solanáceas, nomeadamente produção de tomate, nas regiões do Ribatejo e Oeste de Portugal, compôs-se uma coleção com 30 isolados de *Alternaria* spp., dos quais 12 foram obtidos a partir de tomateiro, oito de batateira, seis isolados provieram de pimenteiro, dois de malagueta, um de fisális e, por fim, um isolado de jiló.

A avaliação morfocultural dos isolados, como as características das suas colónias e o estudo da morfologia e biometria dos esporos em cruzamento com o padrão de esporulação, permitiram diferenciar as espécies *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* e *A. consortialis*.

Os resultados da sequenciação para a região ITS do DNA ribossomal e para os fragmentos do gene TEF1- α mostraram-se de acordo com as identificações obtidas através da caracterização morfocultural dos isolados, nomeadamente na diferenciação dos isolados de *A. infectoria* dos isolados da secção *Alternata*. No entanto, mostraram-se insuficientes para a distinção de espécies dentro desta secção, entre as espécies *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. tenuissima*. Os resultados de sequenciação da região KOG1058, não diferiram dos resultados obtidos para as duas regiões anteriores.

O cruzamento da avaliação das características morfoculturais e da biologia molecular permiti concluir que as espécies da coleção pertenciam maioritariamente à espécie *A. alternata*, contribuindo com 60% da totalidade dos isolados estudados (19 isolados). Obtiveram-se ainda oito isolados de *A. infectoria*, um isolado de *A. arborescens* proveniente de pimenteiro, um isolado de *A. tenuissima*, de tomateiro, e um isolado de *A. consortialis*, de batateira. Confirmou-se, assim, a diversidade da população de fungos do género *Alternaria* associados a solanáceas. De referir, no entanto, que a espécie *A. arborescens* apenas foi isolada em pimenteiro apesar de se encontrar na bibliografia frequentemente associada a tomateiro.

O índice de doença nos testes de patogenicidade e virulência variou com a espécie e o hospedeiro inoculado, sendo que todos os isolados da coleção foram inoculados nos hospedeiros de origem, em folha de tomateiro e em folha de batateira. Os isolados obidos a partir de malagueta, pimento, fisális e jiló foram responsáveis por índices de doença mais elevados, para as espécies *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. infectoria*, em tomateiro e batateira, que isolados provenientes destes hospedeiros. Nomeadamente, isolados de *A. alternata* não se mostraram patogénicos em pimenteiro, hospedeiro de origem, e mostraram-se muito virulentos em batateira com ID de 92% e 100%. Para o isolado *A. tenuissima* registaram-se valores de ID de 60% e de 1%, em batateira e tomateiro, respetivamente. Similarmente, o isolado *A. consortialis* mostrou-se mais virulento em batateira, provocando um ID de 46% e de apenas 11% em tomateiro.

O presente trabalho revelou existir diversidade de fungos do género *Alternaria* associados a solanáceas ainda pouco caracterizada e estudada. O papel destes fungos na sanidade das culturas que afetam está também insuficientemente esclarecida. Desta forma, e dada a importância de algumas destas culturas

para a agricultura do nosso país, há todo o interesse em aprofundar o tema da alternariose em solanáceas: as prospeções deverão ser estendidas a maiores áreas e sistemas culturais; o papel das infestantes como repositório de inóculo de *Alternaria* spp. deverá também ser avaliado e a caracterização morfológica e molecular dos isolados deverá ser otimizada, nomeadamente recorrendo a outros caracteres e genes; por fim, a patogenicidade dos isolados deve ser estudada, nomeadamente em condições de cultura de forma a se verificar a validade e praticabilidade dos resultados obtidos.

