SIMONE LILIANE KIRSZENZAFT SHEPHERD

UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS E TESTES DE RESISTÊNCIA/SUSCETIBILIDADE AO FUNGO *ALTERNARIA SOLANI* (ELL. & MART.) JONES & GROUT EM PLANTAS DE TOMATE

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção de título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. MARO RAN-IR SÖNDAHL

Campinas

1986

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pela aluna Simone Liliana Kirszenzaft Shepherd e aprovada pela comissão julgadora. 25/agosto/86

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A ABRAHAM

cuja ausência sempre presente

A GEORGE

cujo apôio, compreensão, carinho, afeto

A DAVID

cuja alegria

estão em cada folha deste trabalho.

Todo meu amor passado, presente

e

futuro.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Maro Ran-Ir Söndahl pelo apôio recebido, pela segura orientação prestada na realização do presente trabalho e, sobretudo, pela amizade.

À Secção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas, no qual todo o trabalho experimental foi desenvolvido , a todos os pesquisadores, funcionários e estagiários que, sem excessão, foram de uma gentileza extrema, carinho e amizade. Destes, agradeço em particular aos que estiveram mais diretamente relacionados ao trabalho desenvolvido: o Pesquisador Científico Walter José Siqueira, pelas valiosas sugestões, incentivo, amizade e apôio; aos técnicos: Maria Cristina Presta; Mara D.L. Mendes , Celso F. Bueno e Heloisa Honda; estagiários: Rita Bordignon, Carmem Lucia Assis, Vera L. Pedro e Dalila Figueiredo Schetmann, e a secretária Eliane de Fátima Ortolan Leal.

Aos Professores Dr. Antonio Celso N. Magalhães, Dr. Ladaslav Sodek, Dr. Rolf D. Illg, da Universidade de Campinas, pela revisão crítica deste trabalho e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. George John Shepherd, do Departamento de Morfologia e Sistemática Vegetais, pelas valiosas sugestões e auxílio em várias etapas deste trabalho: documentação fotográfica, elaboração e execução de programas de informática (gráficos-Figuras 54, 55, 57 e 58 e discriminação das médias pelo teste de Scheffé) e pela elaboração do SUMMARY.

Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro, do Instituto de Matemática e Ciências de Computação (IMECC) da Universidade Estadual de Campinas, pela elaboração e realização da parte estatística apresentada pelo presente trabalho, bem como, pelas valiosas sugestões, explicações e amizade.

A Maria José Contreras que, além de datilógrafa, foi amiga e irmã.

A Esmeralda Zanchetta, do Departamento de Morfologia e

Sistemática Vegetais, pelas sugestões quanto à parte de documentação gráfica dos dados, além da amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Projetos (FINEP) que, através do auxílio concedido à Secção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas, pelo apôio financeiro para a realização do presente trabalho.

Aos Professores e Funcionários e Alunos do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelo apôio recebido. Agradeço aos Professores, Funcionários e Alunos do Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, do Departamento de Genética e Evolução e, principalmente, de Morfologia e Sistemática Vegetais.

De modo especial, sou grata ao meu esposo George Shepherd pela compreensão, pelo incentivo e apôio irrestrito em todos os momentos.

Aos meus pais, especialmente à minha mãe, pelo estímulo.

Por fim, agradeço a todos que, de modo direto ou indireto, contribuiram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

pág.

RESUMO xxvii

SUMMARY xxxi

I. INTRODUÇÃO 1

II. REVISÃO DA LITERATURA 5

1. *Lycopersicon esculentum* Mill 5

1.1. Problemas do Cultivo do Tomate 5

1.2. Taxonomia 9

1.3. Estudos Genéticos 15

1.3.1. Formas Cultivas de *L. esculentum* 16

1.3.2. Espécies Selvagens 19

1.4. Estudos Fisiológicos (especialmente em relação ao alumínio) 21

1.4.1. Testes in vivo 23

1.4.2. Testes in vitro 24

1.5. Utilização da Técnica de Cultura de Tecidos . 26

1.5.1. Cultura de Tecido do Tomateiro 26

1.5.2. Técnica de Cultura de Tecidos para obtenção de variabilidade (variação somaclonal 30

1.5.3. Indução e Seleção de Plantas Resistentes às Doenças 43

2. *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout, como exemplo de agente causal de doença fúngica do tomateiro 44

2.1. Importância Econômica das Doenças Fúngicas .. 44

2.2. Descrição da Espécie 47

2.3. Sintomatologia 48

2.4. Fitopatologia Fisiológica 50

2.4.1. Fungos em Geral 50

2.4.2. *Alternaria solani* 57

2.4.2.1. Relação de Conteúdo de Açucar e Suscetibilidade 57

2.4.2.2. Deficiência de Magnésio e Suscetibilidade 58

2.4.2.3. Indução de conídios por luz azul 58

2.5. Definições e Características de Substâncias Relacionadas com Doenças Fúngicas 60

2.5.1. Substâncias em Geral 60
2.5.2. Metabólitotos Fitotóxicos 61
2.6. Toxinas 64
2.6.1. Classificação de Toxinas 64
2.6.1.1. Classificação Segundo o Desempenho 64
2.6.1.2. Classificação Conforme o Envolvimento na Patogenicidade 71
2.6.1.3. Classificação por Especificidade 72
2.6.2. Toxinas de Fungos em Geral 75
2.6.3. Toxinas de Fungos do Gênero *Alternaria* 76
2.6.4. Toxinas de *A. solani* 80
2.6.5. Controle Genético 87
2.6.6. Uso Potencial de Toxinas 91

III. MATERIAL VEGETAL 92
1. Tomateiro (*L. esculentum*) 92
1.1. Tomate de Banco de Germoplasma (acessões) .. 92
1.2. Tomate Comercial 92
1.2.1. Cultivo de Tomate para Indústria 92
1.2.2. Tomate de mesa 94
2. Patógeno (*A. solani*) 97
Origem do material para o isolamento de *A. solani* 97

IV. MÉTODOS 98
1. Estabelecimento de Metodologia para Obtenção de Plantas de Tomate a Partir de Cultura de Tecidos. 98
1.1. Origem de Fonte de Explante 98
1.1.1. Explantes Obtidos de Plantas Cultivadas em Estufa 98
1.1.2. Explantes Obtidos a Partir de Plântulas Estéreis 100
1.1.2.1. Pré-Tratamento e Esterilização de Sementes 103
1.1.2.2. Incumbação de Sementes Esterilizadas 103
1.2. Órgãos Utilizados como Explante 104
1.2.1. Cotilédone e Folha Definitiva 106

1.2.2. Hipocótilo e Caule 106
1.2.3. Submeristema 106
1.3. Cultivo in vitro 109
1.3.1. Meio de Placa 109
1.3.2. Meios para Cultivo de Submeristemas . 110
1.3.2.1. Meios Citados na Literatura 111
1.3.2.2. Meio Básico Acrescido de Combinação de fitorreguladores 111
1.3.3. Cultura Primária (Regeneração) 111
1.3.3.1. Meios Citados na Literatura 112
1.3.3.2. Interações de Fitorreguladores em Morfogênese 113
1.3.3.3. Cultura Primária Padrão ($To-M_3$) 114
1.3.3.4. Condições de Cultivo 115
1.3.3.5. Avaliação de Cultura Primária 119
1.3.3.5.1. Crescimento de Calos 119
1.3.3.5.2. Avaliação de Regeneração 122
1.3.4. Cultura Secundária (Enraizamento) ... 131
1.3.5. Cultura Terciária (Aclimatação) 131
2. Produção de Plantas por Variação Somaclonal 132
2.1. Efeito do Explante Inicial 132
2.2. Correlação entre Estádios de Regeneração Enraizamento, Aclimatação e Sobrevivência no Campo 132
2.3. Acompanhamento das Plantas Regeneradas no Campo 133
2.3.1. Cultivo 133
2.3.2. Observações de Crescimento (Fenotípicas) e de Desenvolvimento (Floração e Frutificação) 133
3. Métodos para Seleção in vitro (Pré-Seleção) 136
3.1. Cultura de *A. solani* 136
3.1.1. Isolamento 136
3.1.2. Manutenção do Fungo em Meio Sólido .. 137
3.2. Testes de Patogenicidade 139
3.2.1. Isolados do Fungo 139
3.2.2. Fungo Crescendo em Meio Sólido 140
3.3. Crescimento do Fungo em Meio Líquido 140

3.3.1. Meio Líquido Natural (V_8) 140
3.3.2. Meio Líquido Sintético (Czapek-Dox modificado) 143
3.4. Obtenção do Filtrao de Cultura de *A.solani* . 144
3.4.1. Filtrado Obtido a Partir do Fungo Crescendo em Meio Natural 144
3.4.2. Filtrado Obtido a Partir do Fungo Crescendo em Meio Sintético 144
3.5. Teste de Fitotoxicidade do Filtrado Estéril de Cultura de Fungo 147
3.6. Relação Entre o Período de Crescimento do Fungo em Meio Líquido e a Produção de Metabólitos Fitotóxicos 152
Montagem das Curvas-Padrões 152
Montagem do Teste 155
4. Utilização do Filtrado de Cultura de *A. solani* como Pressão de Seleção (Regeneração de Plantas em Presença de Filtrado) 156
4.1. 1º Experimento- Isolado Santa Eliza 156
4.2. 2º Experimento- Isolado Mococa 158
4.3. 3º Experimento- Isolado Mococa 160
4.4. 4º Experimento- Isolado Santa Eliza 162
4.5. Regeneração em Presença de Vários Filtrados de Cultura Obtidos do Isolado Santa Eliza de *A. solani* 165
4.6. Condições de Cultivo 165
5. Testes de Resistência em Plantas de Geração R_0 e R_1 165
5.1. Esquema do Material Vegetal Testado para Resistência do Filtrado de Cultura 166
5.2. Testes de Resistência de Plantas da Geração R_0 167
5.3. Testes de Resistência de Plantas da Geração R_1 167
5.3.1. Teste de Folíolos 168
5.3.2. Teste de Discos de Folhas 170
5.3.3. Teste de Germinação e Crescimento de Plântulas 172
6. Análise Estatística dos Dados Obtidos 179

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO 180

1. Estabelecimento da Metodologia para Obtenção de Plantas de Tomate a partir de Cultura de Tecidos 180

1.1. Origem da Fonte de Explante 180

1.1.1. Esterilização de Folhas de Plantas Adultas 180

1.1.2. Pré-Tratamento e Esterilização de Sementes 180

1.1.3. Germinação das Sementes Esterilizadas 182

1.2. Órgãos Utilizados como Explante: Submeristemas 183

1.2.1. Meios Citados na Literatura 183

1.2.2. Meio Básico Acrescido de Combinação de Fitorreguladores em Experimento Dialélico Tipo Lattice 5 x 5 186

1.2.3. Obtenção de 2a. geração in vitro 186

1.3. Cultivo in vitro (Incluindo Regeneração) ... 189

1.3.1. Coleta de Sementes de Plantas Obtidas in vitro 189

1.3.2. Interações de Fitorreguladores em Morfogênese 195

1.3.2.1. Interação Dialélica Tipo Lattice 5 x 5 195

1.3.2.2. Efeito de Auxinas (Tipo e Concentração) na Formação de Calos e em Freqüência e Qualidade de Regeneração em Presença de 6-BA 10 µM 197

1.4. Efeito de Fonte de Explante em Cultura Primária (Regeneração) 211

1.5. Condições de Cultivo 212

1.5.1. Submeristema 212

1.5.2. Cultura Primária 216

2. Produção de Plantas por Variação Somaclonal 221

2.1. Avaliação Geral dos Experimentos Realizados para Variação Somaclonal Durante os Anos de 1982 e 1983. Tomate de Indústria. Efeito do Explante Inicial 221

2.2. Correlação Entre as Várias Fases Envolvidas na Obtenção de Plantas Regeneradas, desde a Fase de Regeneração até a Sobrevivência e Produtividade no Solo 226

2.3. Acompanhamento das Plantas Regeneradas no Campo 258

3. Cultura do Fungo e Obtenção de Filtrados Fitotóxicos 271

3.1. Crescimento do Fungo em Meio Sólido 271
3.2. Testes de Patogenicidade do Fungo Crescendo em Meio Sólido 274
3.3. Características Cromogênicas 274
3.4. Crescimento do Fungo em Meio Líquido 283
3.5. Teste de Fitotoxicidade do Filtrado de Cultura 288
3.6. Conservaçao do Efeito Fitotóxico do Filtrado após Esterilização por Autoclavagem 293
3.7. Relação entre Período de Crescimento do Fungo em Cultura Líquida e a Produção de Metabólitos Tóxicos 294
3.7.1. Relação entre o Período de Incubação do Fungo e a Sintomatologia Observada 294
3.7.2. Atividade Fitotóxica de Filtrados de Cultura Submetidos a Tratamentos de Temperatura 295
3.7.3. Relação entre as Fases de Crescimento do Fungo in vitro e Produção de Metabólitos Fitotóxicos 298
3.8. Efeito de Condições Ambientais na Atividade Fitotóxica do Filtrado de Cultura de *A. solani* 306

4. Utilização do Filtrado de Cultura de *A. solani* como Pressão de Seleção (Regeneração de Plantas em Presença do Filtrado) 310

5. Testes de Resistência/Suscetibilidade em Plantas Regeneradas (Gerações R_0 e R_1) 386

VI. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES 423

1. Estabelecimento de Metodologia para Obtenção de Plantas de Tomate a Partir de Cultura de Tecidos 423

2. Produção de Plantas por Variação Somaclonal 429

3. Relação entre Metabólitos Produzidos pelo Filtrado de Cultura de *A. solani* e Patogenicidade 431

4. Utilização da Técnica de Cultura de Tecidos para Obtenção de Plantas Resistentes à Doença. Pinta-

Preta Causada por *A. solani* com o Emprego do Filtrado de Cultura do Fungo como Pressão de Seleção 461

5. Testes de Resistência/Suscetibilidade em Plantas Regeneradas (Gerações R_0 e R_1) Através da Utilização das Técnicas de Cultura de Tecidos com o Emprego do Filtrado de Cultura do Fungo como Pressão de Seleção 476

VII. BIBLIOGRAFIA 483

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 - Estrutura e identidade de fitotoxinas 66

Figura 2 - Estruturas químicas de toxinas específicas de *A. solani* 78

Figura 3 - Estruturas químicas dos compostos fitotóxicos em *A. solani* 86

Figura 4 - Esquema de esterilização de folhas de plantas de estufa 102

Figura 5 - Esquema de disponibilidade de material vegetal estéril 105

Figura 6 - Esquema de obtenção de plântulas estéreis . . 108

Figura 7 - Registro de temperaturas máximas no município de Campinas, SP, e dentro de estufa durante o mês de julho de 1982 116

Figura 8 - Registro de temperaturas mínimas no município de Campinas, SP, e dentro de estufa durante o mês de julho de 1982 117

Figura 9 - Médias de horas de insolação, por período de 10 dias, obtidas com o heliógrafo. Registro de Janeiro a Julho de 1982, no município de Campinas, SP 118

Figura 10- Padrão de notas de calos. A) Visualização dos calos padrões; B) Peso (mg) dos calos padrões 121

Figura 11- Aspecto a olho nú da plantlete regenerada (gema de 1-2mm) no estádio zero, em cultura primária. Meio padrão To-M_3 (meio MS + 6-BA 10μM e AIA 25 μM) 124

Figura 12- Aspecto à lupa esteroscópica (aumento de 10,3 vezes) de plantlete regenerada no estádio zero, em cultura primária (meio To-M_3) 124

Figura 13- Aspecto a olho nu da plantlete regenerada (gema com 5mm) em estádio 1, em cultura primária

(meio To-M_3). Neste estádio há diferenciação do limbo foliar 125

Figura 14 - Aspecto à lupa esteroscópica (aumento de 10,3 vezes) da plantlete regenerada no estádio 1, em cultura primária (meio To-M_3) 125

Figura 15 - Aspecto a olho nú da plantlete regenerada no estádio 2 (folha com 1 cm) em cultura primária (meio To-M_3) 126

Figura 16 - Aspecto a olho nú da plantlete regenerada no estádio 3 em cultura primária (meio To-M_3). Há grande desenvolvimento foliar, mas o que caracteriza o estádio 3 é a ausência de ápice 126

Figura 17 - Regeneração de uma estrutura anômala, em cultura primária (meio To-M_3) 127

Figura 18 - Aspecto a olho nú da regeneração de planta com ápice (2-3 folhas) em estádio 4, podendo apresentar folhas típicas (partidas) ou inteiras. Regeneração em cultura primária (To-M_3) 127

Figura 19 - Aspecto a olho nú de regeneração de planta com ápice vigorosa, em estádio bem avançado de diferenciação. Regeneração em cultura primária (To-M_3) 128

Figura 20 - Visualização de plantas completas, vigorosas, regeneradas em cultura primária (To-M_3). Pode-se observar o calo da qual se diferenciou cada planta 128

Figura 21 - Teste de patogenicidade de isolados de *A.solani*. 142

Figura 22 - Crescimento do fungo *A.solani* em meio líquido . 146

Figura 23 - Sintomatologia causada pelo filtrado de cultura de *A. solani* pelo método de estacas do tomateiro. 149

Figura 24 - Esquema de progressão de sintomatologia causada pelo filtrado de cultura de *A. solani* pelo método de estacas de tomateiro 151

Figura 25 - Comprovação da patogenicidade do isolado Santa Eliza utilizado no 4º experimento de pressão de seleção *in vivo* 164

Figura 26 - Esquema do teste de resistência in vivo em plantas R_0 175

Figura 27 - Esquema do teste de resistência in vivo em plantas R_1 178

Figura 28 - Cultivo de submeristema de plantas de tomate cultivadas em meios de cultura citados na literatura 185

Figura 29 - Cultivo de submeristemas de plantas de tomate em combinação dialélica 5 x 5 de AIA e 6-BA . 188

Figura 30 - Teste de regeneração de folhas originadas de uma única planta obtida in vitro a partir de submeristema 190

Figura 31 - Passagem de plantas obtidas in vitro a partir de submeristemas para cultivo em estufa com finalidade de coleta de sementes:

a - e 191

f - i 192

Figura 32 - Passagem de plantletes obtidas in vitro a partir de cotilédone e hipocótilo ao cultivo na estufa e campo para coleta de sementes:

a - d 193

e - h 194

Figuras 33 a 37 - Interações de fitorreguladores em morfogênese 198

Figura 33 - Comparação de interações dialélicas utilizando o material vegetal 1: a) dialélico II; b) dialélico III; c) dialélico IV e d) dialélico V 199

Figura 34 - Comparação de interações dialélicas utilizando o material vegetal 2: a) dialélico I e b) dialélico III. 201

Figura 35 - Índices de crescimento obtidos na interação dialélica 6-BA/ANA (dialélico III) com os materiais vegetais 1 (A) e 2 (B) 202

Figura 36 - Comparação de interações dialélicas utilizando o material vegetal 2: a) interação BA/AIA (dialélico I); b) interação 6-BA/2,4-D (dialélico V) . 203

Figura 37 - Índices de crescimento obtidos na interação dialélica de 6-BA/AIA (dialélico I) utilizando-se o material vegetal 2: a) cotilédone e b) folha definitiva 204

Figura 38 - Efeito de condições ambientais na regeneração de plantas de tomate (cv. Joaquim) 220

Figura 39 - Aspecto da planta R_0 obtida de cultura de tecidos apresentando crescimento vigoroso no campo 238

Figura 40 - Correlação entre estádios de regeneração, enraizamento, folhas anômalas, aclimatação e número de plantas no solo. Explante inicial = cotilédone 248

Figura 41 - Correlação entre estádio de regeneração, enraizamento, folhas anômalas, aclimatação e número de plantas no solo. Explante inicial = folha definitiva 249

Figura 42 - Correlação entre estádio de regeneração, enraizamento, folhas anômalas, aclimatação e número de plantas no solo. Explante inicial = caule . 249

Figura 43 - Aparecimento de anomalia foliar em plantas regeneradas de tomate 257

Figura 44 - Manutenção da característica de ausência de "ombro" em frutos de plantas regeneradas (R_0) de tomate comercial 260

Figura 45 - Plantas no campo obtidas após ciclos in vitro . 269

Figura 46 - Precocidade de frutificação em planta provinda de 2a. geração (R_1) de cultura de tecidos . . . 270

Figura 47 - Crescimento micelial de *A. solani* em meio de cultura sólido. a) Crescimento micelial sob baixas intensidades luminosas (50 a 60 $\mu w.cm^2$); b) Crescimento micelial em regimes alternados de luz de alta intensidade (1300$\mu w.cm^{-2}$) e c) teste de patogenicidade 272

Figura 48 - Teste de patogenicidade de isolados de *A.solani* coletadas em 5 localidades do Estado de São Paulo 276

Figura 49 - Estruturas químicas de pigmentos encontrados em micélio e filtrados de cultura de *A. solani* segundo STOESSL et al., 1983 280

Figura 50 - Desenvolvimento de *A.solani* em meio de cultura líquido para posterior obtenção do filtrado. Cultura em meio líquido (a-d); obtenção do filtrado (e-f); teste de fitotoxicidade do filtrado bruto em estacas de tomateiro cv. Ângela (g - j) e conservação do efeito fitotóxico do filtrado bruto após autoclavagem por 20 minutos a 120°C (l-m) 287 287 289 293

Figura 51 - Atividade fitotóxica de filtrados de cultura de várias idades, submetidos a tratamentos de temperatura 303

Figura 52 - Relação entre as fases de crescimento de fungo in vitro e produção de metabólitos fitotóxicos 305

Figura 53 - Dinâmica de regeneração em presença do filtrado de cultura de *A. solani* isolado Santa Eliza . Experimento nº 1 325

Figura 54 - Pressão de seleção: Efeito de esterilização do filtrado (Experimento nº 2). A) Cultivo in vitro com auxina (AIA 25 µM; 6-BA µM). Fase 1 : Formação de Calo; Fase 2: Regeneração 359 360