6 LISTA DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, P., Oh, Y., Panthee, D.R. 2017. Current status of early blight resistance in tomato: An update. *International Journal of Molecular Science* 18, 22.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*, 5th ed. Academic Press, New York, USA.
- Akhtar, N., Bashir, U., Mushtaq, S. 2014. First Report of Leaf Spot of Rice Caused by *Alternaria arborescens* in Pakistan. *Plant Disease* 98, 846 pp
- Ali, A., Akhtar, N., Mirza, J.H., Bajwa, R. 2006. Addition to micromycetes of Lahore , Pakistan. *Mycopath* 4: 17–25.
- Almeida, D. 2006. *Manual de culturas hortícolas* (I). 1^a ed. Editorial Presença, Lisboa, Portugal, 346 pp.
- Alvarenga, T., Ribeiro, S., Souza, E., Pereira, F., Pinto, C. 2016. Characterization of *Alternaria* isolates and reaction of potato genotypes to early blight. *Ciência Rural* 46: 1783–1789.
- Andersen, B., Hollensted, M. 2008. Metabolite production by different *Ulocladium* species. *International Journal of Food Microbiology* 126: 172–179.
- Andersen, B., Kroger, E., Roberts, G. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research* 106: 170– 182.
- Andersen, B., Thrane, U. 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 685–689.
- Armitage, A.D., Barbara, D.J., Harrison, R.J., Lane, C.R., Sreenivasaprasad, S., Woodhall, J.W., Clarkson, J.P. 2015. Discrete lineages within *Alternaria alternata* species group: Identification using new highly variable *loci* and support from morphological characters. *Fungal Biology* 119: 994–1006.
- Bannon, J.S. 1988. CASSTTM herbicide (*Alternaria crassiae*): a case history of a mycoherbicide. *American Journal of Alternative Agriculture* 3: 73–76.
- Barnett, H.L., Hunter, B.B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4th ed., APS Press, Minnesota, USA, 218 pp.
- Basu, P.K. 1974. Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomato cultivars. *Canadian Plant Disease Survey* 54: 45–51.
- Bessadat, N., Benichou, S., Kihal, M., Henni, D.E. 2014a. Aggressiveness and morphological variability of small spore *Alternaria* species isolated from Algeria. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Science* 2: 265–278.
- Bessadat, N., Berruyer, R., Hamon, B., Bataille-Simoneau, N., Benichou, S., Kihal, M., Henni, D.E., Simoneau, P. 2016. *Alternaria* species associated with early blight epidemics on tomato and other *Solanaceae* crops in northwestern Algeria. *European Journal of Plant Pathology* 148: 181–197.
- Bessadat, N., Simoneau, P., Benichou, S., Setti, B., Kihal, M., Henni, D.E. 2014b. Morphological, physiological and pathogenic variability of small-spore *Alternaria* sp. causing leaf blight of solanaceous plants in Algeria. *African Journal of Agricultural Research* 8.
- Carbone, I., M. Kohn, L. 1999. A method for designing primer for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.

- Chohan, S., Perveen, R., Mehmood, M.A., Naz, S., Akram, N., 2015. Morpho-physiological studies, management and screening of tomato germplasm against *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight. *International Journal of Agriculture and Biology* 17: 111–118.
- Chou, H.H., Wu, W.S. 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research* 106: 164–169.
- D'Arcy, W.G., 1991. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography *In* Eds. Hawkes, J.G., Lester, R.N., Nee, M., Estrada, N., *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew, London, pp. 75–137.
- Damicone, J., Brandenberger, L. 2007. Common diseases of tomatoes. Oklahoma Coop. Ext. Serv. Epp7625.
- DeDecker, J., 2012. Brown leaf spot in potatoes: Plan for this early blight look-alike in 2013. Michigan state University Extension. Disponível em: <http://www.msue.msu.edu> (Acedido a 14/07/2018)
- Devappa, V., Thejakumar, M.B. 2016. Morphological and physiological studies of *Alternaria alternata* causing leaf spot disease of Chilli (*Capsicum annuum* L.). *International Journal os Applied and Pure Science and Agriculture* 2: 26–30.
- Devi, S., Kumar, H.A.K., Ramachandran, G., Subramanian, C., Karuppan, P. 2014. Growth and mass spectrometry profile af *Alternaria alternata* pigment grown in maize grain extract. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science* 4: 179–184.
- Đisalov, J., Bodroža-Solarov, M., Bagi, F., Petrović, K., Čulafić, J., Bočarov-Stančić, A., Brlek, T. 2015. First report of *Alternaria tenuissima* and *Alternaria infectoria* on organic spelt wheat in Serbia. *Plant Disease* 99: 1647.
- Droby, S., Dinooor, A., Prusky, D., Barkai-Golan, R., 1984. Pathogenicity of *Alternaria alternata* in potato in Israel. *Phytopathology* 74: 537–542.
- Dube, J.P., 2014. Characterization of *Alternaria alternata* isolates causing brown spot of potatoes in South Africa. MSc Thesis, University of Pretoria, Petroria, Africa do Sul.
- Durand, A.M.A. da S. 2017. Alternariose em couve-brócolo no Ribatejo e Oeste. Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal
- Elansky, S.N., Pobedinskaya, M.A., Kokaeva, L.Y., Statyuk, N. V., Alexandrova, A. V. 2012. Molecular identification of the species composition of russian isolates of pathogens, causing early blight of potato and tomato 15: 151-156.
- Ellis, M.B., Martin, G.B., 1882. *Macrosporium solani* E&M. *American Naturalist* 16: 1003.
- FAOSTAT, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/> (Acedido em 05/06/2018)
- Feliciano, E.A. 2008. Solanaceae A. Juss . da Serra Negra , Rio Preto , Minas Gerais: Tratamento taxonômico e similaridade florística. Pós-Graduação, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Juiz de fora, PGECOL.
- Fernandez-Pozo, 2014. About the *Solanaceae* family. International Solanaceae Genome Project. Disponível em: https://solgenomics.net/about/about_solanaceae.pl (Acedido a 26/6/2018)
- Gannibal, P.B., Orina, A.S., Mironenko, N. V., Levitin, M.M. 2014. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology* 139: 609–623.

- Grigolli, J.F.J., Kubota, M.M., Alves, D.P., Rodrigues, G.B., Cardoso, C.R., Henriques da Silva, D. J. Mizubuti, E.S.G. 2011. Characterization of tomato accessions for resistance to early blight. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11: 174–180.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis for Windows 95/98. *Nucl. Acids. Symp. Ser* 41: 95-98
- Hardy, B. (Ed.), 1996. Diseases caused by fungi, in: Major Potato Diseases, Insects, and Nematodes. International Potato Center, Lima, Peru, 111p.
- INE, 2016. Estatísticas Agrícolas 2016 Disponível em: www.ine.pt (Acedido a 26/6/2018)
- Jones, L.R., Grout, A.J., 1897. Notes on Two Species of *Alternaria*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 24: 254–258.
- Kokaeva, L.Y., Belosoklov, A.F., Doeva, L.Y., Skolotneva, E.S., Elansky, S.N., 2017. Distribution of *Alternaria* species on blighted potato and tomato leaves in Russia. *Journal of Plant Diseases and Protection*: 1–8.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis.
- Kumar, T.R., Barnwal, M.K. 2017. Survey and screening of tomato varieties against early blight (*Alternaria solani*) under field conditions. *Contemporary Reaserch in India* 7: 188–193.
- Laemmlen, F., 2001. *Alternaria* Diseases. ANR catalog. Disponível em: <https://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/8040.pdf> (Acedido a 05/06/2018).
- Landschoot, S., Vandecasteele, M., De Baets, B., Höfte, M., Audenaert, K., Haesaert, G. 2017. Identification of *A. arborescens*, *A. grandis*, and *A. protenta* as new members of the European *Alternaria* population on potato. *Fungal Biology* 121: 172–188.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG *Bioinformatics* 2007 23(21): 2947-2948
- Lawrence, D.P., Gannibal, P.B., Peever, T.L., Pryor, B.M., 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia* 105: 530–546.
- Lawrence, D.P., Rotondo, F., Gannibal, P.B. 2016. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress* 15.
- Leiminger, J., Bahnweg, G., Hausladen, H. 2010. Population genetics – consequences on early blight disease. Arras, França.
- Leiminger, L., Auinger, H.J., Wenig, M., Bahnweg, G., Hausladen, H., 2013. Genetic variability among *Alternaria solani* isolates from potato in Southern Germany based on RAPD-profiles. *Journal of Plant Disease and Protection* 120: 164–172.
- Lima, C.S.M., 2009. Fenologia, sistemas de tutoramento e produção de *Physalis peruviana* na região de Pelotas. Pós-Graduação, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.
- Lin, Q.W., Sun, X.T., He, H., Yang, D.X., 2016. First report of leaf spot caused by *Alternaria tenuissima* on *Avicennia marina* in China. *Plant Disease* 100: 2323.
- Logrieco, A., Moretti, A., Solfrizzo, M. 2009. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal* 2: 129–140.
- Lourenço, V., Moya, A., González-Candelas, F., Carbone, I., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G. 2009.

- Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. *Phytopathology* 99: 765–774.
- Madden, T., 2002. The BLAST Sequence Analysis Tool *In* Eds. McEntyre, J., Ostell, J. *The NCBI Handbook*.
- Mageste, J.O., Pereira, T.C.D., Silva, G.A., Barros, R.A.M. 2012. Estudo da microbiota fúngica anemófila de uma indústria Farmacêutica de Juiz de Fora. *Revista Facider* 1: 17.
- Mamgain, A., Roychowdhury, R., Tah, J. 2013. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Research Journal of Biology* 1: 1–9.
- Marak, T.R., Ambesh, B.S., Das, S. 2014. Cultural, morphological and biochemical variations of *Alternaria solani* causing diseases on solanaceous crops. *The Bioscan* 9: 1295–1300.
- McKinney, H.H., 1923. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 26: 195–217.
- Morris, P.F., Connolly, M.S., St Clair, D.A. 2000. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycological Research* 104: 286–292.
- Mycobank Database, 2017. . Fungal Databases, Nomencl. Species Banks. Disponível em: <http://www.mycobank.org/> (Acedido a 28/06/2018)
- Neergaard, P., 1945. *Danish species of Alternaria and Stemphylium: taxonomy, parasitism, economical significance*. Copenhagen, E. Munksgaard, 560pp.
- Nishimura, S., Sugihara, M., Kohmoto, K., Otani, H. 1978. The different phases in pathogenicity of the *Alternaria* pathogens causing black spot disease of Japanese pear. *Journal of the Faculty of Agriculture* 13: 1–10.
- Oliveira, M. da S., 2007. Diversidade entre isolados de *Alternaria solani*: avaliação morfológica, fisiológica e molecular. PhD Thesis, Universidade Federal de Lavras, Brasil.
- Orina, A.S., Gannibal, P.B., Levitin, M.M. 2011. *Alternaria* species on potato in Russia. Russia.
- Pinto, E.V.F., Patriarca, A. 2017. Mycotoxigenic fungi: Methods and Protocols. *In* Eds. Moretti, A., Susca, A., *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*:13–32.
- Pires, B.F., 2015. *Physalis*: Um fruto com futuro. Sumário Regional do Algarve: Barlavento. Disponível em: <http://barlavento.pt/mais/inovacao/physalis-um-fruto-com-futuro> (Acedido a 28/06/2018)
- Pryor, B.M., Gilbertson, R.L. 2000. 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.
- Pscheidt, W., 1985. Epidemiology and control os potato early blight, caused by *Alternaria solani*. PhD Thesis, University of Winsconsin-Madison, USA.
- Rahimloo, T., Ghosta, Y. 2015. The occurrence of *Alternaria* species on cabbage in Iran. *Zemdirbyste-Agriculture* 102: 343–350.
- Ramos, A.P., 2009. *Collectotrichum* diseases of citrus in Portugal: key pathogens, inter- or intra-species diversity and cross-infection potential. Tese de Douturamento, Universidade de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal.
- Rayner, R.W., 1970. A mycological colour chart. Kew: Commonwealth Mycological Institute.
- Rodrigues, T.T.M.S., Berbee, M.L., Simmons, E.G., R., C.C., Reis, A., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G.

2010. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. *New Disease Reports* 22: 28
- Rodríguez-Roa, J.H., Cárdenas, M.E., Jiménez, P. 2013. Especies de *Alternaria* de La Sabana de Bogotá, Colombia. *Fac. ciencias básicas* 9, 228–247.
- Rotem, J. 1994. *The genus Alternaria: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity*. St. Paul, APS Press.
- Runa, F., Park, M.S., Pryor, B.M. 2009. *Ulocladium* systematics revisited : phylogeny and taxonomic status. *Mycological Progress* 8: 35–47.
- Saisri, K., 2015. Secondary metabolites of Solanaceae and their anti-cancer potential: an overview. *Research and Reviews: Journal of Botanical Sciences*: 46–57.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York.
- Serdani, M., Kang, J., Andersen, B., Crous, P.W. 2002. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research* 106: 561–569.
- Shankar, R., Harsha, S., Bhandary, R. 2014. A practical guide to identification and control of tomato diseases. *Tropical. Seeds*.
- Simmons, E.G., 2007. *Alternaria: an identification manual*. CBS Fungal Biodiversity Center, Utrecht, Netherlands, 775 pp.
- Simmons, E.G., 2000. *Alternaria* themes and variations (244-286) species on Solanaceae. *Mycotaxon* 75: 1–115.
- Simmons, E.G., 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge *In* Eds. Chelkowski, J., Visconti, A. *Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands: 1–35.
- Simmons, E.G., 1989. Macrospora Fuckel (*Pleosporales*) and related anamorphs. *Sydowia* 41: 314–329.
- Simmons, E.G., 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia* 59: 67–92.
- Simmons, E.G., Roberts, R.G., 1993. *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon* 48: 109–140.
- Singh, V., Shrivastava, A., Jadon, S., Wahi, N., Singh, A., Sharma, N. 2015. *Alternaria* diseases of vegetable crops and its management control to reduce the low production. *International Journal of Agriculture Science* 7: 834–840.
- Solanaceae Source, 2017. Disponível em: <http://solanaceaesource.org/content/solanaceae> (Acedido a 12/05/2018)
- Soni, P., Siddiqui, A.A., Dwicedi, J., Soni, V. 2012. Pharmacological properties of *Datura stramonium* L. as a potential medicinal tree: An overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2.
- Srivastava, A., Ohm, R.A., Oxiles, L., Brooks, F., Lawrence, C.B., Grigoriev, I. V., Cho, Y. 2012. A zinc-finger-family transcription factor, AbVf19, is required for the induction of a gene subset important for virulence in *Alternaria brassicicola*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 25: 443–452.
- Stammler, G., Böhme, F., Philippi, J., Miessner, S., Tegge, V. 2014. Pathogenicity of *Alternaria*-species on potatoes and tomatoes. *PPO - Special Report* N°16
- Stewart-Wade, S.M., Lawrie, A.C., Bmese, E. 1998. An Australian isolate of *Alternaria crassa* shows potential as a mycoherbicide to control the weed *Datura stramonium*. *Australian Plant Pathology*

27, 186–197.