Figura 55 - Pressão de seleção: Efeito de esterilização do filtrado de cultura (Experimento nº 2). B) Cultivo in vitro sem auxina (só 6-BA 10 µM). Fase 1: Formação de Calo; Fase 2: Regeneração . . . 361 362

Figura 56 - Calos obtidos no Experimento nº 2, com filtrado de cultura de *A. solani*. A) Aspecto dos calos em presença de auxina; B) Aspecto dos calos em ausência de auxina e C) Regeneração em presença de auxina 363

Figura 57 - Pressão de seleção: Efeito da concentração d o filtrado (Experimento nº 3). A) Efeito da concentração do filtrado de cultura (% v/v). Fase 1: Formação de Calo; Fase 2: Regeneração . . . 375-376

Figura 58 - Pressão de seleção: Efeito da concentração d o filtrado (Experimento nº 3). B) Efeito da concentração do meio de cultivo - Controle (% v/v) Fase 1: Formação de Calo; Fase 2: Regeneração 381

Figura 59 - Utilização do filtrado de *A. solani* isolado Santa Eliza como pressão de seleção (1º experimento): A) Regeneração; B) Sobrevivência no campo 392

Figura 60 - Aspecto da planta R_0 obtida de pressão de seleção apresentando crescimento vigoroso no campo. 2º Experimento: a) Visão geral no campo; b) Aspecto mais aproximado da planta A-2/IIa/05a 394

Figura 61 - Aspecto da planta regenerada R_0 em meio sintético sem inoculação do fungo 75% v/v). 3º Experimento: A) Aspecto geral da planta no campo (A-3/II-4/05a) e B) Aspecto de um fruto em estádio "Red" 396

Figura 62 - Efeito da concentração do filtrado de cultura de *A. solani* em 3 testes biológicos 403

Figura 63 a 72 - Testes de resistência/suscetibilidade d o filtrado de cultura de *A. solani* realizados em plantas R_1

Figura 63 - Concentração do filtrado (C) - Leitura após 3 dias. Filtrado obtido após 30 dias (30 dias) . 405

Figura 64 - C. Leitura após 5 dias. 30 dias 406

Figura 65 - C. Leitura após 3 dias. Filtrado obtido após 45 dias (45 dias) 407

Figura 66 - C. Leitura após 5 dias. 45 dias 408

Figura 67 - C x Tipo de planta (T). 30 dias 409

Figura 68 - C x T. 30 dias 410

Figura 69 - C x T. 45 dias 411

Figura 70 - C x Leitura do Teste (L). 45 dias 412

Figura 71 - C x L. 30 dias 413

Figura 72 - Período de Crescimento (P) x C. 414

Figura 73 - Fluxograma das diferentes fases de cultura d e tecidos de tomate com recuperação de plantas (variação somaclonal) 425

Figura 74 - Efeito na sintomatologia da idade do filtrado de cultura (período de cultivo do fungo e m meio líquido de Czapek-Dox) 452

Figura 75 - Fluxograma das diferentes fases de cultura , em pré-seleção com toxina de fungo para recuperação de variantes somaclonais e teste de seleção in vivo 462

TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Fontes de resistência às doenças encontradas em espécies selvagens de *Lycopersicon* 66

Tabela 2 - Toxinas específicas ao hospedeiro de origem fúngica... 73

Tabela 3 - Toxinas não específicas ao hospedeiro no gênero *Alternaria*..... 74

Tabela 4 - Toxinas específicas ao hospedeiro no gênero *Alternaria*. 79

Tabela 5 - Siglas de material vegetal utilizado nos experimentos. 96

Tabela 6 - Anotação de freqüência de regeneração em cultura primária..... 130

Tabela 7 - Condições do ambiente durante o período de observação de características fenotípicas e de produção de plantas de tomate regeneradas (R_o). Tabela 7.1. Temperaturas médias; média de temperaturas mínimas; média das temperaturas máximas. Tabela 7.2. Horas de insolação..... 134

Tabela 8 - Anotação do acompanhamento no campo, das plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos..... 135

Tabela 9 - Resultado dos experimentos com folha de planta adulta de tomateiro. Os experimentos foram realizados com e sem pré-incubação. Melhores resultados foram obtidos nos experimentos com pré-incubação..... 181

Tabela 10 - Efeito de pré-tratamentos conjugados à esterilização superficial de sementes de tomateiro de indústria ("Petomech") para eliminação de cancro bacteriano..... 184

Tabela 11 - Anotação da textura dos calos e da presença de raízes ($\bar{x}$) na interação dialélica 6-BA/AIA (dialélico I). Esta anotação como as demais foi feita após 50 dias de cultivo no escuro..... 205

Tabela 12 - Anotação de textura dos calos e presença de raízes ($\bar{x}$) na interação dialélica C/AIA (dialélico II), utilizando-se como fonte inicial de explante cotilédone do material vegetal 1..... 206

Tabela 13 - Anotação da textura dos calos e presença de raízes ($\bar{x}$) na interação dialélica 6-BA/ANA (dialélico II),,utilizando-se como fonte inicial cotilédone de materiais vegetais 1 e 2..... 207

Tabela 14 - Anotação da textura dos calos e presença de raízes ($\bar{x}$) na interação dialélica C/ANA (dialélico IV) utilizando-se como fonte inicial cotilédone do material vegetal 1..... 208

Tabela 15 - Anotação da textura dos calos e presença de raízes ($\bar{x}$) na interação dialélica 6-BA/2,4-D (dialélico V). Fontes iniciais: cotilédone do material vegetal 1 e material vegetal 2..... 209

Tabela 16 - Cultura Primária:

Tabela 16.1 - Efeito do tipo e concentração de auxinas na regeneração de *Lycopersicon esculentum* Mill. 210

Tabela 16.2 e 16.3 - Cultura primária, relação entre número de calos formados e calos regenerados. Cultivo em meio primário padrão To-M_3 (MS + 6-BA 10μM + AIA 25μM). Explantes iniciais: cotilédone (Tabela 16.2) e folha definitiva (Tabela 16.3)..... 213 214

Tabela 17 - Condições de cultivo de submeristema 215

Tabelas 18 a 28 - Avaliação geral dos experimentos realizados para variação somaclonal durante os anos de 1982 e 1983, tomate de indústria.

Tabela 18 - Cotilédone de planta multiplicada 230

Tabela 19 - Cotilédone de planta regenerada R_1 230

Tabela 20 - Caule de planta multiplicada..... 231

Tabela 21 - Caule de planta regenerada R_1..... 231

Tabela 22 - Folha definitiva de planta multiplicada..... 232

Tabela 23 - Folha definitiva de planta regenerada R_1..... 232

Tabela 24 - Folha de estufa de planta multiplicada. 1ª etapa..... 234

Tabela 25 - Folha de estufa de planta multiplicada. 2ª etapa..... 235

Tabela 26 - Folha de estufa de planta regenerada R_1. 2ª etapa..... 235

Tabela 27 - Folha de estufa de planta multiplicada. 3ª etapa..... 236

Tabela 28 - Folha de estufa de planta regenerada R_1. 3ª etapa..... 236

Tabelas 29 a 31 - Correlação do número total de plantletes por experimento com o número das plantletes enraizadas, perdas destas na fase de enraizamento e a climatação e com a sobrevivência (nº de plantas no solo).

Tabela 29 - Explante inicial: cotilédone..... 240

Tabela 30 - Explante inicial: folha definitiva..... 242

Tabela 31 - Explante inicial: caule..... 244

Tabela 32 - Avaliação da freqüência (expressa em porcentagem) de estruturas anômalas, a partir de diferentes explantes iniciais, considerando-se: enraizamento; perdas na fase de enraizamento e na fase de aclimatação e sobrevivência (plantas no solo)..... 255

Tabelas 33 a 38 - Acompanhamento, no campo, das plantas regeneradas.

Tabela 33 - Plantas regeneradas a partir de cotilédone..... 261

Tabela 34 - Plantas regeneradas a partir de folha definitiva..... 263

Tabela 35 - Plantas regeneradas a partir de caule..... 264

Tabela 36 - Avaliação das características vegetativas e reprodutivas de plantas regeneradas..... 265

Tabela 37 - Proporção de frutos obtidos em relação às plantas regeneradas. Tabela 37.1. Em relação a material vegetal. Tabela 37.2. Em relação a explante inicial..... 266

Tabela 38 - Acompanhamento, no campo, das plantas regeneradas.Plantas no campo após ciclos in vitro..... 268

Tabela 39 - Resultados dos experimentos com filtrado de cultura de *A.solani* e sua utilização como pressão de seleção in vitro. Obtenção de filtrados estéreis de cultura de *A. solani* isolado Santa Eliza..... 291

Tabela 40 - Resultados dos experimentos com filtrado de cultura de *A.solani* e sua utilização como pressão de seleção in vitro. Escala por índice de resposta fitotóxica de *A. solani* em relação ao período de permanência do fungo em meio líquido..... 301

Tabela 41 - Resultados dos experimentos com filtrado de cultura de *A.solani* e sua utilização como pressão de seleção in vitro. Efeito de condições ambientais na atividade fitotóxica do filtrado de cultura de *A.solani*, isolado Santa Eliza..... 308

Tabela 42 - Resultados dos experimentos com filtrado de cultura de *A.solani* e sua utilização como pressão de seleção in vitro. Efeito em regeneração do tipo de esterilização e de concentração do filtrado de cultura do fungo cultivado em meio líquido natural (1º experimento de pressão de seleção). Tabela 42.2. Explante inicial: recém- 313
inoculado. Tabela 42.3 - Explante inicial: calo de 12- 316
15 dias de idade. Tabela 42.3 317

Tabela 43 - Resultados dos experimentos com filtrado de cultura de *A. solani* e sua utilização como pressão de seleção in vitro. Pré-seleção ao fungo *A. solani* isolado Santa Eliza. Análise estatística do tempo de regeneração (dias) em relação ao tipo de esterilização e diluição ao filtrado de cultura obtido após 19 dias de cultivo do fungo em meio líquido natural (1º experimento de pressão de seleção)..... 326

Tabela 44 - Resultados dos experimentos com filtrado de cultura de *A. solani* e sua utilização como pressão de seleção in vitro.
1º Experimento: Efeito do tipo de esterilização e de diluição do filtrado obtido a partir do fungo cultivado em meio líquido natural. Avaliação qualitativa. Destino das plantas regeneradas desde a individualização até o florescimento e frutificação no campo. Cada planta, com o código próprio, é individualmente relacionada com o calo que a originou, estádio de regeneração e período que ocorreu floração e frutificação no campo.

Tabela 44.1 - Filtrado esterilizado por uma série decrescente de membranas de Millipore (8 a 0,44 micra) e utilizado in vitro nas diluições de: 50; 25 e 10%. Controle - meio líquido natural diluído 20% v/v .. 333-335

Tabela 44.2 - Filtrado esterilizado por autoclavagem (120°C por 20 minutos) e utilizado in vitro nas diluições de: 100; 50 e 20%. Controle - meio normal padrão..... 336-342

Tabela 45 - Pré-seleção com filtrado de *Alternaria solani*. Efeito do tipo de esterilização e de diluição do filtrado .. 343

Tabela 46 - Resultados dos experimentos com filtrado de cultura de *A. solani* e sua utilização como pressão de seleção in vitro. Regeneração in vitro em presença de filtra-

dos estéreis de cultura de *A. solani*, isolado Santa Eliza 385

Tabela 47 - Resultados do teste de resistência pelo método de estacas de tomateiro 389

Tabela 48 - Esquema das plantas testadas para resistência in vivo com filtrado de cultura de *A. solani* 401

Tabela 49 - Comparação dos testes de fitotoxicidade empregados (estacas x discos) 450

ABREVIATURAS

REGULADORES DE CRESCIMENTO (RC_s)

Auxinas

AIA: ácido 3 indol-acético

ANA: ácido 2 naftaleno-acético

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Citocininas

6-BA: 6-furfuril-aminopurina

C: 6-furfuril-adenina

Giberelinas

GA_3: ácido giberélico

MEIOS DE CULTURA

MS: MURASHIGE & SKOOG (1962)

To-M_3: Meio padrão de regeneração do tomate - Meio salino e orgânico MS acrescido de RC_s (AIA 25μM e 6-BA 10 μM), sem pressão de seleção.

To-A: Meio de regeneração do tomate com pressão de seleção (filtrado de cultura *A.solani*)

OUTROS

I.C. - Índice de crescimento

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

RESUMO

O presente trabalho trata da utilização das técnicas de cultura de tecidos para obter-se plantas de tomateiro geneticamente superiores às plantas doadoras, explorando-se: a) variabilidade genética do material vegetal e b) pressão de seleção com filtrados de cultura de *Alternaria solani*, agente causal da doença Pinta-preta. Foi necessário estudar-se, para tanto, o tomateiro (hospedeiro) e o fungo (patógeno).

No caso do tomateiro, foram utilizados acessões de banco de germoplasma e cultivares de tomate comercial, principalmente de indústria. Foram dados a estes materiais vegetais, dois enfoques principais: obtenção de plantas, quer diretamente, quer pelo processo de regeneração e, observação no campo (*in vivo*) da estabilidade das características selecionadas com a técnica de cultura de tecidos.

Para obtenção de plantas, diretamente, observa-se que, para submeristema, a citocinina 6-BA revelou-se eficiente (0.5µM). Foram feitas combinações dialélicas na interação de AIA e 6-BA, utilizando-se, para ambos os fitorreguladores, as concentrações de 0,0; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,50 µM. Foram obtidas plantas perfeitamente desenvolvidas, em tudo se assemelhando ao fenótipo da planta doadora, sem necessidade de adição extra de fitorreguladores, a partir de submeristema. Resultados do efeito de condições de cultivo na obtenção direta de plantas mostraram que intensidade luminosa alta e luz natural favoreceram o desenvolvimento *in vitro* de plantas a partir de ápices caulinares excisados.

Quanto à regeneração, verificou-se que, qualitativamente, esta não foi afetada pela origem da fonte de explante (cotilédone x folha definitiva).

Testou-se, no meio básico, diferentes combinações dialélilas de citocininas (6-BA e C = 0,5-10,0 µM) e auxinas (AIA = 10-100 µM; ANA = 2,5-50,0 µM; 2,4-D = 0,25-5,00 µM). Verificou-se que os melhores índices de crescimento (estatisticamente signifi-

cativos), textura de calos e regeneração, foram observados na combinação de AIA x 6-BA. Na presença de 6-BA (10 μM) AIA (25 μM) obteve-se o mais alto I.C., calos de textura friável e coloração creme, e maior freqüência de regeneração. Entre as citocininas testadas, 6-BA foi mais efetivo do que C e a concentração de 10uM apresentou sempre os melhores resultados nos dialélicos estudados. Entre as auxinas, o AIA foi superior em relação a ANA e 2,4-D , considerando-se proliferação de calos e regeneração com plantas com ápice.

Quanto ao efeito do explante inicial na regeneração observou-se que, de modo quantitativo, a porcentagem de regeneração em cultura primária de explantes obtidos de plântulas estéreis foi acentuadamente maior com cotilédone do que com folha definitiva e caule. O acompanhamento das regenerações, desde o isolamento, classificação nos estádios de regeneração, enraizamento, aclimatação, até a sobrevivência no solo, parece indicar que a sobrevivência no campo das plantas regeneradas não esteve diretamente ligada ao número total de regenerações obtido, mas, sim, a um aumento de sobrevivência das plantas regeneradas no estádio 4. Esta sobrevivência foi progressivamente maior a partir de cotilédone, folha definitiva e caule, obtendo-se o maior número de plantas no campo a partir de caule.

A mesma metodologia de regeneração foi empregada em explante de folha de planta de estufa, com resultados inferiores.

As plantas regeneradas do grupo "Petomech", no campo , apresentaram, além das características próprias (crescimento determinado e ausência de "ombro"), as seguintes características : dominância apical, vigor mais pronunciado, acentuação de síntese de autocianinas, principalmente nos bordos foliares, e precocidade de regeneração.

Observou-se que a produtividade destas plantas foi dependente da origem genética do material e das condições fisiológicas do explante inicial. Maior produtividade foi obtida com plantas regeneradas a partir de explante de folha definitiva.

Quanto ao estudo do patógeno observou-se o filtrado do

fungo, obtido através de cultura de colônia micelial de *A. solani* em meio líquido, permaneceu tóxico mesmo na ausência do fungo, o que evidencia ser a ação patogênica deste mediada por metabólitos tóxicos (toxinas) excretadas pelo patógeno. Os experimentos mostraram que, filtrados de cultura só foram estatisticamente patogênicos a partir do 20º dia de incubação em meio líquido Czapek-Dox modificado. A atividade fitotóxica dos filtrados, avaliada pelo método de estacas de tomateiro, se manteve: a) após esterilização por autoclavagem por 20 minutos, a 120ºC e 1 atm; b) após tratamento a ± 5ºC; c) após congelamento por períodos de até dois anos e d) sob condições de luz fluorescente, mas foi reduzida drasticamente sob luz incandescente.

A presença do filtrado de cultura *in vitro*: 1) na fase de indução de calos, promoveu o crescimento, dependendo do período de crescimento do fungo em meio líquido (do 20º ao 30º dia) e 2) na fase de regeneração, ocasionou a regeneração em período de tempo mais curto ("precocidade") nas concentrações de 100% e , principalmente, 50% v/v. Não houve diferença estatística entre os tratamentos de esterilização dos filtrados, desde o isolamento até a sobrevivência das plantas no campo.

Foram realizados testes de resistência/suscetibilidade ao filtrado de culturo do patógeno, no laboratório, através de métodos de: estacas, folíolos e discos. Observou-se que o teste dos discos, no presente trabalho, foi o que apresentou maior acuracidade. Igualmente observado foi que o material "Petomech" mostrou-se mais suscetível que o tomate de mesa ("Ângela").

Os testes de resistência/suscetibilidade, pelo método de discos foliares, foram realizados em plantas regeneradas (gerações R_0 e R_1) obtidas de cultura de tecidos de calos de tomate cv. Petomech em (1) meio básico padrão de regeneração (To-M_3) e (2) o mesmo meio, com a adição de filtrados de cultura de fungo (To-A), filtrados estes previamente testados para fitotoxicidade.

Os resultados mostraram que as plantas obtidas de seleção *in vitro* (meio 2 = To-A) mostraram, estatisticamente, maior resistência, enquanto que, plantas obtidas unicamente do meio

básico padrão (meio 1 = To-M_3) revelaram-se, nos testes, mais suscetíveis, estatisticamente, do que as plantas controle (plantas estas que não sofreram o processo de cultivo *in vitro*).

Assim, conseguiu-se, no presente trabalho, através do processo de pré-seleção *in vitro*, um ganho real na seleção para resistência à doença Pinta-preta do tomateiro, obtendo-se, conseqüentemente, planta geneticamente superior à planta doadora.

SUMMARY

The present report describes the utilization of tissue culture techniques to obtain tomato plants genetically superior to the original donor plants using a) genetic variability of the plant material and b) selection pressure with culture filtrates of *Alternaria solani*, the causal agent of early blight disease. Both the host plant and the fungus were studied.

In the case of the tomato plant, germplasm bank accessions and comercial cultivars, mainly industrial varieties, were used. Two main aspects were studied: production of plants,either directly or by regeneration, and observation in the field (*in vivo*) of the stability of the characteristics selected using tissue culture techniques.

For direct production of plants from submeristems, the best results were obtained using the cytokinin 6-BA (0.5 µM) . Diallelic combinations of IAA and 6-BA using concentrations o f 0.0, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.5 µM for both hormones were tested . Perfectly developed plants, resembling the original donor plant in all respects, were obtained without addition of other phyto - hormones. A study of the effects of culture conditions on direct plant production showed that high light intensity and natural light favour *in vitro* development of plants from excised stem apices.

As far as regeneration is concerned, it was possible to show qualitatively that the origin of the explants used had no effect (cotyledone v. mature leaves). Different diallelic combinations of cytokinins (6-BA and C 0.5 - 10.0 µM) and auxins (IAA 10 -100 µM; NAA 2.5 - 50 µM; 2,4-D 0.25 - 5.0 µM) were tested in the basic culture medium. The best growth indices (statisti - cally significant), callus texture and regeneration were observed in the IAA x 6-BA combination. The highest growth index, with friable, cream-coloured calluses and greatest regeneration frequency were obtained in the presence of 10 µM 6-BA and 25 µM IAA.

Amongst the cytokinins tested, 6-BA was more effective than C and a concentration of 10 µM always gave the best results in the diallelics. For the auxins, IAA was superior to NAA and 2,4 - D, considering callus proliferation and regeneration of plants with apices.

As far as the effect of the initial explant on regeneration is concerned, quantitative observations showed that the percentage regeneration in primary culture from sterile seedlings was markedly greater with cotyledons than with mature leaves and stems. Observations of regeneration at the stages of isolation, classification of regeneration phases, rooting, acclimatization and up to survival in soil, seem to indicate that survival in the field of the regenerated plants was not directly linked to the total number of regenerants obtained , but instead, to the increase in survival of the plants regenerated in stage 4. This survival was progressively greater from cotyledons, mature leaves and stems, with the greatest number of plants in the field obtained from stems.

The same methods were employed with explants from leaves of greenhouse-grown plants, but these gave inferior results.

Plants regenerated from the "Petomech" group showed apical dominance, more pronounced vigour, increased anthocyanin production, especially on the leaf margins, and precocious regeneration besides the determinate growth and absence of a "shoulder" normally characteristic of this variety.

It was observed that the productivity of these plants depend on the genetic origin of the material and on the physiological conditions of the initial explant. The greatest productivity was obtained with plants regenerated from nature leaf explants.

With relation to the pathogen, it was observed that the filtrate obtained from nycelial colonies of *A. solani* in liquid culture remained toxic in the absence of the fungus, showing that the pathogenic action is probably caused by toxic

metabolites (toxins). Experiments whoed that culture filtrates produced statistically significant pathogenic symptoms after 20 days incubation in a modified Czapek - Dox liquid medium. The phototoxic activity of the filtrates, evaluated by the tomato cutting method, was maintained a) after sterilization by autoclaving for 20 min. at 120° C and 1 atm.; b) after treatment at ± 50° C; c) after freezing for periods of up to 2 years, and d) under fluorescent lights, but was drastically reduced under incandescent lights.