- Subramanian, C. V., 1961. *Stemphylium* and *Pseudostemphylium*. *Current Science* 30: 423–424.
- Sudhir Kumar, Glen Stecher, and Koichiro Tamura 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Tanabe Park, P., Tsuge, T., Kohmoto, K., and Nishimura, S., K., 1995. Characterization of the mutants of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype deficient in melanin production and their pathogenicity. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 61: 27–33.
- The Plant List - Solanaceae, 2013 Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Solanaceae/> (Acedido a 23-04-2018)
- Thomma, B.P.H.J. 2003. *Alternaria* spp.: From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4: 225–236.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M., Otani, H. 2013. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews Journal* 37: 44–66.
- Tymon, L., Peever, T.L., Johnson, D.A. 2016. Identification and enumeration of small-spored *Alternaria* species associated with potato in the U.S. Northwest. *Plant Disease* 100: 465–472.
- Vakalounakis, D.J., Kavroulakis, N., Lamprou, K. 2016. Occurrence of leaf spot caused by *Alternaria tenuissima* on *Aloe barbadensis* in Greece. *Disease notes* 100: 1015.
- van der Waals, J.E., Korsten, L., Aveling, T.A.S., 2001. A review of early blight of potato. *African Plant Protection* 7, 91–102.
- van der Waals, J.E., Korsten, L., Slippers, B. 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease* 88: 959–964.
- Vandecasteele, M., Landschoot, S., Carrette, J., Verwaeren, J., Höfte, M., Audenaert, K., Haesaert, G. 2017. Species prevalence and disease progression studies demonstrate a seasonal shift in the *Alternaria* population composition on potato. *Plant Pathology* 67: 327–336.
- Vasconcelos, C.V., da Silva, D.C., Carvalho, D.D.C. 2014. Ocorrência de *Alternaria alternata* (Fr .: Fr .) Keissl . em tubérculos de batata , no Brasil 1. *Agricultural Reserch in the Tropics* 44: 219–222.
- Wallroth, C. 1883. *Flora cryptogamica Germaniae* section 2. J.L. Schrag, Nürnberg, Germany.
- Wee, J., Park, J., Back, C.-G., You, Y.-H., Chang, T., 2016. First report of leaf spot caused by *Alternaria tenuissima* on Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) in Korea. *Mycobiology* 44: 187–190.
- Weir, T.L., Huff, D.R., Christ, B.J., Romaine, C.P. 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia* 90: 813–821.
- Wenneker, M., Pham, K., Woudenberg, J., Thomma, B. 2018. First report of *Alternaria arborescens* species complex causing leaf blotch and associated premature leaf drop of *Golden Delicious* apple trees in the Netherlands. *Plant Disease*
- Wharton, P., Wood, E. 2013. Early blight biology and control in potatoes, University of Idaho - College of Agricultural and Life Sciences. Moscow, Idaho.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics *In* Eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. *PCR*

- Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, USA: 315–322.
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., Crous, P.W. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75, 171–212.
- Woudenberg, J.H.C., Seidl, M.F., Groenewald, J.Z., de Vries, M., Stielow, J.B., Thomma, B.P.H.J., Crous, P.W. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* 82: 1–21.
- Woudenberg, J.H.C., Truter, M., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. 2014. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. *Studies in Mycology* 79: 1–47.
- Zheng, H.H., Zhao, J., Wang, T.Y., Wu, X.H. 2015. Characterization of *Alternaria* species associated with potato foliar diseases in China. *Plant Pathology* 64: 425–433.

7 ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo de extração de DNA

QIAGEN® Protocol – Isolation of Total DNA from Plant Tissue Using the DNeasy Plant Mini Kit
(adaptado de QIAGEN 2004. *DNeasy Plant Mini and DNeasy Plant Maxi Handbook 01/2004*.
QIAGEN, Hilden, Germany)

Reagents and materials provided with the Kit

Buffer AP1
Buffer AP2
Buffer AP3
Buffer AW
Buffer AE
RNase A (100 mg.ml⁻¹)
DNeasy Spin Columns
QIAshredder™ Mini Spin Columns
Collection Tubes (2 ml)

Equipment required but not provided

Microcentrifuge tubes (1.5 ml)
Microcentrifuge with rotor for 2 ml tubes

1. Add 400 µl of Buffer AP1 and 4 µl of RNase A stock solution (100 mg.ml⁻¹) to a maximum of 20 mg (dried) fungal tissue and vortex vigorously.

No tissue clumps should be visible. Vortex or pipet further to remove any clumps. Clumped tissue will not lyse properly and will therefore result in a lower yield of DNA. In the rare case where clumps cannot be removed by pipetting and vortexing, a disposable micropestle may be used.

2. Incubate the mixture for 10 min at 65°C. Mix 2-3 times during incubation by inverting tube. This step lyses the cells.
3. Add 130 µl of Buffer AP2 to the lysate, mix, and incubate for 5 min on ice.