In *in vitro* culture, the presence of the fungal culture filtrate promoted growth in the callus induction phase,depending on the growth period of the fungus in the liquid medium (from the 20th to the 30th day). In the regeneration phase, regeneration occurred in a shorter period ("precociousness") at concentrations of 100 and especially at 50% v/v. There was no statistical difference between filtrate sterilization treatments from the isolation stage up to survival of plants in the field.

Laboratory tests of resistance/susceptibility to pathogen culture filtrates were also carried out using cuttings, leaflets and leaf discs. The disc tests gave the most accurate results. The "Petomech" variety was more susceptible than cv. "Angela".

Leaf disc tests of resistance/susceptibility were used to compare regenerated plants (R_0 and R_1 generations) obtained from tissue culture of cv. "Petomech" in 1) basic regeneration medium (To-M3) and 2) the same medium with addition of fungal culture filtrates, previously tested for phytotoxicity (To - A).

The results showed that the plants obtained from *in vitro* selection (medium 2 = To - A) had statistically greater resistance while plants obtained from the standard basic medium (medium 1 = To - M3) were more susceptible in the tests when compared with control plants (plants which had not undergone *in vitro* cultivation).

It has, therefore, been possible, using an *in vitro*

pre-selection procedure, to obtain real gains in selection for resistance to tomato early blight disease, producing plants genetically superior to the original donor plants.

I. INTRODUÇÃO

Dos problemas mundiais atuais, dois merecem atenção especial: a fome e a desnutrição. E se estes são atualmente problemas graves. no futuro, devido ao crescimento populacional, poderão tornar-se muitos sérios. Para ajudar a solucionar o problema, é necessário que se aumente a produção agrícola.

Embora o tomate comestível ocupe no Brasil, o primeiro lugar no setor de hortifrutigranjeiros, tanto em volume como em valor de produção proporcionando cerca de 60 mil empregos diretos, gerando em cruzeiros, está situada apenas no 9º lugar na produção mundial. Enquanto a produção brasileira é de 1.611.009 toneladas métricas , muito inferior às produções dos Estados Unidos e União Soviética , (6.754.000 e 6.210.000 toneladas métricas, líderes mundiais de produção de tomate, segundo KNUT et al. (1984).

A produção menor do tomate no Brasil e em outros países tropicais é devido a vários fatores: não adaptação das variedades comerciais às condições tropicais, falta de práticas de cultivo e alta incidência de pragas e doenças.

Mesmo no Brasil, há variações de produtividade entre os vários Estados, sendo mais alta nos estados do Centro-Sul (1540-1788 Kg/hc),enquanto que os Estados da Região Norte apresentam baixo rendimento (100-400 Kg/hc) devido a ecologia desfavorável e a falta de variedades resistentes às doenças comuns da região.

Nos últimos anos, abriram-se importantes perspectivas de exportação para o Brasil de tomate processado. Para fortalecer esse crescimento na exportação, bem como melhorar a oferta para consumo interno, com consequente diminuição de custo, é de indiscutível interesse desenvolver cultivares de tomate mais produtivos e resistentes às doenças.

Aprofundar a pesquisa de variedades mais produtivas e resistentes às doenças é condição "sine qua non" para o desenvolvimento de todas as potencialidades de tomate-cultura, quer para o mercado interno, quer para o mercado externo.

A obtenção de novas fontes de variabilidade genética é um objetivo constante em todo o programa de melhoramento vegetal. Os métodos de indução e seleção de mutantes são vários, sempre existindo, entretanto, a limitação sobre o número de plantas a serem utilizadas e o espaço experimental disponível. As técnicas de cultivo *in vitro* de plantas superiores permitam a utilização das várias técnicas de genética de microorganismos com a possibilidade potencial de regeneração de novas plantas.

Recentes progressos no campo de cultura de células e tecidos vegetais tem tornado esta área de pesquisa uma das mais dinâmicas e promissoras em biologia vegetal. Culturas *in vitro* estão sendo utilizadas como instrumento de estudo de vários problemas básicos, não apenas em fisiologia vegetal, biologia celular e genética mas, também, na agricultura, silvicultura, horticultura e indústria.

A cultura de células, tecidos e orgãos de plantas é uma técnica que explora a totipotência de células vegetais, ou seja, a possibilidade de regeneração de plantas fenotipicamente idênticas as células em cultura.

O fenômeno de totipotência permite o cultivo de células vegetais não diferenciadas e a sua diferenciação em plantas completa. Este processo de regeneração da parte aérea e de raízes requer uma dosagem ideal de nutrientes presentes no meio de cultura, além de estar baseada na oferta dos fitormônios.

A técnica de cultura de tecidos, tornou-se assim, uma poderosa ferramenta no estudo de exigências nutricionais, do metabo

lismo e da fisiologia de células vegetais.

Técnicas de cultivo *in vitro* permitem amplas formas de abordagem, envolvendo são só simples exploração da variabilidade genética natural presente na planta doadora, exposição de células não diferenciadas a agentes mutagênicos e seleção de células *in vitro* em meio contendo agentes estressantes como alumínio, cloreto de sódio, herbicidas, toxinas de patógenos, etc.

Com seleção *in vitro* linhas de células com fenótipo desejado podem ser selecionados diretamente se o novo fenótipo tem vantagem para crescer sobre condições seletivas. Resistência fenótipa pode ser obtida de seleção direta.

Usando estas técnicas é possível selecionar características genéticas a nível celular (tendo expressividade *in vitro*) e desta maneira isolar novas variantes de importância econômica. Estas variantes poderiam ser usados para obter plantas com a característica desejada (vários mutantes) que apresentam expressividade *in vivo*, pois uma questão importante na utilidade desta manipulação é a conecção das características selecionadas ao nível bioquímico para planta regenerada como característica estável.

Entre características desejáveis selecionadas *in vitro* , recentemente tem tido grande interesse as linhas celulares capazes de regeneração, linhas estas, resistentes aos filtrados de cultura de fungos ou toxinas específicas. Este campo que resultaria num incremento potencial da produção agrícola, é recente, apresenta poucos estudos feitos (MALIGA , 1984) nenhum dos quais no tomateiro (KNUT et al., 1984).

No tomateiro as doenças fungícas são as mais sérias limitações da cultura. As doenças fungícas são, na agricultura mundial, uma grande causa de perda de produção. Considera-se que estas doen

ças destroem anualmente víveres que poderiam alimentar 300 milhões de pessoas.

A mancha de Alternaria, ou pinta preta, doença pelo fungo *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout é encontrada em todas as regiões onde é cultivado o tomateiro, mesmo na Amazônia.Constitui-se, juntamente com a requeima, doença causada pelo fungo *Phytophtora infestans* (mont.) du Bary, nas principais doenças de folhas e frutos do tomateiro. Tanto uma como outra atacam todos os orgãos aéreos da planta, em qualquer estádio.

Enquanto a mancha de Alternaria se manifesta durante os meses mais quentes com alta umidade, a requeima se manifesta durante os meses frios, o que obriga ao agricultor empregar inúmeras medidas de controle, entre as quais pulverizações com fungicidas . Pode-se dizer que, aproximadamente, 10% do total de fungicidas empregados no Estado de São Paulo, vão para as culturas de tomate, resultando num elevado custo de produção desta cultura.

Nosso objetivo, neste trabalho, é com utilização das técnicas de cultura de tecidos obter-se plantas de tomateiro rasteiro geneticamente superiores às plantas doadoras explorando-se: a) variabilidade genética natural e b) pressão de seleção de filtrados de cultura de *A. solani*.

Para que o objetivo seja atingido, é necessário estudar -se tanto o tomateiro (hospedeiro) como o fungo (patógeno). No caso do tomateiro, é necessário as células apresentarem capacidade de regenerar plantas intactas em alto rendimento. O processo de regeneração envolve fenômenos de morfogênese e diferenciação que englobam vários aspectos fisiológicos (notadamente fitormônios e reguladores de crescimento, além de condições de cultivo). O estudo do fungo engloba várias etapas: isolamento, cultivo, manutenção de culturas, cada etapa checada por teste de fitotoxidade.

O estudo do fungo, assim como o processo de pré - seleção *in vitro* do filtrado de cultura, exige embasamento fisio-fitopatológico das relações hospedeiro-patógeno e de produções de metabólitos tóxicos, especialmente toxinas.

A comprovação da obtenção de planta de tomateiro rasteiro geneticamente superior à planta doadora através de cultivo *in vitro* é feita em testes *in vitro* para verificação da estabilidade da característica de resistência selecionada.

II. REVISÃO DA LITERATURA

Lycopersicon esculentum Mill.

1.1. Problemas do Cultivo de Tomate

A produção de tomate nos trópicos é muito menor do que nas zonas temperadas. Este fato pode ser devido a vários fatores: não adaptação das variedades comerciais às condições tropicais, falta de práticas de cultivo e a alta incidência de doenças e pragas (VILLA REAL, 1979).

As sementes de variedades importadas cruzadas para serem usadas nos climas temperados são geralmente as únicas disponíveis aos agricultores nos países tropicais. A produção a partir destas variedades geralmente é baixa e normalmente é errática, especialmente quando o crescimento ocorre durante os meses de verão. Por causa disto, a produção de tomate nos trópicos é caracterizada pela estacionalidade extrema e baixas produções. Os mercados tropicais têm flutuações estacionais típicas no preco e suprimento de tomate fresco ao mercado. O uso de variedades não adaptadas é uma das restrições de produção que limitam a produção do tomate tropical (VILLA REAL, 1979). A falta de práticas culturais adequadas tanto durante

a estação úmida como a estação seca é outra barreira para a produção bem sucedida de tomate tropical. Algumas das barreiras mais críticas, especialmente durante a estação úmida, são: a rápida multiplicação das pragas e insetos, doenças e ervas daninhas, alta temperatura e chuvas pesadas.

Nos trópicos, tomate, como a maioria das culturas de hortaliças, são normalmente produzidos em regiões montanhosas ou em terras baixas durante a estação fria.

As áreas tropicais da África, Ásia e América Latina têm muitos problemas em comum com cultivares de tomate. Por exemplo, a murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum* (Smith) Down), é uma doença séria do tomate em áreas úmidas, incluindo países temperados amenos, semi-tropicais e tropicais. É predominantemente uma doença de terras baixas que se desenvolve em temperaturas relativamente altas (VILLAREAL, 1979).

A requeima (*Phytophthora infestans* (Mont.) du Bary), por outro lado, é uma doença muito comum em terras altas mais frescas. O patógeno multiplica-se rapidamente e a proporcões epifitóticas durante as noites frescas e dias moderamente quentes com umidade abundante. Usando-se variedades adaptadas se minimizará os riscos de crescer tomates em terras baixas ou altas em qualquer estação.

Essas doenças são comuns a todas as áreas tropicais. Assim, é impossível escapar dos efeitos de doenças restringindo a área ou zona climática de cultivo. A única saída é desenvolver resistência local.

A seleção para doenças observadas nas zonas temperadas e tropicais também é diferente. Enquanto que na área tropical a seleção é feita para resistência à murcha bacteriana, cujo controle é extremamente difícil, na Califórnia, obtiveram-se cultivares resis

tentes a murcha de origem fúngica (*Fusarium* e *Verticilium*) de tal forma que as plantações daquele estado americano são principalmente limitadas a estes cultivares resistentes a murcha de origem fungal(RICK, 1978; VILLAREAL, 1979).

O ponto crítico no cultivo de tomate realmente é a alta incidência de um grande número de doenças infecciosas, causadas por fungos, bactérias e virus, muitas das quais dependendo das circunstâncias podem se constituir em fator limitante da cultura. Em muitos casos, mesmo com adição de medidas de controle, elas podem determinar a migração da cultura.

Nas condições brasileiras as principais doenças que afetam o tomateiro, segundo GALLI e TOKESHI (1979) são as que seguem:

I. Requeima - *Phytophthora infestans* (Mont.) du Bary

Nas nossas condições, a requeima passou a constituir problema a partir de 1950; sua importância aumenta ano após ano, havendo períodos em que causa destruição total de culturas mal conduzidas. Nos meses mais frios e úmidos, é a principal doença de fungo do tomateiro.

As raças do patógeno que afetam o tomateiro são diferentes das que ocorrem sobre batata, sendo mais freqüentes as raças 1-2 e 3-4.

As variedades resistentes disponíveis não se comportam como tais, frente às raças locais de *P. infestans*, pelo que, o uso destas variedades não é recomendável nas nossas condições.

II. Mancha de estenfilium - *Stemphylium solani* Weber

É de ocorrência generalizada em todas as áreas do país onde se cultiva o tomateiro. No geral, é responsável pela destruição das folhas dos ponteiros, encurtando o ciclo da planta com acentuada queda da produção. Se constitui problema durante os meses de verão, com chuvas abundantes e umidade relativa alta.

Diversas variedades de tomate de mesa do tipo caqui são resistentes à doença. Entretanto, dadas as exigências do mercado não podem ser utilizadas em grande escala. Tomates do tipo de Santa Cruz são sensíveis a esta doença.

III. Mancha de alternaria ou pinta preta - *Alternaria solani* Ell. & MARTIN) Jones & Grant

É doença encontrada em todas as regiões onde são cultivados o tomateiro. No Brasil, sua distribuição é generalizada,variando apenas o grau de incidência. Juntamente com a requeima de *Phytophthora*, constituem as principais doenças das folhas e frutos do tomateiro. A sua importância cresce durante os meses mais quentes com alta umidade, passando a ser um dos maiores problemas de cultura. Nessas condições é comum a destruição completa de culturas em qualquer idade da planta.

Outras doenças também ocorrem, septoriose ou mancha septoria, murcha de fusarium, murcha de verticilium, bolor cinzento do fruto, murcha bacteriana, etc.

1.2. Taxonomia

O tomate cultivado é uma das espécies pertencentes ao gênero *Lycopersicon* Mill (x = 12). Este pequeno gênero compreende pequenas ervas, geralmente perenes, mas que podem crescer, florescer e frutificar em cinco meses ou menos (PURSEGLOVE, 1976; RICK, 1976).

Com exceção de *L. esculentum*, que é o tomate cultivado, e *L. cheesmanii* Ryley, que é endêmico das ilhas Galápagos, espécies deste gênero crescem em estado selvagem numa faixa estreita que se estende do Equador ao norte do Chile. O gênero algumas vezes é incluído em *Solanum* que é o gênero mais intimamente relacionado (e provavelmente seu ancestral) mas do qual difere por ter folhas sempre pinadas ou pinatífidas e as anteras se projetam em um ápice estreito esteril e com deiscência longitudinal, a característica da deiscência das anteras difere os dois gêneros (PURSEGLOVE, 1976 & RICK, 1976).

Ocorrem dois sub-gêneros (PURSEGLOVE, 1976):

1. *Eulycopersicon* com duas espécies comestíveis de frutos avermelhados quando maduros, *L. esculentum* Mill.e *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. Os frutos desta última têm cerca de 1 cm de diâmetro, suas sementes são glabras, e esta espécie ocorre selvagemente no Peru e Equador, onde ocorreram hibridização natural e introgressão com *L. esculentum*. Cruzamentos artificiais também foram feitos para produzir-se cultivares que mostram resistências a certas doenças, provocadas por fungos, como a murcha de fusarium e a marcha de estilfilium. Em ambos os casos *L. pimpinellifolium* foi a fonte de resistência.

2. *Eriopersicon* com frutos verdes quando maduros.

L. cheesmanii Riley

L. grandulosum C.H.Muller

L. hirsutum Humb & Bonpl.

L. peruvianum (L.) Mill.

A espécie *L. peruvianum* foi a fonte de resistência para o nematóide *Meloidogyne* spp. de galhas de raízes, muito comum em tomate. Os trabalhos de criação de variedades resistentes ao virus Y no tomateiro cultivado, feitos em Campinas, usam *L. peruvianum* (uma espécie altamente polimórfica) como fonte de resistência (GALLI & TOKESHI, 1979).

Segundo PURSEGLOVE (1976) se reconhecem algumas variedades do tomate cultivável, *Lycopersicon esculentum* (2n = 24).

- var. *cerasiforme* (Dun.) Alef., tomate-cereja, que ocorre selvagem no Equador e Peru e que agora se espalhou pelo mundo, se naturalizou em alguns países tropicais. Tem folhas 5-partidas, frutos pequenos, cerca de 2 cm de diâmetro, vermelho ou amarelo, bilobular.
- var. *pyriforme* Alef. tomate-pera, com frutos em forma de pera com folhas 5-partidas. Crescimento indeterminado. Apropriado às condições adversas.
- var. *commune* Bailey, tomate comum. Folhas usualmente 6-partidas. Crescimento indeterminado.
- var. *grandifolium* Bailey tomate com folhas de batata, com folíolos grandes e inteiros.
- var. *validum* Bailey tomate ereto. Plantas resistentes, eretas e muito compactas. Crescimento determinado.

Mas este mesmo autor afirma que alguns especialistas só reconhecem a var. *cerasiforme* e forma *pyriforme* com entidades distintas dentro da espécie.

Uma planta com crescimento "indeterminado" de tomate produz, ao mesmo tempo, flores e frutos em vários estágios de maturidade e cresce até ser morta pelo frio. O crescimento indeterminado é uma característica normal. Já a planta com crescimento determinado, cujo hábito é codificado por um gene recessivo sp, ao invés de cada segmento do eixo principal por três nós foliares e uma única inflorescência, o caule determinado desenvolve progressivamente menos nós por segmento e se termina com uma inflorescência. As plantas maduras determinada e indeterminada têm formas diferentes: a planta normal (indeterminada) cresce indefinindamente, enquanto a planta sp. (determinada) cobre menos área, se limita a forma circular simétrica devido ao término de seus ramos numa distância fixa a partir do centro (RICK, 1978).

Embora o tomate consumido se situe largamente entre os cultivares de *L. esculentum*, frutos da variedade selvagem *cerasiforme* e de *L. pimpinellifolium* são cultivadas em extensão limitada. Os frutos de outras espécies, quando comparados aos de *L. esculentum* , são menos atrativos em cor e sabor e a maioria das pessoas os consideram desagradáveis. Mas estas espécies têm um valor potencial por causa da diversidade de seu germoplasma, pois é a partir destas espécies que genes tanto para resistência às várias doenças, como para melhorar a coloração e qualidade do fruto foram cruzados e introduzidos nas formas cultivadas. Muitos cultivares, que foram desta forma melhorados, como os obtidos em relação a resistência à doenças, crescem em grande escala (RICK, 1978).

No gênero *Lycopersicon* todas as espécies são semelhantes no número de cromossomos (2n = 24). Tanto a morfologia destes como

a citologia dos híbridos interespecíficos F_1 não mostraram evidências de diferenças estruturais. Poucos casos de autoploidia espontânea foram relatados (RICK, 1976).

L. esculentum e seus parentes próximos são auto-férteis. Esta espécie apresenta polinização cruzada na região nativa e em certas outras áreas sub-tropicais, mas, nas outras regiões esta espécie é quase completamente auto-polinizada com uma taxa até superior a 98% (AVRDC'78). Durante os últimos 50 anos de cruzamento intensivo a estrutura floral desta espécie evoluiu para aumentar a capacidade de produzir frutos na ausência de polinização cruzada. Intencionalmente ou não, a posição do estigma mudou marcadamente. Seus pais selvagens mais próximos,os cultivares da América Latina, tendem a ter estigmas bem protuberantes, pois como não podem se reproduzir por auto-polinização, a polinização cruzada por insetos é facilitada pela posição do estigma (RICK, 1978). Se estes tipos são cultivados em áreas distantes do seu ambiente nativo, nas quais faltam os insetos polinizadores apropriados, o estabelecimento de fruto é diminuído consideravelmente. Assim, quando o tomate foi primeiramente introduzido na Europa, uma seleção intensiva seria esperada para estigmas menos protuberantes. Cultivadas, em estufa, a seleção seria ainda mais forte porque são excluídos tanto os insetos como as vibrações introduzidas pelo vento, os quais podem ajudar na polinização. Como resultado, o estigma da maioria dos cultivares tornou-se fixo na entrada do tubo de anteras. Durante a última década, a posição do estigma destacou-se novamente, para um nível mais inferior, bem para dentro do tubo da antera. Esta mudança, que aumentou ainda mais a auto-polinização e, conseqüentemente, o estabelecimento de fruto e eliminando praticamente a polinização cruzada, tem sido incorporado nos cultivares pioneiros da Califórnia, o estado produtor dominante nos EUA, sendo que o rendimento destes cultivares representa uma porção substancial de suprimento

mundial de tomates (RICK, 1976 e 1978).

Com a abertura da corola, inicia-se o período de receptividade dos estigmas, mas só decorridas 24 a 48 horas principia-se a deiscência dos estames. Assim, a fecundação encontra-se assegurada. A germinação do pólen é muito lenta e, como resultado, a verdadeira e adequada fecundação ocorre 2 dias após se ter verificado o primeiro contacto do orgão masculino com o estigma. O modo de ocorrência dos fatores climáticos pode comprometer facilmente a fecundação da do que, na melhor das hipóteses, esta não pode concluir-se antes de terem decorrido 3 dias a partir da abertura da corola. A chuva, o vento e as temperaturas inferiores a 12°C e superiores a 36°C podem comprometer a formação do fruto (ANDERLINI, 1982).

L. esculentum pode-se hibridizar com outras espécies do gênero a assim receber genes recessivos. Desta maneira numerosas características desejáveis podem ser assim transmitidas e incorporadas em cultivares aceitáveis (RICK, 1976).

As características desejadas em vários países tropicais incluem: plantas compactas; frutos de cor uniforme; tamanho do fruto; precocidade; resistência múltipla à doenças, incluindo nematóides; resistência ao rachamento do fruto; tolerância ao calor; alto conteúdo de vitaminas, particularmente em vitamina C; cultivares à colheita mecânica (PURSEGLOVE, 1976; AVRDC'78 Report).