This step precipitates detergent, proteins, and polysaccharides. Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).

4. Apply the lysate to the QIAshredder Mini Spin Column (lilac) placed in a 2 ml collection tube and centrifuge for 2 min at 20,000 x g (14,000 rpm).

It may be necessary to cut the end of the pipet tip to apply the lysate to the QIAshredder Mini Column. The QIAshredder Mini Column removes most precipitates and cell debris, but a small amount will pass through and form a pellet in the collection tube. Be careful not to disturb this pellet in step 5.

5. Transfer flow-through fraction from step 4 to a new tube (not supplied) without disturbing the cell debris pellet.

Typically 450 μ l of lysate is recovered. For some plant species less lysate is recovered. In this case, determine volume for the next step.

6. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E to the cleared lysate and mix by pipetting.

It is important to pipet Buffer AP3/E directly onto the cleared lysate and to mix immediately.

7. Apply 650 μ l of the mixture from step 6, including any precipitate which may have formed, to the DNeasy Mini Spin Column sitting in a 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge for 1 min at $\geq 6,000 \times g$ (corresponds to $\geq 8,000$ rpm for most microcentrifuges) and discard flow-through. Reuse the collection tube in step 8.
8. Repeat step 7 with remaining sample. Discard flow-through* and collection tube.
9. Place DNeasy Mini Spin Column in a new 2 ml collection tube (supplied), add 500 μ l Buffer AW to the DNeasy Mini Spin Column and centrifuge for 1 min at $\geq 6,000 \times g$ ($\geq 8,000$ rpm). Discard flow-through and reuse the collection tube in step 10.
10. Add 500 μ l Buffer AW to the DNeasy Mini Spin Column and centrifuge for 2 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm) to dry the membrane.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini Spin Column since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This spin ensures that no residual ethanol will be carried over during elution. Discard flow-through and collection tube.

11. Transfer the DNeasy Mini Spin Column to a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied) and pipet 100 of Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate for 5 min at room temperature (15-25°C) and then centrifuge for 1 min at $\geq 6,000 \times g$ ($\geq 8,000$ rpm) to elute.

Elution with 50 μ l (instead of 100 μ l) increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but also reduces overall DNA yield. If larger amounts of DNA (>20 μ g) are loaded, eluting with 200 μ l (instead of 100 μ l) increases yield.

12. Repeat step 11 once.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, the microcentrifuge tube can be reused for the second elution step to combine the eluates.

Note: All centrifugation steps were carried out at room temperature (15-25°C).

Anexo 2 – Protocolo de purificação de DNA

QIAquick PCR Purification Kit Protocol (adaptado de QIAGEN 2002. QALquick® Spin Handbook, July/2004. QIAGEN, Hilden, Germany)

This protocol is designed to purify single- or double-stranded DNA fragments from PCR and other enzymatic reactions. For cleanup of other enzymatic reactions, follow the protocol as described for PCR samples or use the new MinElute Reaction Cleanup Kit. Fragments ranging from 100 bp to 10 kb are purified from primers, nucleotides, polymerases, and salts using QIAquick spin columns in a microcentrifuge.

Reagents and materials provided with the Kit

Buffer PB

Buffer PE

Buffer EB

Buffer AW

QIAquick Spin Columns

Collection Tubes (2 ml)

Equipment required but not provided

Microcentrifuge tubes (1.5 ml)

Microcentrifuge with rotor for 2 ml tubes

1. Transfer each PCR sample into a microcentrifuge tube (1.5 ml). Add Buffer 0.1mM Tris pH 8.0 up to a final volume of 50 µl.
2. Add 5 volumes of Buffer PB to 1 volume of the PCR sample and mix.
3. Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.
4. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 30-60 s, at 8,000-10,000 rpm.
5. Discard flow-through. Place the QIAquick column back into the same tube. Collection tubes are re-used to reduce plastic waste.
6. To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column and centrifuge for 30-60 s, at 10,000 rpm.
7. Discard flow-through and place the QIAquick column back in a new tube (take the lid out). Centrifuge the column for an additional 1 min, at maximum speed. Let the column stand for 1 min.
8. Place QIAquick column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.
9. To elute DNA, add 50 µl Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) or H₂O to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1-2 min, and then centrifuge for 1 min at 10,000 rpm.