Resistência à doenças é usualmente controlada por um gene único dominante e tem sido obtida por cruzamentos interespecíficos. *L. esculentum* não se cruza facilmente com as espécies da seção *Eriopersicon* do gênero, mas cruzamentos podem ser feitos quando estas últimas espécies são usadas como o pai doador (♂). Híbridos F_1 só podem cruzar em retrocruzamento com o *L. esculentum* quando estes são usados como os pais doadores (♂) e em retrocruzamento com o pai selvagem quando os híbridos são usados como pais receptores (♀) .

Muitos dos híbridos interespecíficos são auto-incompatíveis. As espécies da seção *Eriopersicon* apresentam características altamente vantajosas, Por exemplo, *L. peruvianum* é resistente a um número de doenças e ao nematóide causador da galha de raiz e tem um alto conteúdo de vitamina C. *L. hirsutum* é resistente a mancha de septoria ou septoriose (PURSEGLOVE, 1976).

A grande diversidade entre e dentre as espécies de tomate promete muitos avanços na área de melhoramento. Um caso é o de alta tolerância a sais que foi descoberta em tipos de *L. cheesmanii* que desenvolve-se nas praias das ilhas Galápagos, apenas a 2 metros acima da linha da maré alta e 5 metros longe desta. Testes fetios por RUSH & EPSTEIN (1976) da Universidade da Califórnia em Davis,demonstraram que estas formas sobrevivem em água do mar, enquanto que as variedades cultivadas morrem se a concentração da água do mar exce de 50%. Estes autores também encontraram que a tolerância ao sal está também nos tecidos da planta e não provém de nenhuma barreira à absorção ou ao movimento do sódio na planta, refletindo uma tolerância ao sódio que se situa ao nível celular. Há outro avanço, este no campo de obtenção de produtos naturais de interesse econômico. Exemplo deste caso seria o inseticida normal (2-tridecanona) produzido por *L. hirsutum f. glabratum* (in KUT et al., 1984).

Como já foi dito anteriormente com a expansão de tomate para o Velho Mundo esta espécie tornou-se quase inteiramente auto-polinizada. Genes recessivos foram expostos e fixados dando origem a várias formas diversas. Por causa da auto-polinização muitos cultivares são linhagens puras e se mantém assim em cultura. Cruzando-se estes cultivares obtém-se heterose e se produz, então, a semente híbrida F_1. Estão sendo feitas tentativas para cruzar pais adequados com esterilidade citoplasmática masculina, que poderiam reduzir o custo da produção da semente híbrida F_1; também pode ser este

rilizado o pólem do pai receptor (♂) por meios químicos. Tetraplóides, triplóides e haplóides podem ser produzidos artificialmente e podem ocorrer naturalmente, mas não frutificam bem (PURSEGLOVE, 1976).

1.3. Estudos Genéticos

O tomateiro se tornou por uma série de razões uma espécie muito estudada em estudos genéticos. Entre as suas características úteis para os estudos genéticos estão: a alta taxa de autopolinização, o que leva a expressão precoce das mutações recessivas; a facilidade de hibridizações controladas, e a falta de duplicação gênica na arquitetura genética da planta. Além disso, é uma planta fácil de ser cultivada, tem um ciclo de vida curto e produz grandes quantidades de sementes. Outra grande vantagem para estes estudos é o estágio paquiteno da meiose favorável, o que torna possível a identificação de cada um dos 12 cromossomos de planta e seus braços. As pesquisas produziram mapas cromossômicos que se situam entre os melhores obtidos para plantas superiores (RICK,1978).

A pesquisa da natureza da variabilidade genética de *L. esculentum* facilitou o cruzamento das formas melhoradas desta espécie, além de através desta ter-se obtido uma nova luz em relação a evolução das formas cultivadas. Estes estudos têm-se baseado amplamente em variações facilmente detectadas em: forma das plantas e folhas; forma e coloração do fruto e em muitas outras características morfológicas. Recentemente, foi feito um progresso considerável estudando-se alelos, ou variantes, de alguns exemplos dos 15 genes que codificam a síntese enzimática, a qual é rapidamente detectada pela eletroforese amido-gel (RICK, 1978).

Os desenvolvimentos modernos de separação e identificação de isoenzimas forneceram um instrumento de inquestionável precisão para medir a variação genética. A utilidade deste método para comparar espécies do gênero do tomate (*Lycopersicon*) é aumentada pela característica adicional que a análise genética das progênies de hibridização controlada permite identificação dos loci genéticos e seus alelos componentes, cujos produtos imediatos são as aloenzimas. Em tomate, tem sido estabelecida a capacidade das aloenzimas de indexar confiavelmente a variação devido ao fato que os resultados são concordantes com observações da variação nas características morfológicas e fisiológicas de todas as espécies até agora investigadas: *L. cheesmanii*, *L. chmielewskii* *L. pervi florum*, *L. hirsutum* e *L. pimpinellifolium*. Estudos com outras espécies, embora ainda não completos, visualizam aproximadamente padrões de variabilidade como destas espécies (RICK, 1979).

Possivelmente, a maior realização dos estudos genéticos foi obtida na área de resistência à doenças. Os pesquisadores utilizando as várias fontes de germoplasma encontraram resistência para 12 patógenos sérios. Além disso, é impressionante a lista de cultivares melhorados aceitáveis que possuem estas resistências . Como exemplo, certos cultivares híbridos F_1 importantes têm sido cruzados para resistências de cinco a oito doenças diferentes cada um, baseando-se na manipulação inteligente de um número até maior de genes correspondentes. O papel dos taxons selvagens como fonte de tais genes é particularmente importante (RICK, 1979).

1.3.1. Formas cultivadas de *L. esculentum*

A maior fonte de variação usada até agora para o melho

ramento de tomate tem se constituído das formas cultivadas de *L. esculentum*, incluindo tanto linhas de cruzamento como categorias de cultivares (RICK, 1979). O maior banco de germoplasma de tomate (cuja coleção em 1978 alcançou 4755 cultivares) tem cerca de 90% das suas acessões de *Lycopersicon* de *L. esculentum* e os 10% restantes dos seus parentes selvagens, principalmente *L. pimpinellifolium*, *L. cheesmanii* e *L. hirsutun* (AVRDC 78' Report; VILLAREAL. 1979).

Mas as limitações das fontes cultivadas são particularmente evidentes nas tentativas de se obter resistência a pestes e para melhorar cor, odor e outros componentes qualitativos. Entretanto, é digno de nota que alguns dos resultados mais espetaculares tem sido obtido explorando-se mutações monogênicas espontâneas. Possivelmente, o mutante de maior impacto econômico é aquele que condiciona o hábito de planta com crescimento determinado ou de auto-podação (*"self-pruning"* sp.). Plantas determinadas são compactas com crescimento restrito e floração concentrada. A conseqüência agronômica de sp é uma forma de planta mais adequada ao mesmo tempo ao cultivo, ao manuseio, a colheita mecânica e uma maior frutificação do que a permitida pelo hábito indeterminado (RICK, 1979).

O gene sp apareceu como uma mutação espontânea na Flórida em 1914 e tem sido extensivamente usado nos programas de melhoramento de tomate.

Outro gene mutante que foi introduzido em novos cultivares em atividade intensiva de cruzamento nos últimos 40 anos, é o gene (*"uniform ripening"* - amadurecimento uniforme). Este gene recessivo elimina o "ombro" verde escuro do fruto não maduro, impedindo assim a retenção indesejável de clorofila nesta parte do fruto maduro (RICK, 1978).

São ainda estudados genes: que impedem a abscisão precoce do fruto (j), que intensificam a cor do fruto (hp); que parcialmente suprimem a síntese de β-caroteno (og^c); que inibem a maturação do fruto (nor ou rin); que promovem o desenvolvimento do fruto partenocárpico (pat e pat-2). Neste último caso, uma interessante aplicação possível da partenocarpia hereditária é aumentar a produção dos autotetraplóides até agora altamente infrutíferos (RICK, 1979).

Os genes podem corresponder a um único loco , como o u (loco 14 do cromossoma nº 10), como o j (loco 17 do cromossoma 11), como também, em um único loco , pode haver controle de várias características. É o caso do loco 94 do cromossoma nº 6, cujo gene B modifica para cor laranja, og^c suprime a síntese de β-caroteno e o gene sp torna a planta "determinada" (RICK, 1978).

A variabilidade genética de *L. esculentum* é limitada, e quando comparada com os taxons selvagens é mínima. A extenção destas limitações pode ser delineada pelas comparações da variação aloenzimática (RICK, 1979).

A maioria dominante dos cultivares do tomate cultivado são monomórficos para alguns dos 25 loci que codificam as isoenzimas. As exceções consistem de 7 alelos, quatro dos quais são limitados à faixa nativa do gênero na região central dos Andes. Essencialmente a mesma situação prevalece para a variedade *cerasiforme*, o antecessor provável da forma cultivada. Diferentemente são as situações das espécies selvagens. Em *L. cheesmanii*, 14 alelos variantes foram detectados nos 8 dos 14 loci testados, 41 alelos variantes para todos os 11 testados. Em *L. pimpinellifolium* onde dificilmente dois indivíduos têm o mesmo genótipo em certas popula

ções e é de espécie obrigatoriamente auto-incompatível (de polinização cruzada), a extensão da variação aloenzimática é ainda maior. Por esta medida, *L. esculentum* cultivado, particularmente o material fora da região dos Andes, é depauperado em variabilidade quando comparado com os taxons selvagens (RICK, 1979).

Não é difícil entender a notável uniformidade genética das formas cultivadas de *L. esculentum* na região fora dos Andes. Como sugerido por RICK & FOBES, em 1975, a migração de *L. esculentum* var.*cerasiforme*, de sua região nativa andina até o México por uma grande distância foi indibitavelmente acompanhada por uma restrição freqüente do tamanho da população. Este mesmo tipo de restrição deve ter sido indubitavelmente experimentado durante a domesticação no México e passagem do tomate para a Europa. Estas passagens sob pressão de seleção (princípio de "Founder") tendem a reduzir a variabilidade genética. A autogamia reforçada pela falta de polinizadores adequados nas regiões não nativas deveria ter conduzido a fixação rápida dos genes, posterior diminuição da variabilidade genética, e conseqüentemente à uniformidade extrema.

1.3.2. Espécies Selvagens

Devido a variabilidade genética restrita dos cultivares do tomate cultivado é importante avaliar o potencial genético dos taxons selvagens, incluindo o antecessor (var. *cerasiforme*) e as outras espécies do gênero *Lycopersicon*. A importância deste grupo é mostrada, resumidamente, pela lista dos genes que contribuiram para resistência de várias doenças sérias do tomate. As 12 doenças que se seguem são listadas conforme a espécie que foi fonte da resistência (RICK, 1979). Esta lista pode ser vista na TABELA 1.

TABELA 1 - FONTES DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS, ENCONTRADAS EM ESPÉCIES SELVAGENS DE *LYCOPERSICON*.

FONTE DE RESISTÊNCIA	DOENÇA	PATÓGENO
A) *L. esculentum* var. *cerasiforme*	antracnose	espécies de *Colletotrichum* especialmente *Colletotrichum phonoides* (Sacc) (Chestry)
	mancha de alternaria ou pinta preta-murcha de - verticillium	*Alternaria solani* (Ell. & Martin) Jones & Grout *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berth
E) *L. chilense*	Broto crespo	*Ruga venerlosans* Casner & Bennet (no Brasil, *R.brasiliense* *R.solanaceanum*)
	Bolor cinzento do fruto	*Botrytis cinerea* Pers.
C) *L. hirsutum*	Septoriose ou mancha - septoria	*Septoria lycopersici* Speg.
	Raiz cortiça	*Pyrenochaete tenstris*
D) *L. peruvianum*	Galha da raiz mosaico comum	*Meloidogyne incognita* *Marmor tabaci* H. (T.M.V.)
B) *L. pimpinellifolium*	murcha de fusarium	*Fusarium oxysporium* F. *lycopersici* Snyder & Hansen
	mancha de estenfilium	*Stemphylium solani* Weber
	mancha do cladosporium	*Cladosporium fulvum* Cooke

Fonte de resistência segundo RICK (1979)

Doença e patógeno segundo GALLI & TOKESHI (1979).

1.4. Estudos Fisiológicos (especialmente em relação ao alumínio)

O tomateiro é uma espécie muito estudada em vários aspectos da fisiologia vegetal. Um destes aspectos é o alumínio trocável.

O problema significativo da toxicidade do Al^{+++}, associada a solos ácidos, é que esta toxicidade tem grande importância nas áreas tropicais. Assim, a maioria dos solos do mundo não está ainda em cultivo por terem alto teor de Al trocável (MEREDITH, 1978a).

No Brasil, onde a área do cerrado é estimada entre 1,5 a 2 milhões de Km^2, entre 1/4 e 1/5 do território nacional, 4 a 5 vezes a área cultivada, o problema é grave, pois é a presença do alumínio nessas regiões que condiciona a vegetação do cerrado, pois neste habitat as plantas foram selecionadas por sua tolerância ao Al, nenhuma delas sendo sensível e muitas plantas acumulando-o facultativamente ou obrigatoriamente (GOODLAND, 1971; MALAVOLTA et al., 1976).

O trabalho de levantamento e reconhecimento de solos do Estado de São Paulo (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1960), concluiu que apenas 20% de sua área não apresenta problemas de acidez e, consequentemente, presença de alumínio em concentrações tóxicas às plantas. O restante deste Estado apresenta, em maior ou menor intensidade, a presença de concentrações elevadas de alumínio. Em outras regiões, o problema não é menos importante e, de maneira geral, pode-se afirmar que mais da metade do solo cultivável

do país, apresenta teores significativos de alumínio.Esse elemento, quando solúvel (Al+++), causa desiquilíbrios nutricionais que afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas,reduzindo sensivelmente a sua produtividade. O alumínio é pois, um fator importante para explicar a reduzida fertilidade dos nossos solos. O fato do alumínio estar na forma trivalente se constitui em um problema adicional, pois, quase todos os conhecimentos obtidos de absorção e acúmulo de cations nas plantas concernem aos cations mono e divalentes, pouco se conhecendo dos cations trivalentes (ANIOL, 1983).

Quanto ao efeito tóxico do Al^{+++}, tem-se mostrado que o Al^{+++} em geral:

1) interfere na divisão celular em raízes;
2) fixa o fósforo em formas menos disponíveis no solo e sobre as raízes ou dentro delas;
3) diminui a respiração da raiz;
4) interfere com certas enzimas que governam a disposição de polissacarídeos nas paredes celulares;
5) aumenta a rigidez da parede celular;
6) forma complexos fortes e precipitam ácidos nucléicos;
7) interfere na absorção, transporte e uso de muitos elementos (Ca, Mg, P e K) e água pelas plantas (FOY, et al., 1978).

O efeito tóxico do Al se manifesta pela drástica inibição do crescimento de raiz e é causada pela ligação do Al ao DNA nas células meristemáticas e, consequentemente, inibição de divisões mitóticas e alongamento da raiz. Outros efeitos fisiológicos (inibição na absorção de outros ions, particularmente Ca^{2+}, e interação com P) que estão associados com os sintomas de toxicidade de Al são considerados efeitos secundários. Em genótipos tolerantes, no entanto, se postula a existência de algum mecanismo de impedimento que tanto pode impedir a entrada de Al para dentro do citoplasma e/ou núcleo das células meristemáticas de raízes, ou que influencia a ligação do Al ao DNA. Também não se

sabe se a influência observada do Al nos processos de oxidação é uma resposta direta ou um efeito indireto da transcrição do DNA alterado (apud ANIOL, 1983).

Sobre a prevenção e redução da absorção do P de fontes externas pelo alumínio, verificou-se que o Al nas raízes também extrai o P de células de raízes e de tecidos adjacentes de tal maneira que se forma uma fonte de consumo para o P da planta absorvido de outros locais. O alumínio se acumula dentro ou sobre as raízes das plantas injuriadas, mas geralmente não é translocado para as partes superiores (FOY, 1976).

Assim, o Al presente em excesso pode interferir no metabolismo através de: a) competição (pela absorção); b) inativação (de enzimas); c) deslocamento (elementos essenciais de sítios funcionais) e d) alterações (na estrutura da água). Muitos destes efeitos envolvem provavelmente modificação na estrutura e funções de membranas (FOY et al., 1978).

Os mecanismos fisiológicos exatos da toxidez ou tolerância do Al ainda estão em debate, estes podem ser muito diversos em diferentes espécies e variedades a serem controladas por diferentes genes através de diferentes caminhos bioquímicos (FOY, et al., 1978). Espécies classificadas como tolerantes incluem a azálea, *Datura*, cevada, amendoim, *Ericaceae* e grama de jardim.

Espécies sensíveis incluem o tomate, alface, beterraba, algodão, cevada, *Lolium* e sorgo. Mas a listagem das espécies para tolerância ao Al depende das variedades selecionadas. Tolerância diferencial dentro da mesma espécies tem sido encontrada entre variedades de cevada, trigo, arroz, alface, soja, algodão, milho, girassol, algas e patógeno do solo (FOY, 1976).

1.4.1. Testes *in vivo*

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) é considerada uma espécie sensível ao alumínio quando comparada a outras espécies estudadas (FOY et al., 1973). RAMOS (1981) estudou detalhadamente o mecanismo da herança de tolerância ao alumínio no tomateiro.

Observou-se uma resposta diferencial das duas acessões do tomateiro PI 367977 (A-cultivar sensível) e PI 367991 (B-cultivar tolerante), estudadas em relação a vários níveis de saturação de Al no solo. O nível de saturação de Al no solo é considerada como o melhor critério para avaliar o nível de toxicidade de Al em plantas, uma vez que está melhor associado ao crescimento vegetativo e produtividade.

Nas avaliações preliminares (segundo RAMOS, 1981), a altura das plantas mostrou-se mais eficiente para discriminação das reações de tolerância/sensibilidade a níveis relativamente elevados de saturação de Al, do que peso seco da parte aérea ou das raízes. A altura das plantas no tomateiro foi, portanto, usada para classificar as reações de tolerância/sensibilidade das variedades A e B. Não foi observada a existência de efeito materno para a reação de tolerância ao Al, o que foi demonstrado pelo comportamento similar dos híbridos em diferentes saturações de Al.

Os dados do trabalho de RAMOS (1981) com as duas acessões de tomateiro sugerem ser a reação de tolerância ao Al no solo, controlada por dois genes dominantes independentes. Este autor também verificou o efeito de aditividade e dominância dos genes para tolerância ao Al, utilizando-se o teste "joint scaling". Este teste determina se a ação dos genes para tolerância ao Al segue um modelo de aditivo-dominante. Detectou-se a existência de interação não alélica e heterose, quando se comparam os valores médios obtidos nas famílias, pelos valores esperados no modelo aditivo-dominante através do teste "joint scaling" ajustado.

No tomateiro, os genes para tolerância ao Al mostraram dominância completa e alta herdabilidade, como consequência da existência de poucos alelos condicionando a tolerância. Os resultados obtidos por RAMOS (1981) indicam que a característica de saturação de Al (35%), pode ser facilmente incorporada em poucas gerações, a cultivares de tomateiro num programa de melhoramento.

1.4.2. Testes *in vitro*

Em tomate, MEREDITH (1978a) mostrou que a toxidez de Al^{+++} não é estritamente um fenômeno da planta como um todo, mas sim que esta toxidez se expressa ao nível celular em cultura de

células. Esta autora verificou que, não só esta toxidez ocorre em células cultivadas como também diferenças genéticas genotípicas (tolerante x sensível) se expressam em cultura desde que o cultivo *in vitro* permite o crescimento de populações homogêneas de células sob condições controladas, cultura de células pode ser um meio muito válido e atrativo de se estudar a toxidez do alumínio e de manipulação genética, pois MEREDITH (1978b) observou variantes a partir da variedade sensível que mantiveram estavelmente esta característica. No caso estudado de tomate, os variantes foram obtidos por pressão de seleção (manutenção contínua em presença de 200 µM de alumínio), em taxa mais alta em cultura líquida do que sólida, embora não tivessem sido incorporados, pois a autora não obteve regeneração das plantas. No caso específico de alumínio, só foi obtido então, expressividade *in vitro* e esta característica desejada não foi recuperada e expressa *in vivo*. Mais recentemente, tolerância a Al foi recuperada e expressa *in vivo*, mas em cultura de células de cenoura (OJIMA & OHIRA, 1982). Para estes autores, a tolerância de culturas de células selecionadas esteve associada a detoxificação por quelação com ácido cítrico que é abundantemente liberado para o meio pelas próprias células cultivadas (OJIMA & OHIRA, 1983).

1.5. UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CULTURA DE TECIDOS

1.5.1. Cultura de Tecidos de Tomateiro

O melhoramento de cultura pode ser feito por manipulação genética in vitro, como já foi dito, mas é necessário que haja marcadores genéticos adequados e que ocorra regeneração em alta freqüência de plantas a partir das células em cultivo. Embora, em teoria, o conceito de totipotência, ou seja, a possibilidade de regeneração de plantas fenotipicamente idênticas às células em cultura, esteja bem estabelecido, somente em algumas poucas espécies de plantas cultivadas está relatado a obtenção de plantletes a partir de células em cultura.

A excelência do tomateiro como um material propício à estudos genéticos já foi frisada anteriormente, mas os resultados do cultivo in vitro para a manipulação genética são mais recentes.

Embora pertencente a mesma família do tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), espécie que apresenta os melhores resultados de regeneração, pois, plantas adultas foram obtidas a partir de proliferação de células isoladas, quer somáticas ou haplóides, quer intactas ou a partir de protoplastos isolados, no caso de *L. esculentum*, a regeneração de tomate só foi obtida a partir de 1974, principalmente por PADMANABHAN et al. utilizando calos a partir de folhas (com três linhagens de cultivar Rutgers).