Anexo 3 – Resultados dos testes de patogenicidade e virulência – Moda e correlação

Quadro 14 - Resultados das duas séries de inoculações em discos de folhas destacadas de tomateiro, batateira e do respectivo hospedeiro de origem para os isolados. São apresentadas as modas para cada série de inoculações, de acordo com a escala de severidade proposta em 'Materiais e Métodos', e a respectiva correlação (*não definido).

| Isolado | Hospedeiro de origem | Espécie | Batateira | | | Tomateiro | | | Hospedeiro de origem | | |
|---------|-----------------------------|------------------------|-----------|----------|--------|-----------|----------|--------|----------------------|----------|--------|
| | | | 1ª série | 2ª série | Correl | 1ª série | 2ª série | Correl | 1ª série | 2ª série | Correl |
| 575 | <i>Capsicum frutescens</i> | <i>A. alternata</i> | 2 | 2 | 1 | 5 | 0 | 0,68 | 5 | 0 | nd* |
| 589 | <i>Capsicum frutescens</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0,88 | 0 | 0 | nd* |
| 574 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 5 | 1 | 0 | 0 | nd* | Sem resultados | 0 | 0 |
| 579 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 5 | 1 | 4 | 0 | 0,49 | | 0 | 0 |
| 580 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. arborescens</i> | 5 | 5 | 1 | 1 | 0 | 0,98 | | 0 | 0 |
| 583 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. infectoria</i> | 4 | 4 | 1 | 3 | 0 | nd* | | 0 | 0 |
| 587 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0,57 | | 0 | 0 |
| 615 | <i>Capsicum annuum</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 5 | 1 | 0 | 0 | nd* | | 0 | 0 |
| 585 | <i>Physalis peruviana</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 5 | 1 | 1 | 0 | 0,95 | | 0 | 0 |
| 600 | <i>Solanum aethiopicum</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0,97 | 4 | 0 | 0,47 |
| 611 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 0 | 0,34 | 0 | 0 | 0,97 | - | - | - |
| 612 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 1 | 0,67 | 0 | 0 | 0,76 | - | - | - |
| 616 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 0 | 0,74 | 1 | 0 | nd* | - | - | - |
| 620 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 3 | 0,80 | 0 | 0 | nd* | - | - | - |
| 621 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 0 | 3 | 0,20 | 5 | 0 | 0,41 | - | - | - |
| 622 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 4 | 2 | 0,75 | 0 | 0 | 0,58 | - | - | - |
| 623 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. infectoria</i> | 2 | 1 | 0,79 | 0 | 0 | nd* | - | - | - |
| 624 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. tenuissima</i> | 5 | 1 | 0,61 | 0 | 0 | nd* | - | - | - |
| 625 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. infectoria</i> | 0 | 1 | 0,70 | 0 | 0 | nd* | - | - | - |
| 626 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. infectoria</i> | 0 | 2 | nd* | 0 | 0 | nd* | - | - | - |
| 627 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 3 | 1 | 0,83 | 0 | 0 | nd* | - | - | - |
| 628 | <i>Solanum lycopersicum</i> | <i>A. alternata</i> | 3 | 3 | 0,76 | 0 | 0 | 0,51 | - | - | - |
| 601 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | 2 | 1 | 0,88 | 0 | 0 | nd* | - | - | - |
| 602 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. consortialis</i> | 2 | 1 | 0,85 | 1 | 0 | 0,53 | - | - | - |
| 603 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | 2 | 0 | 0,92 | 1 | 0 | nd* | - | - | - |
| 604 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. alternata</i> | 5 | 1 | 0,61 | 0 | 0 | nd* | - | - | - |
| 605 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. alternata</i> | 3 | 3 | 0,74 | 0 | 0 | 0,97 | - | - | - |
| 606 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | 0 | 0 | 0,67 | 0 | 0 | nd* | - | - | - |
| 608 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. alternata</i> | 0 | 2 | 0,76 | 0 | 0 | nd* | - | - | - |
| 619 | <i>Solanum tuberosum</i> | <i>A. infectoria</i> | 3 | 1 | 0,82 | 0 | 0 | nd* | - | - | - |

PT620 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAT AAACCCGGAG GAAN
 PT621 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAT AANNNNNNNN NNNN
 PT622 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAAGC--GGAG GAAN
 PT623 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAT AAGCCGGAGG AANN
 PT624 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAT AANNNNNNNN NNNN
 PT625 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAT AANNNNNNNN NNNN
 PT626 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA AANNNNNNNN NNNN
 PT627 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA AAA--CCGGGA AGGA
 PT628 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCTA AAC--CGGAA GGA
 AF347031 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AANNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNN
 AF347032 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AANNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNN
 AF347033 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AANNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNN
 DQ323697 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAAGCCGGAG GAAN
 HQ647307 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAAGC--GGAG GAAA
 JF802118 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCNN NNNNNNNNNN NNNN
 KC584197 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNN
 KC584217 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNN
 KC584239 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNN
 KC584247 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNN
 KJ526175 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA AAGCCCGGAG GAAA
 EM977773 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAT AGCCCGGAG GAAA
 KP638336 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAGCCCGGGA GGAA
 KP641146 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA GCGGGGGGA GAAA
 KR912289 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA AAGCC--GGGA GGAA
 KR912317 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAAGCCGGAG AANN
 KR912323 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAAGCCGGAG AANN
 KT192298 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA AGCCCGGAG AANN
 KT280009 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA AAAACCGGGA AGAA
 KU324787 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAAGCCGGAG AANN
 KU374629 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAAGNNNNNN NNNN
 KU936229 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA AAGCCGGGAA AAAA
 KX179485 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAT AAGCCCGGAG GAAA
 KX179485 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA -AAGCCCGGAG GAGG
 KX768145 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAGCCCGGAG GAAA
 KY783408 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA AAACCCGGAG GANN
 KY419541 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA AAGCCCGGAG GAAA
 MF102104 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA AAACCCCGGA GAAA
 MF435161 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAT AANNNNNNNN NNNN
 MG282916 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAT AANNNNNNNN NNNN
 MG596645 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAAGC--GGA GGAA
 MG711600 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAT AAACCCGGGA GGAA
 MG736194 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA NNNNNNNNNN NNNN
 Y17066 TAAGCCTT-- TTTT--CAA CTTTGGACCT CGGATCAGGT AGGGATACCC GCTGAACCTA AGCATATCAA TAAGCNNNNN NNNN