Organogênese foi encontrada em todos os trabalhos de tomate, quer empregassem como fontes de explantes: folhas (PADMANABHAN et al., 1984; BEHKI & LESLEY, 1976; KARTHA et al., 1976;

TAL et al., 1977; DRUVA et al., 1978; HERMAN & HAAS, 1978; OHKI et al., 1978; VNUCHKOVA, 1978; THOMAS & PRATT, 1982; ILLG & SIQUEIRA, 1984); cotilédone (VNUCHKOVA, 1978; GUNAY & RAO, 1980) ; internós de caule (de LANGHE & de BRUIJNE, 1976; VNUCHKOVA,1978); hipocótilo (OHKI et al., 1978; GUNAY & RAO, 1980; ZELCER et al., 1984); raízes (NORTON & BELL, 1954, empregando a espécie selvagem *L. peruvianum*); meristema apical (KARTHA et al., 1977); embrião (THOMAS & PRATT, 1981); anteras (GRESHOFF & DOY, 1972, com pequeno resultado, pois de 43 raças de tomate estudadas, só obtiveram calo em 3 raças, das quais somente uma produziu plantlete; ZAMIR et al., 1981; ZAGORSKA et al., 1982; ZIV et al., 1982; SIQUEIRA et al., 1983, com resultados preliminares) e protoplastos (de WIT, 1976; ZAPATA et al., 1977; MÜLBACK, 1980; MÜLBACH & THIELE, 1981; ZAPATA et al., 1981; KOBLITZ & KOBLITZ, 1982; MORGAN & COCKING, 1982; SINK & NIEDZ, 1982).

O único resultado obtido com embriogênese, foi o de DEBERGH & NITSCH (1973) que induziram embróides, que não se desenvolveram a partir de culturas de células de grão de pólen.

Embora tenha se obtido formação de calo a partir de caule, folhas e hipocótilo, não se obteve bons resultados com culturas de células de tomate em suspensão (TULECKE et al.,1965).

Deve-se considerar também o material vegetal estudado (espécie, cultivar ou linhagem) pois, para cada espécie ou cultivar, há de ser definido condições nutricionais e hormonais para o crescimento e a expressão do fenômeno de totipotência. Verificou-se, por exemplo, que *L.peruvianum* tem um poder morfogenético maior que a espécie cultivada, no mesmo meio de cultura e nas mesmas condições de cultivo (DE LANGHE & BRUYNE, 1976; DEHAN & HEIKIN, 1977). Foi observado que a espécie selvagem apresentava al-

to nível endógeno de auxina (DE LANGHE & BRUYNE 1976).

TAL et al. (1977) pesquisaram o potencial de regeneração de secções foliares do mutante flacca (flc) de *L. esculentum* que tem um conteúdo menor de ABA que os tomates normais e, conseqüentemente, nível mais alto de promotores (citocininas e auxinas). Os autores compararam a regeneração de folhas do mutante flc com as folhas de *L. peruvianum* e *Solanum penellii*. A espécie selvagem *L. peruvianum* apresentou o mais alto potencial morfogenético do material estudado, seguido pela outra espécie selvagem *S. penellii*, enquanto o mutante com baixo conteúdo de inibidor regenerou em freqüência extremamente baixa com todas as combinações de hormônios vegetais testadas. Esta baixa regeneração foi semelhante ao cultivar do tomate comestível normal, evidenciando que:

a) o desbalanço hormonal não alterou a baixa regeneração do tomate mutante, que foi semelhante a menor regeneração observada no tomate comercial, em comparação com espécies selvagens e

b) a alta regeneração observada com a espécie *L. peruvianum* não pode ser atribuída somente ao menor conteúdo de ABA endógeno desta espécie. TAL et al.(1977) sugerem que o alto potencial morfogenético de *L.peruvianum* pode estar relacionado de alguma maneira

com o alto grau de heterosigosidade desta espécie auto-incompatível.

OHKI *et al.* (1978) conduziram um estudo pormenorizado da variabilidade *in vitro* da capacidade de regeneração dentro de determinadas espécies de *Lycopersicon*, bem como a transmissão desta capacidade através de hibridização. Os autores verificaram que a eficiência de regeneração foi dependente de:

a) genôtipo da planta;

b) tecido ou órgão servindo como fonte de explante (variando os tipos e as concentrações dos hormônios vegetais endôgenos);

c) posição na qual o órgão do qual o explante foi excisado (distribuição desigual dos hormônios vegetais e desigualdade da constituição histológica).

Dentro do gênero *Lycopersicon*, *L. peruvianum* apresenta a melhor resposta de regeneração, seguida de outras espécies selvagens como *L. glandifolium*, *L. chilense* e espécies do gênero *Solanum* afins como *S. pennellii* e *S. lycopersicoides*. O tomate comestível tem comparativamente aos taxons selvagens regeneração menos eficiente, com excessão de apenas duas espécies selvagens, *L. hirsutum* e *L. pimpinellifolium* que se apresentam como espécies recalcitantes à regeneração (KUT *et al.*, 1984).

FRANKENBERGER *et al.* 1981 fizeram estudos da base genética da regeneração em genôtipos do tomateiro. Os autores verificaram que a capacidade de regeneração foi uma característica altamente herdada. Uma faixa grande da variabilidade na capacidade de regeneração entre os híbridos foi atribuida a ação de genes aditivos, enquanto que a alta capacidade de regeneração foi associada com a presença de genes recessivos.

1.5.2. Técnica de cultura de tecidos para obtenção de variabilidade (variação somaclonal)

Variabilidade genética em células vegetais *in vitro* foi primeiramente anunciada em 1967. A variação foi detectada em células cultivadas para características morfológicas, tais como produção de pigmento, para características bioquímicas (síntese de nicotina, por exemplo) e número e estrutura dos cromossomos. Em geral, acúmulo de variabilidade tem sido correlacionado com duração da cultura. Em particular, células poliploides ou aneuplóides são comumente mencionadas em culturas de células de longa duração. Esta instabilidade cromossômica de células cultivadas, que foi recuperada nas plantas regeneradas de culturas de células, tem sido proposta como uma fonte de novidade de variação útil do ponto de vista agrícola para culturas propagadas assexualmente, tais como cana-de-açúcar e batata.

Evidências recentes sugerem que as características variantes expressas em plantas regeneradas de cultura de tecidos são transmitidas para progênie auto-polinizada em culturas propagadas sexualmente. A recuperação de características estáveis, tais como mutações de um gene simples (EVANS & SHARP, 1983), abre a porta para o uso de cultura de tecidos como um instrumento para introdução de variação em virtualmente todas as espécies propagadas por semente.

D'AMATO (1978), baseando-se em diferenças genéticas nucleares entre células diferenciadas e fenômenos genéticos que ocorrem durante as primeiras poucas divisões mitóticas da formação de calo, afirma que um explante compreende população heterogênea de células desde os primeiros dias de cultura. Durante o crescimento de células em calos ou em cultura líquida, podem ocorrer mudanças cromossômicas em alta freqüência. Desta maneira, não é surpreendente que variação do número cromossômico tenha sido encontrada, geralmente, em culturas de tecidos já estabelecidas. Esta variação do número cromossômico parece ser influenciada por vários fatores:

1) variação cromossômica preexistente nas plantas usadas na iniciação da cultura;

2) fragmentação nuclear associada com a primeira divisão celular da iniciação do calo;

3) endoreduplicação ou endomitose ocurrentes durante a iniciação da cultura; e

4) anormalidades do processo mitótico resultante em células aneuplóides.

Há muitas evidências que mostram que a maneira como os tecidos ou células são cultivados podem afetar a variabilidade cromossômica. ORTON (1984) correlacionou vários trabalhos que mostram que a composição de fitorreguladores no meio de cultura afeta o número cromossômico, para ele, o principal fator do meio de cultura que pode afetar o aspecto cariológico das células:

1) culturas de calos iniciadas de raízes de ervilha em meio suplementado com auxina e citocinina contiveram tanto células diplóides como poliplóides, enquanto que, culturas de células iniciadas somente com auxina consistiram quase completamente de células diplóides. Experimentos com DNA marcado mostraram que esta diferença foi devida à seleção de variação pré-existente e não de variação induzida *de novo*. Células de *Datura innoxia* mantidas em níveis altos de citocinina : auxina apresentaram, inversamente, conteúdo de DNA nuclear relativamente baixo;

2) células de cenoura cultivadas em presença de 2,4-D mostraram uma proporção mais alta de variabilidade cromossômica que aquelas cultivadas em concentrações equivalentes de AIA e ANA. Verificou-se que o 2,4-D esteve associado com aumento de divisão celular anormal. Entretanto, experimentos de dose-resposta de 2,4-D feitos em culturas em suspensão de *Haplopappus gracilis* e *Vicia hajastana* apontaram a relação oposta: irregularidades mitóticas estiveram correlacionadas negativamente com a concentração de 2,4-D (dentro de uma faixa fisiológica). Obteve-se resultado semelhante em batata; a incidência de variabilidade entre as plantas regeneradas em protoplastos de batata (SHEPHARD , 1981) foi menor quando os calos foram iniciados em meio suplementado com 2,4-D do que com meio com ANA.

Para ORTON (1984) as aparentes diferenças observadas nos estudos de relação entre fitorreguladores e variabilidade cromossômica são conseqüência da resposta diferencial à seleção entre tecidos cultivados de diferentes grupos de plantas. Para o autor, as células poliplóides e aneuplóides podem ter uma vantagem seletiva geral sobre as células diplóides de cenoura e ervilha cultivadas *in vitro*, enquanto o oposto pode estar ocorrendo em *H. gracilis*, *V. hajastana*, *D. innoxia* e batata. Continuando o raciocínio, ORTON (1984) considera que a ação esperada de um agente que aumenta a taxa de divisão celular, tal como o 2,4 - D (ou citocinina), seria uma direção mais rápida em sentido aos tipos predominantes de vantagem seletiva. Para embasar a hipótese lançada, ORTON (1984) cita evidências indiretas fornecidas pelos estudos de taxa de divisão celular vs. constituição cromossômica e dinâmica de populações. Aneuplóides de *Picea glauca* cultivada *in vitro* exibiram taxa de divisão celular mais rápida que diplóides, e aneuplóides, quando presentes, foram predominantes na cultura. Mas, o próprio autor frisa que, a taxa de divisão celular é apenas um critério potencial de seleção *in vitro* e, outros mais devem ser considerados.

CHALEFF (1983) indica 4 áreas em que mutantes obtidos de cultura de tecidos, por variação somaclonal, podem ser úteis do ponto de vista agronômico: (1) resistência à seca; (2) resistência às doenças; (3) melhora de qualidade (principalmente d e conteúdo protéico) e (4) resistência a herbicidas.

É interessante lembrar que variabilidade genética pode ser expressa também em meristema (CHERFAS, 1985), material que se supunha ser estável do ponto de vista genético. Para CHERFAS (1985) a cultura de meristemas produz 1 mutante detectável e m cada 1.000 casos e, numa cultura de uma única célula, a taxa de mutação é 1 em 25. Como o próprio autor chama à atenção, estes dados de meristema são assombrosamente altos, de tal maneira que os melhoristas vegetais atualmente usam a cultura de uma única célula para procurar novas linhagens potencialmente valiosas, mais do que multiplicar variedades já isoladas. Poderia se argumentar que as altas taxas observadas em cultura de meristema seriam resultado de artefatos das técnicas de cultura de tecido. Mas, para CHERFAS (1985) estas altas taxas com explantes de me-

ristemas seriam, também, esperadas, se o mosaicismo genético fosse de importância suficiente para a evolução da planta no passado, e que, no passado houve seleção para mecanismos que ativamente encorajaram os vários ramos desta planta a diferir geneticamente entre si.

TOMATE

Em um trabalho especial publicado em 1984, o grupo do DNA Plant Technology (EVANS et al.), que há longos anos vem trabalhando com o tomateiro, inclusive com os primeiros resultados positivos de regeneração (PADMANABHAN et al., 1974), fez a revisão da história da tecnologia de variação somaclonal, além de oferecer a documentação genética da variação somaclonal em tomate.

EVANS & SHARP (1983) publicaram uma descrição de experimentos para geração de somaclones de tomate e determinação das bases genéticas da variação somaclonal. Neste trabalho, sementes auto-fertilizadas foram coletadas de frutos maduros de plantas R_0 e para avaliar a geração R_1, a semente foi semeada na estufa, onde as características de plântulas, tais como, deficiência de clorofila, conteúdo de autocianina e forma foliar foram acompanhadas. Plântulas R_1 foram transplantadas para o campo, para classificar características de plantas maduras, tais como, tipo de pedicelo, formato do fruto, cor de flor e fruto. Em adição, dados preliminares de características agronômicas foram coletados na avaliação do campo da geração R_1.

EVANS & SHARP (1983) observaram variação no número cromossômico, particularmente tetraploidia, (2n = 48) e linhas aneuplóides estéreis. Entretanto, como a ênfase foi dirigida à análise de progênie R_1 das plantas regeneradas, a maioria das linhas aneuplóides foram descartadas, pois, tão poucas ou nenhuma semente R_1 destas linhas foram coletadas. Várias progênies de R_1 foram observadas para segregar para características morfológicas. Entre as primeiras 230 plantas UC82B regeneradas, foram identificadas 13 mutações nuclear-genéticas discretas. Estas mutações incluiram mutações recessivas para macho estéril, pedicelo sem articulação, folha virescente, flor e fruto de cor tangerina, deficiência letal de clorofila, verdeio, aparência da folha manchada e mutações do-

minantes controlando o amadurecimento do fruto e hábito de crescimento (ver REVISÃO DA LITERATURA - Ítem 1.2). A análise genética foi completada pela avaliação da progênie auto-fertilizada R_2 de algumas plantas R_1 selecionadas e, em alguns casos, por cruzamento com linhas mutantes conhecidas. EVANS et al. (1984) fizeram a análise genética mais completa, com o variante de fruto de laranja-virescente e o variante de pedicelo "jointless" (sem articulação).

O caracter tangerina-virescente (tv - tcl) é um único gene recessivo que resulta em flores e frutos de cor laranja e folhas virescente amarelas. Os dados de segregação R_1 observados no campo (30 frutos vermelhos para 6 frutos tangerina) sugeriram primeiro controle de característica por um único alelo recessivo. Frutos foram coletados de 8 plantas individuais auto-fertilizadas. Seis destas plantas R_1 tiveram fruto vermelho, enquanto 2 destas plantas tiveram frutos laranja. Os 2 frutos tangerina contiveram sementes e se cruzaram sem segregação com o fenótipo tangerina-virescente. Das 3 plantas com frutos vermelhos, 3 cruzaram-se verdadeiramente com o fruto vermelho e 3 segregaram para vermelho vs. tangerina-virescente. A segregação nas 3 plantas seguiu a razão 3 : 1 (58 frutos vermelhos para 17 tangerina). Além disso, entre a progênie segregante R_2, a flor, o fruto e a cor da folha segregaram, sugerindo o controle de dois pigmentos, carotenóides (flor e fruto) e clorofila (folha), por um gene pleiotrópico simples. Tais genes pleiotrópicos controlando carotenóides e clorofila, componentes, ambos encontrados nos plastídeos, são encontrados na literatura.

Uma única planta R_1 foi cruzada com um variante fértil conhecido, tangerina e toda a progênie híbrida teve frutos de cor tangerina. Usando este teste complementar, EVANS et al. (1984), concluíram que o novo somaclone (tv-tcl) foi um utante para o novo alelo em um gene previamente conhecido na posição 95 no braço longo do cromossomo 10. Esta foi a caracterização genética de um novo variante somaclonal mais precisa que se conhece até agora. Em adição pela avaliação da progênie auto-fertilizada dos híbridos entre tv-tcl e o mutante tangerina encontrado anteriormente (EVANS & SHARP, 1983), EVANS et al. (1984) concluiram que o loco contém 2 elementos, um controlando síntese da clorofila e um controlando síntese de carotenóides que mutaram independentemente. O novo alelo

tv recuperado por variação somaclonal é recessivo ao alelo t para o fenôtipo de verdor.

Pedicelo sem articulação ("jointless") é uma característica que está bem caracterizada como mutante recessivo de tomate. Plantas com este caracter são desejáveis para colheita mecânica , pois, o fruto colhido não terá, então, parte do caule atado a si. Foram identificados 2 mutantes com pedicelo sem articulação nos somaclones de UC82B (EVANS et al. 1984). O primeiro se comportou como esperado, isto é, a planta regenerada foi normal e o mutante recessivo foi detectado em cerca de 25% da progênie R_1. Entretanto, a planta regenerada original do segundo variante (- tc 2) ainda expressou a característica mutante. Esta planta R_0 sem articulação cruzou-se sem segregação em ambas as gerações R_1 e R_2 . EVANS et al. (1984), baseando-se em cruzamentos verdadeiros com o mutante conhecido sem articulação com o tomate normal articulado, afirmam que a planta original R_0 foi homozigota recessiva para o mutante "jointless". Para estes autores, o somaclone mencionado originou-se por mutação, seguida de recombinação mitótica e regeneração de parte aérea subseqüente. Esta nova mutação complementa a mutação j conhecida (ver REVISÃO DA LITERATURA, Ítem 1.2) de tal maneira que para EVANS et al. (1984) não está codificado no mesmo gene e pode representar, para estes autores, um gene não descrito codificando para pedicelo sem articulação. Este grupo de pesquisa, ligado a uma empresa de biotecnologia, está atualmente testando a complementação com a mutação j-2 conhecida.

EVANS et al. (1984) encontraram a mutação manchada (m-tc1) entre os somaclones de UC82B. Este mutante deficiente em clorofila foi identificado na geração R_1 na estufa. Plantas selecionadas R_1 manchadas cruzaram-se sem segregação para a aparência manchada. Estes autores frisam que a variegação é de alguma maneira semelhante a um mutante de plastoma relatado anteriormente . Quando setores deficientes de clorofila dos mutantes de plastoma são colocados *in vitro*, é possível estabelecer culturas que, após regeneração, apresentam tecido completamente deficiente de clorofila (GLEBA, 1979 apud EVANS et al., 1984). Entretanto, o fenotipo manchado observado por EVANS et al. (1984) foi praticamente estável, se manteve nas plantas regeneradas de explantes foliares de plantas manchadas, e foi distinguível da mutação de manchamen-

to laranja-vermelho dos frutos de plantas homozigotas (m-tcl/m-tcl). Os autores chamam a atenção que novamente o mutante m-tcl, com o mutante tv-tcl, teve efeito tanto nos pigmentos de clorofila como nos carotenóides. Para EVANS et al. (1984), o mutante m-tcl parece se distinguir das centenas de mutantes de tomate encontrados anteriormente.

EVANS et al. (1984) encontraram várias mutações de um único gene nos testes de progênie R_1 de plantas regeneradas UC82B, incluindo um alelo semi-dominante, controlando a variação eletroforética do álcool dehidrogenase, um alelo dominante conferindo resistência a *Fusarium oxysporum* Raça 2. Estes autores encontraram também somaclones com características agronômicas importantes, como, conteúdo mais alto de pigmento, além de variantes morfológicos. Em muitos casos, os somaclones alterados tiveram tamanho foliar maior, cor foliar mais escura, ou estabelecimento de fruto reduzido. Algumas destas plantas R_1 foram avaliadas e evidências preliminares obtidas através da análise com enzimas de restrição do DNA isolado de cloroplasto sugerem que as mudanças genéticas ocorreram no DNA do cloroplasto. Genes do cloroplasto são herdados maternalmente em tomate e, portanto, se esperava que o variante se cruzaria sem segregação na progênie R_1. Não é, pois, surpreendente que os variantes de DNA-de-cloroplastos sejam comuns, pois o número de plastídeos no ápice do caule em desenvolvimento é muito menor que o da célula madura (BENDICH & GAULIROFF , 1984 apud EVANS et al., 1984). Desta maneira, se a mutação ocorre no DNA do cloroplasto é mais provável que se torne o tipo de plastídeo dominante durante a separação das células mutantes, se o mutante ocorre em 1 de 10 plastídeos do que em 1 de 100 plastídeos.

EVANS et al. 1984 obtiveram por variação somaclonal do material vegetal UC82B outras mutações de 1 único gene, incluindo muitos machos estéreis e mutações de deficiência de clorofila, um mutante recessivo de uma única linha de cruzamento de tomate, mutante este distinto das outras mutações de deficiência de clorofila conhecidas. Mutantes com novas colorações de frutos também foram encontrados: mutação dominante para fruto de cor laranja e mutação recessiva para fruto de cor amarela. A mutação para cor laranja parece ser pleiotrópica, pois está associada com folhagem ramificada e coloração da flor alterada. Já a mutação para cor

amarela, afeta apenas a coloração do fruto.

EVANS et al. 1984 concluíram em relação à variação somaclonal em tomate:

1) a variação do número cromossômico pode ser recuperada nas plantas regeneradas;

2) muitas mutações de um único gene foram recuperadas em diferentes cultivares de tomate;

3) somaclones incluem mutações dominantes, semi-dominantes e nucleares recessivas;

4) a freqüência de mutações de um único gene, pela metodologia seguida pelos autores, se situa nas vizinhanças de 1 mutante em cada 20-25 plantas regeneradas;

5) alguma evidência sugere que novos mutantes de genes únicos, não relatados anteriormente, com a utilização de técnicas de mutagênese convencionais, foram recuperados usando-se a variação somaclonal;

6) a ocorrência da razão 3 : 1 para mutantes de genes únicos em plantas R_1 sugere que os mutantes são de origem clonal e que a mutaçã ocorre anterior à regeneração por organogênese (ou seja, não se detectou mosaicos);

7) evidências sugerem que a recombinação mitótica (recíproca ou não recíproca) pode também ser responsável por alguma variação somaclonal; e

8) evidências sugerem que mutações no DNA do cloroplasto (detectado tanto por herança genética como por análise de enzimas de restrição) podem ser também recuperadas.

cultivares podem ter importante papel a desempenhar, onde métodos convencionais de cruzamento falharam em produzir as características desejadas (INGRAM, 1980).

Desde há muito tem sido enfatizadas as possibilidades das técnicas de cultura de tecido no estudo de parasitos de plantas. O patógeno poderia ser cultivado com as células do hospedeiro, em meio químico e físico controlados, livre de contaminação de outros microrganismos. Isto oferece a possibilidade de desenvolver um sistema experimental bastante simples para estudos estruturais e fisiológicos das interações parasito-hospedeiro, ao mesmo tempo que também oferece um fornecimento contínuo de culturas de raças fisiológicas. Este aspecto pode ser particularmente interessante no estudo de resistência às doenças. Por exemplo, HELGESON *et al* (1972) observaram que cultura de calo de plantas de tabaco resistentes a *Phytopthora parasita* não permitiu o crescimento do fungo, em contraste com calo oriundo de plantas susceptíveis. Este sistema poderia servir de modelo para selecionar mutantes resistentes a outras doenças. Para estudo de nematóides tem sido usada cultura de raízes, e para estudo de viroses a cultura utilizada é a de protoplastos isolados.

O estudo da relação hospedeiro-parasita in vitro utilizando embrião de feijão foi feito por PADMANABHAN em 1967. Este autor cultivou os embriões obtidos de sementes de *Phaseolus vulgaris* colocadas no meio de Nitsch enriquecido com vitaminas. A incorporação da fitotoxina do fungo, o ácido fusárico (ver Fig. 1,III) de *Fusarium* no meio de cultura foi demonstrada pela interferência com a absorção d'água dos embriões germinados de *P. vul*

gares e pela indução de características de murcha das folhas embrionárias. A sensibilidade dos embriões à toxina foi um indício inicial que mostrou que a técnica in vitro pode permitir uma melhor compreensão da ação bioquímica desta toxina.

A possibilidade de utilização de cultivares de tecidos de feijão para estudos fitopatológicos foi primeiramente demonstrada por BAJAJ & SAETTLER (1970).

BAJAJ & SAETTLER (1970) utilizaram 10% (v/v) de filtrados de cultura de três fungos adicionados ao meio de cultura para crescimento de calos. Verificou-se que o crescimento dos calos de feijão em presença do filtrado de fungo foi inibido 77% (*Pseudomonas phaseolicola* Burk.), 41% (*P. syringae* van Hall) e 10% (*P. morsprunorum* Worwald). Apenas filtrado de cultura de *P. phaseolicola* induziram calos em folhas recém-excisadas de feijão.

Pelas similaridades encontradas, entre os efeitos fisiológicos da toxina contida no filtrado de *P. phaseolicola* em calos de feijão e nos tecidos verdes das folhas, foi sugerida a possibilidade do uso de tecido de calos para estudar o modo de ação da toxina.

O desenvolvimento das técnicas *in vitro* para o melhoramento ou propagação vegetativa de plantas utilizando cultura de embriões, calos, anteras, células somáticas ou protoplastos, abriu novas oportunidades para a seleção de indivíduos que são resistentes ou tolerantes às doenças vegetais, especialmente aquelas que são induzidas através de mediação de toxinas secretadas pelo patógeno (DUTRECQ, 1977).

Toxinas têm sido usadas como agente de pressão seletiva para obter calos de tabaco que sobreviveram ao tratamento com metioninasulfoximina (MSO), composto análogo a metionina. A toxina (neste caso de uma bactéria patogênica *Pseudomonas tabaci*) é também análoga estruturalmente a metionina, e o MSO embora não seja a toxina real, produz os mesmos sintomas que a toxina e mutantes ao MSO são também resistentes à toxina. Com este trabalho, CARLSON (1973) procurou verificar que seria possível selecionar mutantes de plantas superiores que têm uma resposta alterada ao patógeno, por meio da recuperação de células que são resistentes a toxina produzida por este patógeno.

Assim, enquanto alguns autores pesquisaram a resistência do próprio calo, outros levaram em consideração a resistência das plantas regeneradas das culturas de calo selecionadas, o trabalho de CARLSON (1973) foi o primeiro a usar as técnicas seletivas com vistas ao melhoramento, pois ele foi capaz de produzir plantas de tabaco que eram resistentes a toxina de seu parasita congênito.

Outro exemplo de seleção direta *in vitro* foi obtida em calos de milho que resistiram ao tratamento da toxina da raça T do fungo *Helminthosporium maydis* (GENGENBACK, GREEN & DONOVAN, 1978). Estes autores selecionaram calos resistentes ao helminthosporosídeo, a toxina do fungo, e destes calos obtiveram plantas que foram resistentes ao próprio parasita.

Em 1979, BEHNKE mostrou seleção de calos de batata que foram resistentes ao filtrado da cultura de *Phytophthora infestans*, sendo que cada um dos calos era resistente a todas as quatro raças de *Phytophthora* usadas no experimento. A resistência dos calos não foi perdida através da regeneração e da indução de novos calos. A própria autora, porém, friza que a toxina do fungo produzida *in vivo* talvez não seja a mesma que a produzida *in vitro* no meio de Henniger.

Esta associação de batata com o fungo *(Solanum tuberosum* com *Phytophthora infestans)* foi uma das primeiras a ser estudadas utilizando técnicas de cultura de tecidos. Um tipo de resistência da batata ao *P. infestans* é controlada por uma série de genes mendelianos chamados genes-R, denominados R_1 – R_2, etc., cada gene conferindo resistência a algumas, mas não a todas as raças de *P. infestans*. A expressão dos genes-R foi pesquisada em tecidos de cultura de batata, usando a variedade "Majestic" (rr), que não continha nenhum gene R, e a variedade "Orion" que *in vivo* contém o gene R_1 que lhe confere resistência a raça 4 do patógeno tanto nos tubérculos como nas folhas, mas não a raça 1 de *P. infestans*. Em cultura de tecidos, ocorreu a mesma expressividade que a observada *in vivo*, var. "Majestic" foi invadida pelo patógeno, enquanto que a var. "Orion" foi resistente ao patógeno da raça 4. Porém, *in vitro* a var. "Orion" foi também resistente a raça 1, resistência esta que não ocorre *in vivo*. Foi mostrado que a toxidez dos zoospóros de *P. infestans* desenvolvida nas culturas de células em suspensão da var. "Orion", mas não nas da var. recessiva ("Majestic"), em resposta a infecção da raça 4. Foi concluído que os genes R podem se expressar *in vitro* e que a falha do *in vitro* da variedade resistente ("Orion") de suportar o crescimento da raça 4 pode ter sido devida a uma expressão do gene R_1 operando através do desenvolvimento de uma toxidez pós-infecção. (Esta interação foi estudada por Ingram e está sumarizada em INGRAM, 1977).

Para *P. infestans*, SHEPARD *et al.* (1980) reconhecem dois tipos de resistência genética, uma é a conferida pelo gene R, dominante, de características mendelianas, que confere a planta proteção quase total. O problema é que o fungo se apresenta em inúmeras raças de patógenos, de tal forma,

que tão logo os genes R conferem resistência às plantações, novas raças do patógeno aparecem e facilmente vencem a resistência da planta hospedeira. Outro mecanismo de resistência é o resultado de uma ação acumulada de genes (efeito epinástico), no qual o patógeno é parcialmente compatível com o hospedeiro, podendo se estabelecer e até esporular. Porém, dependendo da natureza e do grau de resistência o desenvolvimento do patógeno é abaixado a tal nível onde não é capaz de destruir a planta. Esta resistência poligenética oferece uma série de vantagens: é efetiva para uma grande faixa de raças patogênicas; não encoraja tão rapidamente o aparecimento de novas raças e é mais duradoura. Porém, este tipo de resistência exige um tempo extremamente longo dos melhoristas para ser incorporado em um determinado cultivar.

O trabalho de SHEPARD *et al.* (1980) foi feito com clones populacionais regenerados a partir de protoplastos isolados de células foliares de batata cultivar "Russet Barbank". Estes clones (protoclones) apresentaram alta freqüência de variação natural para várias características hortícolas e resistência às doenças, no caso requeima *(P.infestans)* e mancha de alternaria ou pinta preta *(Alternaria solani)* características estas que ocorreram regularmente nas populações regeneradas. A característica de resistência a *P. infestans* passa através da primeira geração de plantas e é expressada na progênie. A resistência obtida se assemelha mais a da observada pela ação acumulativa de genes (efeito epinástico).

1.5.3. Técnica de Cultura de Tecido para Indução e Seleção de Plantas Resistentes às Doenças

Técnicas de cultura de tecidos foram originalmente desenvolvidas para estudos dos problemas fundamentais de nutrição e morfogênese e conduziram a muitos avanços importantes nestes campos. Mais recentemente, à medida que os meios e as técnicas melhoraram, tornou-se cada vez mais claro que cultura de tecidos fornecem sistemas experimentais simplificados para serem usados em outros ramos da ciência vegetal. Duas limitações importantes devem ser reconhecidas, entretanto. A primeira limitação é que muitas das técnicas disponíveis têm sido aperfeiçoadas somente para um número relativamente pequeno de espécies vegetais, notavalmente tabaco e, muita pesquisa é ainda necessária para aumentar a lista das espécies envolvidas. A segunda limitação, é que células e tecidos cultivados, particularmente calos e culturas em suspensão, podem ser fisiologicamente e geneticamente diferentes das plantas inteiras. Desde que tenhamos estas limitações em mente, quando se planeja e se interpreta os resultados dos experimentos e, com sistemas de cultura apropriadamente definidos, podemos evitar armadilhas.

Entre as aplicações em estudo de fungos, aspecto muito interessante e de novidade são as plantas resistentes às doenças, obtidas a partir de cultura de tecidos. A cultura de tecidos forma a base de um número de técnicas que foram desenvolvidas para produzir mudanças genéticas em plantas. Progresso ainda está sendo feito na aplicação destas técnicas e a produção de cultivares com resistência às doenças ainda é novidade; no futuro, estes

2. *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout como exemplo de agente causal de doença fúngica no tomateiro.

2.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DAS DOENÇAS FÚNGICAS

Embora há mais de 100.000 espécies diferentes de fungos somente cerca de 200 delas são patógenos sérios das plantas cultivadas (RUSSEL, 1978). O maior número de espécies cultivadas são atacadas por somente pequenos números de fungos e muito pouco desses causam danos econômicos graves e de grande dispersão. Entretanto, tem sido estimado que doenças fúngicas são responsáveis por uma redução anual de mais que 20% do potencial total do mundo na produção de alimento. A importância de tais perdas para a humanidade pode ser considerado pelo fato de que cerca de 70% dos alimento humano vem diretamente de plantas cultivadas e a maior parte do restante vem de alimento animal, o qual é dependente de plantas forrageiras comidas pelo gado. As últimas culturas podem também ser atacadas por doenças fúngicas. Woodcock 1972 (in RUSSEL, 1978) estimou que gastos anuais atribuídos a doenças fúngicas das plantas cultivadas excede a 3.000.000 de dólares. As doenças causadas apenas pelos fungos destroem anualmente víveres que poderiam alimentar 300 milhões de pessoas (STROBEL,1975).

Algumas doenças fúngicas podem causar enormes perdas de rendimento em particular nas espécies cultivadas. O mais notável exemplo histórico foi a fome causada pela crise da batata na Irlanda no século XVIII, por volta de 1840.

Entre 1795 e 1845 a população da Irlanda cresceu de 4 para 8 milhões. A vida do camponês dependia de um lugar para morar, de alguns porcos e galinhas, de uma vaca e de um campo de batatas. Uma dieta balanceada era obtida de leite, manteiga, ovos e batata. Sendo que o grosso da dieta e o essencial era constituído pelas batatas. Como as batatas eram a base da vida do povo o ataque da cultura pelo fungo *Phytophthora infestants* (Mont.) de Bary em 1845 (causando a requeima) removeu a subsistência alimentar da população irlandesa.

Nos 15 anos que se seguiram ao ataque de 1845 mais de 1 milhão de irlandeses morreram de fome e doenças favorecidas pela

má nutrição e 1,5 milhões emigraram para a América do Norte. A população atual da Irlanda de 4,5 milhões é semelhante em tamanho a de 1.800. Atualmente, embora, exista na Irlanda uma agricultura hoje em dia mais diversificada, os anos de fome, conseqüência da doença fúngica, tiveram um efeito sobre o povo, que ainda perdura (BARRASS, 1977).

O fungo da requeima da batata ocupa também um lugar importante na história da Fitopatologia. Foi estudado por BERKELEY na Inglaterra e por de BARY na Alemanha. Concluíram que o fungo causava a doença e não vivia apenas no tecido morto por outro agente como as más condições do clima. O clima úmido simplesmente favorece a doença - por criar as condições adequadas para a germinação dos esporos produzidos assexuadamente. Esta foi a primeira demonstração de que um fungo pode causar uma doença de planta (BARRASS, 1977).

Outro exemplo ocorrido no século passado foi o extermínio total das plantações de café de Sri Lanka, pela ferrugem do café (*Hemileia vastatrix*, Berket Br.) ocorrido por volta de 1870. A conseqüência foi de que o cultivo de café foi abandonado nesta região, por muitas décadas, e a produção mundial de café foi transferida para o hemisfério ocidental onde a doença não ocorria (MEHROTRA, 1980).

É interessante ressaltar, que no caso da ferrugem do café, a doença foi detectada no Brasil em 1970, onde se difundiu rapidamente em toda área, causando perdas colossais entre os anos de 1974-1975. Até 1982, somente no Estado de São Paulo, foram encontrado 11 raças diferentes de ferrugem, oito das quais em relação a genes de *Coffea arabica* e três em relação a genes de *C. canephora* (COSTA et al 1983). Desta maneira, a doença, neste século, atravessou o Oceano Atlântico chegando ao Brasil e Colômbia onde vem se alastrando.

As doenças vegetais parecem ser responsáveis por muitos hábitos alimentares profundamente implantados. Por exemplo, enquanto no Nordeste e Sudoeste da Europa o uso do pão branco é mais comum, na Europa Central o povo come pão de centeio. Já nos Estados Unidos, enquanto os estados do sudoeste utilizam pão de milho, nos estados do norte é mais comum o pão branco. Foi sugerido

que estes hábitos alimentares resultaram do ataque da ferrugem do trigo (MEHROTRA, 1980).

Neste século, a disseminação da cultura de milho nos Estados Unidos no verão de 1970 causada por uma doença fúngica ocasionou perdas de 1 bilhão de dólares em ração para gado, a maior perda conhecida até agora causada por uma doença vegetal em período tão curto (STROBEL, 1975). Woodcock em 1972 (in RUSSEL , 1978) avaliou que mais de 20% do potencial de produção da cultura de batata neste século é perdido devido à requeima. Doenças fúngicas de cereais de grão causam perdas mundiais enormes. O trigo é prejudicado por muitas doenças fúngicas, entre as quais as mais importantes são as ferrugens que atacam as folhas e caule, apesar das tentativas para controlá-las por variedades resistentes e por uso de fungicidas. O "mildio" é a doença mais severa de cevada e pode reduzir a produção de grão de mais de 50%. A produção de arroz, que é o alimento básico de muitos países tropicais, pode ser drasticamente reduzida por ataques precoces do fungo *Piricularia oryzae* A beterraba açucareira pode ser atacada muito drasticamente, em algumas partes dos Estados Unidos (EUA) e o sul da Europa, pela mancha da folha causada pelo *Cercospora beticola*, e exemplos semelhantes de prejuízos em muitas culturas poderiam ser dados. Embora, seja possível quantificar exatamente as perdas causadas diretamente e indiretamente pelas doenças fúngicas nas plantas cultivadas, é claro que estas perdas são muito grandes e todo o esforço deve ser feito para reduzi-las. Algumas perdas indiretas não são imediatamente aparentes,mas são muito significativas. Por exemplo, muitas novas variedades capazes de dar aumento na produção não foram completamente exploradas por causa da suscetibilidade destas às doenças. O risco de cultivar uma variedade muito suscetível tem sido considerado ser muito grande, possivelmente sobrepondo-se ao benefício potencial de produção mais elevada em ausência da doença. Em tais casos o esforço para desenvolvimento de variedades mais produtivas tem sido anulado não pela doença em si, mas, sim, pela ameaça da doença.

2.2. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

O micélio é septado e ramificado, tornando-se escurecido com a idade. Conidióforos simples, septados, longos, subhialinos, com conídios terminais, multicelulares, com septos longitudinais e transversais, aspecto musiforme, forma clavada, com ou sem apêndice, com uma das extremidades mais aguda e subhialina. Os conidióforos surgem da parte mais velha do tecido do hospedeiro, são relativamente pequenos e de cor escura. Os conídios são de 12 a 20 - 120 a 296 μ). Têm a forma de bico, cor escura, nascem individualmente ou em cadeias de 2 em cultura pura (WALKER , 1976).

O fungo cresce rapidamente em meio artificial, usualmente produzindo em abundância um pigmento de coloração amarelada a vermelha que se difunde através do substrato. Variação considerável entre os isolados tem sido observada, com referência a crescimento, virulência e esporulação em cultura primária. Frutifica muito raramente em cultura pura e como regra, esporulação abundante é estimulada pelo ferimento do micélio ou exposição da cultura a raios ultravioleta. LINKERS (1963) relatou que conidióforos de 1 dia, de culturas com problemas de nutrição, necessitam de 12 horas de escuro ininterrupto para produzir conídios. Luz parece inativar certas flavinas que são essenciais para formação de conídios (WALKER, 1978).

Na natureza, porém, os conídios são produzidos continuamente na superfície inferior das folhas ou nos restos de cul

tura e são disseminados principalmente pelo vento, inseto, semente e respingos de chuva.

Os conídios podem germinar entre as temperaturas de 1°C e 49°C com o ótimo entre 25°C e 35°C. Os conídios podem iniciar a germinação em 1 a 2 horas, a temperatura de 6°C a 34°C. Com a germinação à baixa temperatura, o fungo é capaz de penetrar nas plantas com o orvalho. Para haver epifitia, entretanto, há necessidade de chuvas freqüentes e de temperatura elevada, deficiências minerais na planta agravam o problema. Os síntomas se tornam visíveis normalmente em 2 a 3 dias, e lesões com 3 mm de diâmetro já esporulam (TOKESHI & BERGAMIN Fº, 1980).

O fungo sobrevive de um ano para outro, principalmente em restos de cultura, conídios em condições secas são viáveis por mais de 17 meses.

O fungo afeta o tomateiro, beringela, pimentão, jiló e possivelmente, solanáceas nativas (TOKESHI & BERGAMIN Fº, 1980), e está presente em quase todos os países nos quais estas espécies crescem (CRUPP & SHERF, 1960).

2.3. SINTOMATOLOGIA

Sintomatologia mencionada baseou-se em CHRUPP & SHERF, 1960.

A importância da mancha de *Alternaria* cresce nos meses mais quentes, ocorrendo condições de alta umidade. Nestas condições, é comum a distribuição completa das culturas em qualquer idade da planta. Deve-se ressaltar, que sendo uma doença

que ataca também o fruto do tomateiro, leva a uma perda total (planta e frutos) das plantas doentes. Quando a sua ocorrência se verifica nas plantas novas ou de viveiro, ela pode destruir toda a cultura, causando danos graves.

Nos viveiros, é uma das principais causas do tombamento ("dumping-off") e da podridão do colo. ("collar-rot"). Uma lesão marrom no caule perto da base da planta, mata ou endurece as plantas mais jovens e murcha plantas mais velhas. COnforme as plantas tornam-se mais velhas, manchas alongadas e afundadas aparecem no caule e nos pecíolos da folha.

Os sintomas que mais chamam a atenção são as manchas foliares; geralmente começam nas folhas mais velhas, mais basais, são circulares, marrons, com anéis concentricamente arranjados. O número destas manchas varia desde um único até um grande número em cada folha, o número aumenta até que a folhagem afetada torna-se amarelada ou marrom e cai no chão. A aparência e a forma de lesões sugeriu o nome popular de "target-spot" (mancha-alvo).

Durante ataques severos toda a planta torna-se desfoliada, deixando o fruto maduro suscetível a infecção pelo fungo da antracnose.

O fruto no campo não é geralmente afetado por esta espécie particular de *Alternaria*, a menos que as plantas tenham se enfraquecido por alguma razão, tal como falta de fertilização ou de microelementos. Então, manchas de marrom a preto, subcirculares, em depressões, variando no tamanho desde a cabeça de alfinete até 1 polegada de diâmetro se formam em um lado do fruto em maturação. De 1 a 100 manchas podem se mostrar em um tomate. Manchas marrons são produzidas também nos pedicelos do fruto e nas folhas do cálice dos botões. Desta maneira, frutos jo

vens tornam-se infectados, ou pela abscisão do pedicelo, caem no chão.

Frutos quase completamente maduros logo antes de tornarem-se vermelhos são difíceis de infectar. Desta maneira, os conídios, ao caírem na superfície do fruto, germinam e morrem. Na germinação, os conídios exsudam uma quantidade fraca de material tóxico que é uma das causas da "mancha fantasma". Este é um anel diminuto esbranquiçado, com um centro pálido ou branco, que desaparece conforme o fruto completa o amadurecimento.

2.4. FITOPATOLOFIA FISIOLÓGICA

2.4.1. Fungos em Geral

Não é surpresa que os patógenos vegetais afetam o metabilismo e composição química de seus hospedeiros. Foram relatadas tanto alterações em: paredes celulares; permeabilidade da membrana; fotossíntese; respiração, como no metabolismo de regulação de crescimento e produtos do metabolismo secundário. Obviamente, muitas destas mudanças são conseqüências secundárias da infecção.

Aumento da fixação no escuro de $^{14}CO_2$ tem sido relatado para muitas doenças fúngicas. Parte deste acréscimo pode ser devido a habilidade do fungo de fixar CO_2, mas foi também observado estímulo na ausência do patógeno após aplicação dos produtos tóxicos do patógeno conhecidos como causadores da totalidade dos sintomas (patotoxinas). Aumento na fixação de CO_2 pode ocorrer via um ácido C_3 (enzima málica ou carboxilase fos

foenolperuvina) ou pelo aumento "turnover" da ribulose-5-fosfato e ribulose - 1,5 - bisfosfato.