PT583 AACTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAATCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT585 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT587 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT589 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT600 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT601 AATTCGGCTT CAGCTACTA ACAATCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT603 AACTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAATCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT604 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT605 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT606 AATTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT608 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT611 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT612 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT615 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG TGGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT616 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT619 AATTTGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT620 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT621 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT622 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT623 AATTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT624 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT625 AATTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT626 AATTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT627 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 PT628 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 KC584636 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCINN NNNNNNNNNN NNNNNNNN
 KC584634 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCINN NNNNNNNNNN NNNNNNNN
 KC584693 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCINN NNNNNNNNNN NNNNNNNN
 KC584662 AATTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCINN NNNNNNNNNN NNNNNNNN
 KC584658 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTTINN NNNNNNNNNN NNNNNNNN
 KC584688 GGGGACTACA TGGGGGCGT TCACTCTCTT CTGTGTTGGCG ATATCATGCC CTGGCGACTA CATGGGGG
 KC584742 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCINN NNNNNNNNNN NNNNNNNN
 KY094931 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 KY094930 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 KY094926 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 KY094925 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 FJ214918 AACTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAATCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 FJ214912 AATTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 FJ214911 AATTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 FJ214908 AATTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 FJ214924 AATTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 FJ214934 AATTCGGCTT CAGTCTGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 LT707524 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 KY231162 ATTTGGCCA CAGCGAGCTA ACAAGCCTCA CAGGAAGCCG CCGAACTCGG TAAGGTTCC TTCAAGTA
 KC584731 TCGTATGCTG CAGCGTCTA ACAAGCCTCA TAGGAAGCCG CCGAGCTCINN NNNNNNNNNN NNNNNNNN

PT580 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCTCTCCNNN NNNNNNNNNN N
PT583 A-CATGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTCGTTCC C-GTCAGC NN N
PT585 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTCGTNNN NNNNNNNNNN N
PT587 A-CCTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTCGNNNN NNNNNNNNNN N
PT589 AACCTGGCAG GCGTAATGC CCTTCGCCGG CCCTCGTCT CCGGCCAGCC A
PT600 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-- GCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
PT603 A-CATGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTCGTCT CCGTCAGC NN N
PT604 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-- GCCTCNNNNN NNNNNNNNNN N
PT605 A-CTTGC-AA GCGT-AATGC C-TTCGCC-G CCNNNNNNNN NNNNNNNNNN N
PT606 A-CATGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTCNNNNN NNNNNNNNNN N
PT608 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTCGNNNN NNNNNNNNNN N
PT611 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CNNNNNNNNN NNNNNNNNNN N
PT612 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-- GCNNNNNNNN NNNNNNNNNN N
PT615 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTCNNNNN NNNNNNNNNN N
PT616 A-CCTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCTNNNNNNN NNNNNNNNNN N
PT619 A-CATGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTCGTCT CCGTNNNNNNN N
PT620 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-- GCCTGCCCNN NNNNNNNNNN N
PT621 A-CCTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
PT622 A-CCTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
PT623 A-CATGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTCGTCT C-GTCAGCCA A
PT625 A-CATGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTGTCCCN NNNNNNNNNN N
PT626 A-CATGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCTCCTCCT TTTTANNNN N
PT627 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-C CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
PT628 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCTNNNNNNN NNNNNNNNNN N
KP125229 A-CCTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
KP125230 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
KP125233 A-CTTGC-AA GCGT-AATGC C-TTCGCC-G CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
KP125234 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
KP125238 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
KP125249 A-CCTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
KP125255 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCCGC CCTNNNNNNN NNNNNNNNNN N
KP125264 A-CTTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N
KP125227 A-CGTGC-AA GCGC-AATGC C-TTCGCC-G CCCTNNNNNN NNNNNNNNNN N