Fotossíntese pode também ser estimulada em folhas não infectadas das plantas doentes quando a fotossíntese das folhas infectadas é inibida. Associado com este estímulo, há um aumento de translocação da folha não infectada para folhas infectadas. Esta atividade pode benificiar o parasita, desde se nutrientes podem ser usados para favorecer seu crescimento (HANCHEY-BAUer, 1979).

Nos estádios posteriores da infecção, certos patógenos, denominados patógenos obrigatórios, porque na natureza necessitam de uma planta viva com a qual completam seus ciclos de vida, induzem o aparecimento de regiões denominadas *ilhas verdes* ao redor dos locais de infecção. Estas ilhas foram descritas em 1881, por CORNU (apud DEKHUIJZEN, 1976). Embora o resto dos tecidos infectados podem ter amarelecidos, os tecidos ao redor do patógeno atuam como fonte de consumo metabólico e permancem verdes e fotossinteticamente ativos. Apesar disso, os tecidos infectados permancem funcionais por um período suficientemente longo para que o patógeno obrigatório possa extrair substâncias necessárias para o crescimento do próprio patógeno.

Citocininas estão envolvidas na formação das ilhas verdes. Mas para DEKHUIJZEN (1976); são os metabólitos desconhecidos do fungo que engatilham ou a formação de quantidades anormais de citocininas pelas células do hospedeiro ou retardam a quebra da citocinina.

Infecção de plantas também é caracterizada por respiração aumentada. A taxa de respiração é influenciada por vários fatores, um dos mais importantes sendo a disponibilidade de ADP .

Os níveis de ADP são mais altos quando há um "turnover" aumentado de ATP tal como ocorrerá durante crescimento rápido. Foi descrito também um deslocamento da seqüência predominantemente glicotílica-ciclo de Krebs do metabolismo para o caminho respiratório da pentose-fosfato. Em alguns casos, este desvio é paralelo à respiração aumentada. Em outras doenças, o deslocamento ocorre mais tarde e pode estar predominantemente associada ou o metabolismo do fungo (HANCHEY-BAUER, 1979).

Quando a patotoxina foi substituída pelo patógeno, um desvio para o caminho da pentose-fosfato se paraleliza com a respiração aumentada. O destino da glicose marcada C^{14} foi seguido e se encontrou que apareceu em muitos componentes de parede celular. O significado desta mudança pode ser relacionado com modificações não comuns da parede celular encontrado em estádios mais iniciais em muitas doenças. Estas modificações de parede parecem se formar em parte por acúmulo de produto de dictiossomos entre a membrana do plasma e a parede celular. A função destes não é conhecida mas pode representar uma tentativa feita pelo hospedeiro para reparar áreas danificadas (HANCHEY-BAUER , 1979).

Em um número de doenças causadas pelos biotróficos, parece claro que a infecção conduz a alterações em processos tais como respiração e translocação, alterações que são benéficas, serão mesmo necessárias para o desenvolvimento do patógeno. O potencial é menos óbvio em doença caracterizada por dano celular ou necrose e, em geral, sucetibilidade em tais casos tem sido considerada um atributo passivo do hospedeiro.

Entretanto, no caso de fungos que produzem toxinas afetando especificamente o hospedeiro, é possível causar colonização por microorganismos não patogênicos, desde que seja pro

videnciada a toxina apropriada que é então adicionada ao inóculo. Neste caso, tanto o mecanismo de resistência foi suprimido pela toxina ou ainda as células foram alteradas para condição suscetível (DALY, 1976).

Para um patógeno penetrar na planta, a entrada deve ser tanto através de aberturar naturais (ou ferimentos) ou o patógeno deve amolecer ou degradar as paredes da célula. Todos os patógenos fúngicos e bacterianos estudados produzem enzimas degradadoras de parede celular em cultura, mas para demonstrar um papel na doença, as enzimas devem se apresentar na planta doente. Tem sido encontradas celuloses, hemiceluloses e vários tipos de enzimas pécticas. As enzimas pécticas são indubitavelmente as mais importantes, desde que a destruição das péctinas da lamela média causará a dissolução da parede celular e permitirá que as microfibrilas de celulose deslizar livremente uma da outra. As mais importantes das enzimas pécticas em doenças são as *Endopoligalacturonases*. Estas enzimas clivam o ácido poligalacturônico de maneira aleatória em oposição a clivagem resíduos terminais simples (HANCHEY-BAUER, 1979).

Uma questão importante em relação ao papel das enzimas de parede celular é porque, quando a maioria dos patógenos produzem as enzimas facilmente em cultura, estas só são efetivas na infecção apenas quando estão dentro do hospedeiro apropriado?

Em uma série de trabalhos, o grupo de ALBERSHEIM (ALBERSHEIM & ANDERSON-PROUTY, 1975) encontrou que as composições das paredes celulares de várias plantas não são suficientemente distintas para causar indução diferenciada das enzinas degradadoras de polissacarídeos do patógeno. Foram encontrados em algumas plantas inibidores de endopoligalecturonases, entretanto, e

se presente em quantidades suficientemente altas, poderiam impedir a ação destas enzimas. Há, porém, um problema: muitos patógenos são altamente específicos e só atuarão em certas variedades de uma determinada espécie, mas os inibidores são suficientemente diferentes entre variedades para explicar esta especificidade.

Outros fatores de parede celular podem estar envolvidos na resistência. Modificações da parede celular em tecidos mais velhos, tais como formação de pectatos de cálcio, as tornam mais resistentes as enzimas degradadoras de parede, e isto pode explicar mudanças de suscetibilidade com a idade, fato que ocorre em algumas doenças.

Plantas superiores frequentemente também possuem várias enzimas como as *QUITINASES*, que degradam as paredes do patógeno. Estas enzimas podem, em alguns casos, ser inibidas por um produto do patógeno.

Resistência pode ser descrita como uma habilidade herdada da planta para impedir ou restringir estabelecimento e as atividades subseqüentes do patógeno potencial. Esta descrição distingue resistência do escape à doença. Também reconhece que a colonização pelo patógeno é distinta de sua habilidade de causar dano, como, por exemplo, através de toxina difusível (DALY, 1979).

Em anos recentes, os termos compatíveis e incompatíveis tem sido utilizados como sinônimos de sucetível e resistente. Os primeiros termos têm a vantagem de focalizar a atenção nas interações celulares entre o hospedeiro e patógeno, mais do que a importância econômica da doença. Entretanto, deve ser lembrado que a reação "compatível" para um organismo necrotrófico não é o equivalente fisiológico da reação envolvendo o patógeno biotrófico. No tipo necrotrófico, o despareamento celular do hospedeiro

é característico da doença e talvez essencial para colonização . Com o tipo biotrófico é menos evidente um dano grande das células do hospedeiro, na maioria dos casos, aumento de certas funções celulares parecem ser necessário para o desenvolvimento da doença.

Embora barreiras passivas morfológicas e químicas podem ser importantes para algumas doenças, a especificidade extrema que freqüentemente existe entre cultivares do hospedeiro e linhagens ou raças patogênicas não é rapidamente explicada em termos tão simples como diferenças na composição ou estrutura da parede celular. Ainda mais, é de experiência geral que os eventos de penetração e o desenvolvimento inicial dos patógenos em tecidos resistentes e sucetíveis são praticamente idênticos.Estes fatos, acrescidos aos conceitos de regulação metabólica obtidos de bioquímica, levaram à aceitação geral da idéia que a resistência é o resultado da atividade bioquímica induzida após a invação(DALY, 1979).

Há um número crescente de evidências sugerindo que algum tipo de reação de reconhecimento ocorre numa fase bem inicial da infecção e pode preceder a verdadeira penetração no hospedeiro.

Na doença do tabaco causada pelo fungo *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*, a resposta do hospedeiro ocorre quando o tubo germinativo do esporo entra em contacto com a parede da célula de epiderme da raiz das variedades resistentes. A reação consiste da formação de vesículas originadas a partir do retículo endoplasmático e dos dictiossomos. O conteúdo das vesículas é liberado, através da membrama plasmática e se acumula contra a parede celular. Logo após a penetração, a célula morre e o crescimento do fungo é inibido. Células suscetíveis não reagem tão rapida

mente, e assim os filamentos do fungo ramificam-se através de outras células (in HANCHEY-BAUER, 1979).

Na determinação da especificidade tão inicial encontrou-se uma correlação entre suscetibilidade e ocorrência de proteínas semelhantes entre hospedeiro e patógeno. A função intra-celular das proteínas não foi estabelecida nos dados de muitas combinações hospedeiro-patógeno sugerem que o hospedeiro tem a capacidade de reconhecer *ANTÍGENOS* estranhos (proteínas) e desta maneira reagir contra estes (HANCHEY-BAUER, 1979).

HANCHEY-BAUER (1979) propõem a hipótese que patógenos bem sucedidos, através de coevolução, podem ter selecionado proteínas semelhantes às encontradas nos respectivos hospedeiros naturais e desta maneira atrasam a detecção e as reações associadas de defesa até que a infecção esteja bem estabelecida. Não há, entretanto, evidências que as plantas tem um sistema imunológico semelhantes aos animais superiores (SCHEFFER & LIVINGSTON,1984). O mecanismo de reconhecimento e não reconhecimento de proteínas permance obscuro.

ALBERSHEIM & ANDERSON-PROUTY (1975) propõem um sistema de reconhecimento baseado na química de carboidratos das paredes celulares tanto do hospedeiro como do patógeno. HANCHER-BAUER corrobora esta hipótese indicando três fatos:

1. a levedura *Hansenula winger* somente passará por cruzamento sexual quando dois tipos diferentes de parcerios (sexos) estão juntos, os dois tipos aparentemente reconhecem os carboidratos da parede do parceiro;

2. *Rhizobium* que nodula soja tem uma camada de carboidratos diferente das linhagens que não formam nódulos;

3. a habilidade dos grãos de pólen de germinar e penetrar somente na espécie apropriada tem sido atribuída às características de carboidratos da superfície.

Atualmente acredita-se que devido à complexidade estrutural dos polissaconídios da parede estes possam ser usados como código de mensagens biológicas (HAHN et al., 1981), embora o mecanismo bioquímico envolvido no processo seja desconhecido.

2.4.2. A. *solani*

2.4.2.1. Relação de Conteúdo de Açúcar x Sucetibilidade

Há uma relação entre o conteúdo de açúcar e sucetibilidade à doença. Algumas doenças são favorecidas por alto conteúdo de açúcares como ferrugens. Outras doenças são favorecidas por baixo conteúdo de açúcares, como exemplo, temos A. *solani* em tomate. Quando a frutificação é proibida, o conteúdo do açúcar das folhas é alto e as plantas são resistentes à pinta-preta. É o que acontece quando se aplica hidrazida maléica, que inibe o transporte de açúcar (HORSFALL, 1979).

O fungo pode invadir e crescer bem utilizando os açúcares das folhas jovens sem danificar estas folhas. SANDS & LUKENS (1974) mostraram que estes açúcares inibem a ação das enzimas destrutivas de A. *solani*.

Quando os frutos do tomateiro são formados, o açúcar é translocado das folhas mais velhas para os frutos. Quando o suprimento de açúcar desaparece das folhas, o fungo ativa as enzimas

pectolíticas e celulíticas para fornecer a si o suprimento de açúcar e, neste processo, causa dano às folhas (POWELL, 1979).

Já que estamos falando desse assunto, deve-se referir ao aumento do conteúdo de açúcares na folha; aumento associado com infecções no caule e no pecíolo causadas pelo vírus do enrolamento de folhas de batata. Nestas plantas não há sintomatologia,pois A. *solani* tem todo o açúcar que necessita, de tal maneira que o fungo vive sobre as folhas sem danificá-las e nas plantas afetadas pelo vírus do enrolamento de folhas não há nenhum sinal sensível da doença, mesmo em presença do fungo.

2.4.2.2. Deficiência de Magnésio x Suscetibilidade

A doença pinta-preta no tomateiro é um caso de planta que se torna sucetível ao fungo quando é enfraquecida por deficiência de magnésio. Por exemplo, os frutos do tomateiro raramente apresentam manchas de A. *solani* em condições normais, mas quando ocorre falta de magnésio cada fruto no campo torna-se doente (CRUPP & SHERF, 1960).

De alguma maneira, a folhagem geralmente não é afetada até que os frutos alargados removeram quantidades de nutrientes suficiente para enfraquecer as folhas. Na ausência de magnésio , entretanto, tanto a folhagem como até as plântulas tornam-se infectadas.

2.4.2.3. Indução de Conídios por Luz Azul

Verificou-se a formação de várias estruturas reprodutivas em fungos, tais como: conídios, peritécio e basiocarpo é cau

sada por luz azul e luz ultravioleta próxima.

Maturação de conidiofóros em *Alternaria tomato* (CKe) Weber; *Botrytis cenerea* Pers. ex Fr; *Helminthosporium oryzae* V. Breda de Hann e A. *chichorii* Wattras estão sobre controle induzido pela luz azul e luz ultravioleta próxima em fotoreáção reversível.

Tal fotoreação reversível está envolvida também na indução do conídio em A. *tomato*. Estes fungos, como os demais citados, não forma conídios no escuro total, quando cultivado no meio de batata-dextose-ágar (BDA). Entretanto, quando colônias crescidas no escuro são expostas à luz ultravioleta próxima seguida por escuro há indução da formação de conidióforo e os conídios se desenvolvem (KUMAGAI, 1982).

Se a luz azul é aplicada imediatamente após a irradiação com luz ultravioleta próxima, a indução na formação do conidióforo é suprimida e nenhum conídio é formado. Os efeitos dos dois comprimentos de luz podem ser revertidos repetidamente, a resposta final depende da última luz administrada. Quando o conídio é induzido por irradiação com a mistura das luzes ultravioleta próximo e azul, o tempo necessário para indução de conídio e o total de conídio finalmente produzido depende da velocidade de fluência dos dois componentes.

Estes parâmetros são proporcionais a velocidade de fluência da luz, pois o tempo necessário para indução do alongamento do conídio e o total do conídio decrescem com um abaixamento da velocidade de fluência de luz azul e vice-versa (KUMAGAI, 1982 e 1983).

A. *tomato* é extremamente relacionada com A. *solani* , sendo que em A. *tomato* as manchas das plântulas, caule e folhas se assemelham as de A. *solani*, mas os anéis concêntricos estão

juntos e são mais delicados na aparência. Na verdade, as duas espécies são distinguidas pelas manchas do fruto (CHUPP & SHERF, 1960.

2.5. DEFINIÇÕES E CARACTERÍSTICAS DE SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS COM DOENÇAS FÚNGICAS

2.5.1. Substâncias em Geral

Não é surpresa que os parasitas vegetais afetam o metabolismo e composição química de seus hospedeiros. Foram relatadas alterações nas paredes celulares, permeabilidade da membrana, fotossíntese, respiração, metabolismo de regulação de crescimento e produtos do metabolismo secundário. Obviamente, muitas destas mudanças são conseqüências secundárias da infecção.

As plantas estão expostas a tipos incalculáveis de bactéria, fungos, vírus, insetos e nematóides, ainda assim suscetibilidade a estes agentes a doenças é a excessão, não a regra. E a natureza do dano causado por estes patogênicos e suas respectivas plantas "hospedeiras" é dependente não só do tipo do patogeno, mas também das condições fisiológicas da planta e do ambiente.

Os sintomas da planta tipicamente doente encontrada na natureza freqüentemente incluem crescimento atrofiado e alguma clorose ou mesmo morte.

Conforme o patógeno torna-se ativo dentro da planta, ele desvia desta alimentos para a existência e/ou reprodução do fungo.

O sucesso do patógeno em se estabelecer no hospedeiro pode depender da ação de antimetabólitos secretados pelo patógeno. Estes antimetabólitos são frequentemente denominados toxinas.

DICKINSON & LUCAS (1982) definiam toxinas como substâncias orgânicas que geralmente atuam em baixas concentrações, que são produzidas por organismos vivos (patógenos) e que afetam irreversivelmente os processos normais de outros organismos vivos (hospedeiros). São compostos de baixo peso molecular, como também o são os outros dois tipos de compostos que ocorrem nas interações

hospedeiro-patógeno: as fitoalexinas, que são produzidas pelo hospedeiro e os reguladores de crescimento, que são produzidos por ambos os parceiros.

O baixo peso molecular das toxinas *sensu stricto* a s diferencia dos compostos tóxicos de caráter enzimático (KIRÁLY, 1967).

2.5.2. Metabólitos Fitotóxicos

Vários estudos claramento demonstram que patógenos vegetais são capazes de produzir metabólitos em cultura que causam sintomas semelhantes àqueles encontrados nas infecções naturais. Em alguns exemplos, tanto o mecanismo de ação, como a estrutura química das toxinas têm sido elucidados. Entretanto, não se pode assumir que todos os microrganismos patógenos às plantas causam doenças através de toxinas.

Há muitas estratégias ofensicas e defensivas empregadas tanto pela planta como pelo patógeno, e a interação entre estes dois tipos de estratégias determina o sucesso ou fracasso da patogênese.

Um dos pioneiros nos estudos fisiológicos das doenças vegetais, Ernst Gaümann, em 1954 afirmou: "Microrganismos somente são patogênicos se estes são toxigênicos" (apud HANCHEY - BAUER, 1979). Esta generalização, um pouco radical, foi feita para enfatizar a importância dos produtos produzidos pelos patógenos, se são danosos como hospedeiro correspondente. Usando a mais ampla definição possível do termo "toxina" (HANCHEY-BAUER, 1979), um composto produzido biologicamente, que é danoso ao outro organismo, podemos imcluir tais substâncias como enzimas degradativas, hormônios em concentrações não comuns, e compostos de pequeno ou grande peso molecular, que interferem com a função normal das plantas.

Um número de parasitas facultativos (*Botrytis , Phytium, Verticillium, Fusarium, Seleratim*), atacam os tecidos hospedeiros através de compostos tóxicos que são, em parte, enzimas, enquanto outros são enzimas pécticas, que induzem os sintomas de "soft rot".

KIRÁLY (1967) enfatiza a distinção entre toxinas e enzimas pécticas, pois, ao contrário dos compostos tóxicos de caráter enzimático, as toxinas sensu stricto usualmente têm baixo peso molecular e são móveis nas plantas. Em adição, a toxina não ataca a integridade estrutural dos tecidos hospedeiro como as enzimas pécticas fazem, mas alteram o metabolismo de planta hospedeira de alguma maneira.

Entre os produtos de estratégia ofensiva produzidas pelo patógeno encontra-se as toxinas não enzimáticas. Uma toxina,quando liberada para o hospedeiro suscetível, pode incitar todas ou parte dos sintomas da doença.

O modo de ação de tais toxinas depende do composto em questão. Alguns são peptídeos ou glicopeptídeos, mas a maioria são substância de pequeno peso molecular com nenhuma identidade química em comum. Podem afetar permeabilidade de membranas, respiração mitocondrial, ou inibir várias reações enzimáticas essenciais; para outros, o mecanismo de ação permanece desconhecido.

A vitorina induz depolarização dos potenciais elétricos da membrana em período tão curto como 2 minutos após tratamento das raízes de aveias sensíveis. Saída de eletrólitos é detectada dentro de 5 minutos. Uma recuperação parcial dos potenciais da membrana seguida de efeito aparentemente irreversíveis na permeabilidade, respiração e outros processõs após um lag de 20 minutos sugerem que a toxina pode atuar em algum outro local, talvez intracelular, em adição a membrana plasmática.

Embora as toxinas não enzimáticas tenham sido consideradas por muitos como nada mais que curiosidades biológicas podem se mostrar como instrumental favorito de pesquisa por muitas pessoas interessadas na fitopatologia fisiológica. Desde que os sintomas da doença são produzidos pela toxina, pesquisadores podem evitar as dificuldades encontradas quando dois organismos vivos, o hospedeiro e o patógeno contribuem para qualquer mudança complexa observada. Além disso, juntos efeitos podem ser estudados em período certo, desde que não se precise esperar horas, ou mesmo dias, necessário para que ocorra a infecção pelo patógeno.

Na última década, tem havido um surgimento notável de interesse em toxinas microbianas de importância potencial em doenças vegetais. O conceito de toxina tem sido advogado desde a inserção de patologia vegetal como ciência na última metade do século XIX, mas pesquisa neste tópico tem seguido um caminho

difícil. O clima da opinião, entretanto, começou a mudar perceptivamente no fim dos anos 40 deste século. Esta mudança está enraizada em muitos desenvolvimentos científicos.

Toxinas de microrganismos causadores de doenças são os principais fatores no desenvolvimento de um número de doenças destrutivas. Dois exemplos clássicos são geralmente citados: as grandes perdas na produção de aveia na América do Norte de 1946 a 1948 e a produção de milho de 1970 a 1971 causadas por fungos do gênero Helminthosporium. Em ambos os casos, toxinas foram as principais fatores no processo destrutivo. Um número de outros fungos e bactérias infectantes de plantas são agora bem conhecidas como produtoras de toxinas com impacto econômico.

As toxinas tem 3 características essenciais segundo SCHEFFER, 1983:

a. toxinas são produtos de patógenos microbianos;

b. toxinas causam dano óbvio aos tecidos vegetais;

c. toxinas são conhecidas com confiança por estarem envolvidas no desenvolvimento da doença.

A terceira característica (c) está incluída porque fungos e bactérias em cultura produzem muitas substâncias que são tóxicas às celulas vegetais, mas que não tem papéis conhecidos no desenvolvimento da doença. Enzimas liberadas dos patógenos usualmente são arbitrariamente excluídas da categoria de toxina;desta maneira, a maioria das toxinas conhecidas até agora tem baixos pesos moleculares (SCHEFFER, 1983).

2.6. Toxinas

2.6.1. Classificação das Toxinas

2.6.1.1. Classificação segundo o desempenho (KIRÁLY, 1967; HANCHEY-BAUER, 1979).

Para provar o papel de causa na patogenicidade, vários critérios rigorosos devem ser satisfeitos. O mero isolamento de composto tóxico do meio de cultura no qual o patógeno cresce, não é suficiente, pois este composto pode muito bem ser um artefato dos procedimentos de isolamento ou, produzido, muito tarde, para estar envolvido nas interações iniciais.

Poucos exemplos são conhecidos, nos quais as linhagens patogênicas produzem toxinas, e as não patogênicas não produzem, sendo que a toxina afeta somente as variedades do hospedeiro normalmente atacadas pelo patógeno, e reproduz acuradamente todos os sintomas da doença. Estas toxinas são denominadas patoxinas.

Um exemplo típico da patoxina é a victorina. Vivotoxinas são compostos que mostram produzir pelo menos uma parte da síndrome da doença e o princípio tóxico deve ser isolado das plantas doentes e caracterizado quimicamente. São usualmente não-específicas. Exemplos típicos são as toxinas fusáricas de murcha e pricularina.

Fitotoxinas são produtos de toxinas que incluem poucos ou nenhum dos sintomas usualmente causados pelo patógeno vivo. São não-específicas para o hospedeiro e não há relação entre a produção de toxinas e a patogenicidade do agente causador da doença (FIGURA 1).

Ácido alternárico é um exemplo típico de fitotoxina segundo KIRÁLY, 1967 (ver FIGURA 1 I).

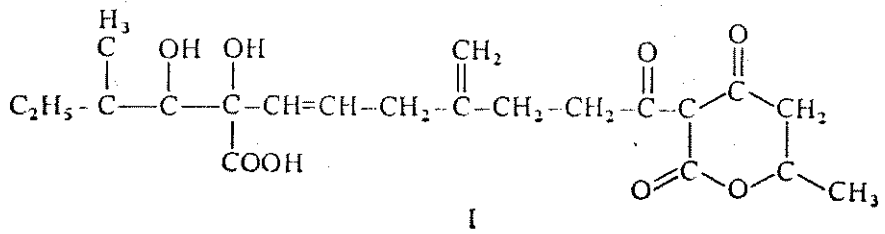
KIRÁLY reconhece que este tipo de classificação por desempenho, como qualquer tipo de classificação, tende a distorcer a realidade; entretanto, a caracterização descrita das toxinas irá permitir à patologia vegetal acesso a um grau de claridade do papel real que estes metabólitos microbianos desempenham na patogenicidade.

FIGURA 1 - Estrutura e identidade química de algumas fitotoxinas, segundo RUDOLPH, 1976.

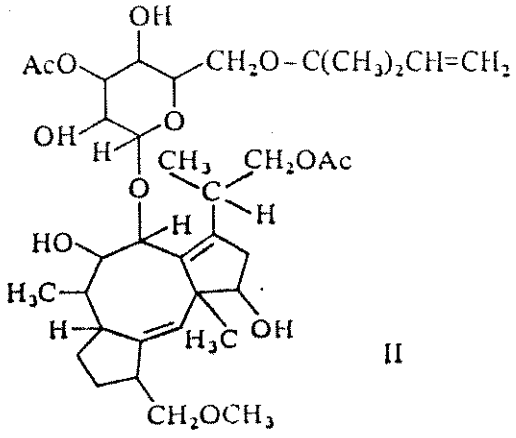
I - ácido alternárico - derivado hemiquinona
II - fusicocina - composto terpenoide
III - tabtoxina - derivado de aminoácidos
IV - cercosporina - derivado benzoperileno
V - ácido tenuazônico - estrutura pirolina
VI - marticina - derivado naftoquinona
VII - ofiobolano - composto terpenóide
VIII - ácido fusárico - derivado de aminoácidos
IX - rizobitoxina - derivado de aminoácidos

A marticina (VI) derivado naftoquinona. Estudo recente (HOLENSTEIN et al 1983) mostrou evidência para uma origem mista deste composto a partir de policetídeo e do caminho do ácido tricarboxílico.

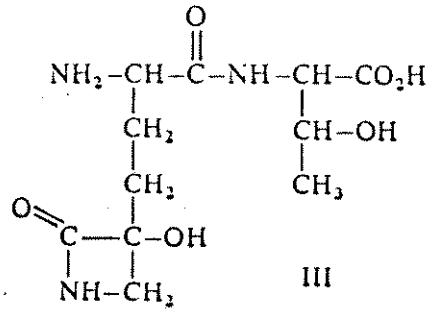
FIGURA 1



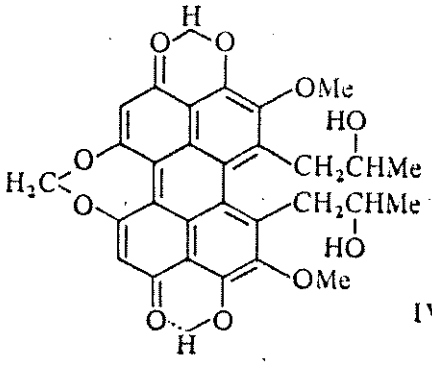
I



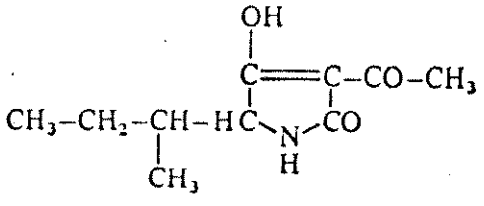
II



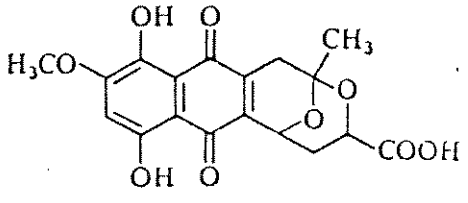
III



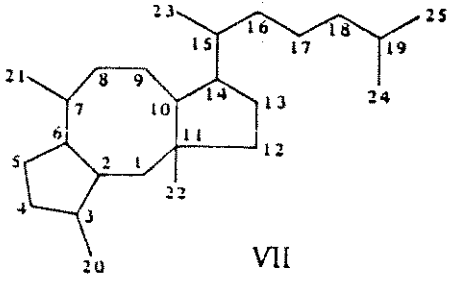
IV



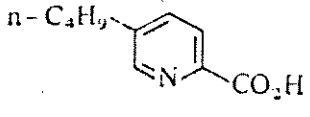
V



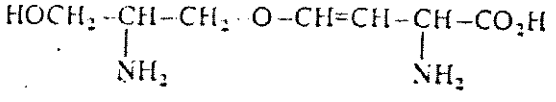
VI



VII



VIII



IX

Para SCHEFFER (1983), os termos "vivotoxinas" e "patoxinas" são confusos e não seriam necessários se fosse usada a classificação por especificidade. Para este autor, este termo "fitotoxina" pode ser mal interpretado, porque freqüentemente é usado para indicar substâncias tóxicas de plantas superiores.

Exemplos de patotoxinas, segundo HANCHEY-BAUER (1978):

1. a toxina de *Helminthosporium maydes* (Hmt), cujo nome vem do fungo que causou a perda da importância de quase 1 bilhão de dólares em milho, nos Estados Unidos, em uma epidemia muito severa ("Southern cornleaf blight"), de 1970-1971;

2. a toxina de *Helminthosporium victoriae* (victorina), responsável pelos sintomas de Victoria "blight" das aveias, uma doença séria no fim da década de 1940;

3. a toxina de *Helminthosporium sacchari* (helminthosporoside), envolvida na doença "eyespot" da cana de açucar; e

4. amilovorina - uma toxina produzida pela doença "fireblight", em peras, e causada pela bactéria *Erwinia amylovora*.

Segundo YODER (1980) e SCHEFFER & LIVINGSTONE (1984), deve-se considerar com atenção o conceito de patotoxina. Por exemplo, o polissacarídeo tóxico de *Erwinia amylovora* é, aparentemente, um componente da cápsula da bactéria, e nem é específico ao hospedeiro, nem tóxico e nem está, aparentemente, envolvido com patogenicidade. Outro caso são os glicopeptídeos de alto peso molecular, considerados na literatura como toxinas de atividade de membranas e que, aparentemente, atuam como agentes mecânicos de ligações com membranas e, portanto, não devem ser denominados de toxinas, já que o efeito destes peptídeos nas plantas se deve unicamente à grande dimensão que apresentam.

Vamos examinar com detalhes a ação fisiológica de uma patotoxina - a victorina.

VICTORINA (toxina HV)

Em 1946 as culturas de aveia dos Estados Unidos foram afetadas por uma doença de plântulas causada por *Drechslera (Helminthosporium victoriae)*. O fungo foi especialmente virulento em um cultivar conhecido como Victoria. Embora o patógeno se localizou tipicamente na porção basal das plantas infectadas, os sintomas se extenderam até as folhas, as quais frequentemente entraram em colapso. As suspeitas de ser uma toxina móvel responsável foram reforçadas quando foi demonstrado que os filtrados da cultura do fungo causaram os mesmos sintomas. (DICKINSON & LUCAS, 1982).

O composto envolvido foi denominado victorina e foi isolado e caracterizado pelo grupo de SCHEFFER como um peptídeo ligado a uma amina tricíclica (PRINGLE & SHEFFER, 1964).

A descoberta particularmente interessante sobre esta toxina foi que os cultivares de aveia resistentes não eram afetadas por ela, enquanto cultivares sensíveis, como Victoria, eram sensíveis a concentrações extremamente baixas, em outras palavras, a toxina mostrou a mesma especificidade que o patógeno (SCHEFFER & YODER, 1972).

DICKINSON & LUCAS (1982) mostram várias evidências para considerarmos a victorina como a principal causa, senão única, da doença:

1. especificidade da toxina é semelhante a especificidade do fungo;
2. há correlação direta entre produção da toxina e virulência;
3. somente linhagens do fungo que produzem a toxina são patogênicas.

Os cultivares sensíveis possuem um gene simples conferindo susceptibilidade. A toxina é tóxica em concentrações de cerca de 200 μg/ml (SCHEFFER & LIVINGSTON, 1984). O princípio tóxico é estável podendo ser autoclavado por períodos superiores a 2 horas, sem perda da atividade toxínica (LUKE & WHEELER, 1955).

A toxina tem vários efeitos no hospedeiro. Por exemplo, a taxa de respiração é aumentada enquanto a síntese protéica é inibida (HANCHEY-BAUER, 1979). Entretanto, YODER (1980) consi-

dera que a lesão primária se situa na membrana plasmática,desde que a toxina destrói a habilidade plasmática, paralisa a entrada ativa das plantas, aumenta o espaço livre aparente, causa ruptura a lise dos protoplastos isolados e perda rápida dos eletrólitos e materiais orgânicos. A ação da toxina pode ser contra-atacada por substâncias que se ligam às membranas. A perda crescente dos eletrólitos é um dos efeitos mais precocemente identificáveis. A victorina induz depolarização dos potenciais da membrana em período tão curto como 2 minutos após tratamento das raízes de aveias sensíveis. A saída de eletrólitos é determinada dentro de 5 minutos (HANCHEY-BAUER, 1979).

HANCHEY et al. (1968), encontraram que o primeiro sintoma ultramicroscópico visto, associado com a rápida perda dos eletrólitos, foi a dissociação da membrana plasmática da parede celular, deixando um espaço no qual os produtos de secreção de Golgi se acumularam, sugerindo que tais produtos não estavam mais integrando a parede celular existente.

HANCHEY-BAUER (1979) acredita que a recuperação parcial dos potenciais da membrana seguida de efeitos aparentemente irreversíveis na permeabilidade, respiração e outros processos após um lag de 20 minutos sugere que a toxina pode atuar em algum outro local, talvez intracelular, em adição a membrana plasmática.

SHAFNER et al. (1976), verificaram que a victorina rapidamente se liga com íons de cálcio e que os cultivares resistentes tem níveis mais altos de cálcio nos respectivos tecidos do que os tecidos de cultivares sensíveis, além de apresentarem mais sítios de ligação com cálcio. Os sintomas de doença se assemelham aos sintomas observados de deficiência de cálcio e foi sugerido que a ação da toxina seria em decorrência da deficiência de cálcio causada pela própria toxina nos cultivares com baixos níveis de cálcio (MANNERS, 1982).

LUKE & WHEELER (1955) trabalhando na Universidade Estadual de Louisiana trataram mais de 45 milhões de plântulas de aveia com a victorina. Estes autores isolaram mais de 900 plântulas insensíveis à toxina e desta maneira resistente ao patógeno. Esta técnica tem sido rotineiramente empregada em pesquisas

para resistência de outras doenças causada por patotoxinas.

A toxina victorina (HV) é liberada dos esporos em germinação e foi mostrado ser um fator inicial na colonização dos tecidos de aveia; a toxina também causa as mudanças fisiológicas iniciais característica da infecção (SCHEFFER & LIVINGSTON, 1984).

O tipo selvagem de *H. victoriae* sem toxina penetra em tecidos sensíveis de milho e induz uma mancha necrótica característica de reação de resistência. As células dos tecidos de aveia vivem também compativelmente com *H. victoriae* durante os estados iniciais de infecção indicando que são mais que níveis mínimos de toxinas que estão presentes nesta ocasião.

A teoria seria que, segundo SCHEFFER & LIVINGSTON (1984) a liberação de quantidades extremamente pequenas (traços) de toxinas aparentemente permitiriam que o fungo,que produz a toxina, crescer à expensa dos tecidos hospedeiros. A toxina se acumularia mais tarde, resultando na morte da célula do hospedeiro e em toxemia sistêmica. É interessante verificar que esta teoria se encaixa com perfeição à ação de *Alternaria solani*.

Por fim, é interessante ressaltar que a grande epidemia causada por *H. victoriae* na década de 40 foi consequência de introdução e uso generalizado de cultivares de culturas superiores mas geneticamente uniformes, que são freqüentemente vulneráveis a novos patógenos ou patógenos altamente adaptáveis. No caso citado, a epidemia ocorreu após o plantio generalizado de aveias com gene para resistência a *Rucinia coronata* (SCHEFFER & LIVINGSTON, 1984).

2.6.1.2. Classificação conforme o envolvimento na patogenicidade (YODER, 1980).

YODER (1980) sugere uma classificação simples baseada no envolvimento das toxinas em patogênese, distinguindo as moléculas produzidas pelo patógeno que são necessárias para que a doença ocorra e de outras moléculas que não estão envolvidas na iniciação de doenças, mas são necessárias para o processo de desenvolvimento da doença:

1. moléculas necessárias para patogenicidade;

2. moléculas necessárias para virulência.

Patogenicidade será o significado simples da habilidade de causa doença é um termo qualitativo, enquanto , virulência significa a quantidade de doença causada em sua extensão; é um têrmo quantitativo.

Para avaliar fatores de patogenicidade deve-se estabelecer claramente a diferença entre presença e ausência de doença, enquanto que para avaliar fatores de virulência são necessários métodos de qualificar a doença e de reação à toxina.

Os critérios utilizados para avaliar as toxinas como fatores de patogênese seriam: especificidade ao hospedeiro, presença na planta infectada, produção num passo chave do desenvolvimento da doença, indução de sintomas típicos da doença e correlação da virulência e quantidade de toxina produzida in vitro.

Pelos seus resultados, os pesquisadores (in YODER,1980) descobriram que as toxinas aparentemente são fatores de patogenicidade. Ainda, segundo YODER (1980), os patógenos raramente são capazes de distinguir células susceptíveis ou resistentes de protoplastos em cultura. As toxinas específicas para seu hospedeiro não somente reconhecem seletivamente os protoplastos susceptíveis, mas também são úteis na identificação de produtos híbridos. Por exemplo, protoplastos de milho são sensíveis a toxina helmintosperoside, enquanto os protoplastos de sorgo são insensíveis. STROBEL (1975) definiu a natureza química da toxina: o helminthosporoside é uma alfa-galalactosídeo composto de monossacarídeo galactose ligado ao anel de 3 carbonos, o indoxiciclopropril.

2.6.1.3. Classificação por especificidade (PRINGLE & SCHEFFER, 1964, SCHEFFER & LIVINGSTON, 1984).

Toxinas envolvidas no desenvolvimento de doença vegetal geralmente são classificadas como: ESPECÍFICAS - seletivas no hospedeiro e NÃO ESPECÍFICAS.

Toxinas seletivas são produzidas pelos fungos que são especializados ou restritos a certos cultivares vegetais e são tóxicas apenas aos hospedeiros do fungo que produz a toxina.

Toxinas não específicas, ao contrário, são tóxicas a muitas plantas, sem se considerar se as plantas são ou não hospedeiras ao microorganismo que as produz, em questão.

Como fatores de desenvolvimento de doenças, toxinas não específicas podem ser comparáveis às toxinas envolvidas em certas doenças de animais; nada comparável às toxinas seletivas de hospedeiros é conhecido para doenças de animais.

As toxinas que afetam as plantas conhecidas até agora tem baixos pesos (cerca de 1.000 daltons) moleculares e não resultam em animais injetados anticorpos ao contrário das toxinas que afetam os animais(DURBIN, 1983; SCHEFFER & LIVINGSTON, 1984).

As toxinas específicas ao hospedeiro conhecidas até agora estão restritas aos Fungos Imperfeitos (DURBIN, 1983) sendo que o gênero *Alternaria* é o gênero que apresenta maior número de espécies patogênicas que atuam através da liberação de toxinas específicas. As toxinas específicas conhecidas até 1984 são mostradas na TABELA 2.

É interessante ressaltar que além das toxinas específicas, os fungos podem produzir toxinas não específicas, como as produzidas por fungos do gênero *Alternaria* (TABELA 3).

TABELA 2

TOXINAS ESPECÍFICAS AO HOSPEDEIRO DE FUNGOS (SEGUNDO YODER, 1980; SCHEFFER & LIVINGSTON, 1984)

fungo	hospedeiro	sigla	ano de comunicação
gênero *Alternaria*			
A. kikuchiana	- pera japonesa (Pyrus serotina)	A.K.	1933
A. mali	- maçã	A.M.	1966
A. citri	- mexerica imperador e tangerina Bauly		1966
A. citri	- limão bravo		1970
A. alternata f. sp. *lycopersici*	- tomate		1976
A. fragariae	- morango		1978
A. longipes	- tabaco		1979
gênero *Helminthosporium*			
H. victoriae	- aveias	HV	1947
H. carbonum raça L	- milho	HC	1965
H. sacchari	- cana de açúcar		1969
H. maydis raça T	- milho	HMT	1970
Vários gêneros			
Periconia circinata	- sorgo de grão *Sorghum vulgare* var. *subglabrescens*, introduzida da África para EUA (PRINGLE & SCHEFFER, 1964)	P.C.	1961
Phyllosticta maydis	- milho		1973
Corynespora cassicola	- tomate		1975

Nomes do fungo com os autores (in SCHEFFER, 1976).

Alternaria kikuchiana Tanaka

Helminthosporium victoriae Meehan & Murphy

H. maydis Nisikado & Myaka

H. carbonum Ullstings

H. sacchari (B. de Hann) Butl.

Periconia circinata (mangin) Sacc.

TABELA 3

Toxinas não específicas liberadas por espécies de fungos do gênero *Alternaria*, segundo RUDOLPH (1976) e STROBEL (1982)

Espécie	Sinonimia	Toxinas não específicas	Identidade química	Efeito fitotóxico	Concentração tóxica mínima	Papel fisiológico
Alternaria alternata	A. tenuis	tentoxina	tetrapeptídio cíclico	clorose de plântula	0,2 ppm	Ligação com cloroplasto impedindo fotofosforilização
		altenuene	derivado dibenzopirona	clorose		Não se conhece o modo de ação
		polissacarídeo de grande peso molecular		clorose	0,5 ppm	
A. alternata A. kikuchiana A. longipes A. mali	A. tenuis	ácido tenuazônico	derivado pirrolino	clorose	250 ppm	Não se conhece o modo de ação
A. alternata A. cucumerina A. dauci	A. tenuis	alternariol monometil éter	policetídeo	clorose		Não se conhece o modo de ação
A. kikuchiana		altenina	derivado de carboidrato	necrose	0,02 ppm	
		derivado isocumarinico		necrose fraca		
A. radicinina	Stemphylium radicinum	radicinina (= estemfilone)	ceto-lactona	inibição de germinação		
A. solani		ácido alternárico	derivado hemiquinona	murcha necrose clorose	2 ppm	questionável
A. zinniae		ziniol	derivado benzenico	caules enrugados murchamento nervuras acastanhadas	250 ppm	
A. mali		alternariolide	depsipeptídeo		1 µM	Perda de eletrólitos

2.6.2. Toxinas específicas de fungos

Toxinas específicas ao hospedeiro foram isoladas de fungos de vários gêneros, predominante de Deuteromicetos. Até 1984 , 14 toxinas específicas ao hospedeiro tinham sido isoladas. Os hospedeiros de cada uma delas, bem como o ano de comunicação de cada uma delas, são mostrados na TABELA 2. Seis destas toxinas são conhecidas também por apresentarem siglas próprias.

Dois gêneros afins, apresentam-se com maior número de espécies fitopatogênicas que atuam através de toxinas específicas ao hospedeiro: *Alternaria* e *Helminthosporium*.

Historicamente a primeira toxina específica de hospedeiro relatada foi obtida em 1933 a partir de filtrado de cultura e fungo *A. kikuchiana* testada com a planta pera japonesa (YODER,1980). A maioria dos tipos de *Cochliobolus* de *Helminthosporium* são morfologicamente semelhantes, distinguido principalmente por sua faixa de hospedeiros, e penetram rapidamente na superfície tanto dos hospedeiros como dos não hospedeiros. Muitas "espécies" são inférteis. As faixas de hospedeiro são determinadas pelo menos em alguns casos, pela produção de toxinas específicas. (YODER, 1980).

As toxinas produzidas tanto pelo grupo *Alternaria* como pelo grupo *Helminthosporium* podem afetar as plantas sensíveis por interação com os produtos de genes nucleares ou genes citoplasmáticos.

Exemplos de efeitos de produtores de gene citoplasmáticos são a HMT toxina, que especificamente afeta a mitocondria das plantas sensíveis (MATTEWS et al 1979).

2.6.3. Toxinas dentro do gênero *Alternaria*

O gênero *Alternaria* apresenta espécies que liberam toxinas não específicas (TABELA 3) e espécies que liberam toxinas específicas ao hospedeiro (YODER, 1980; NISHIMURA & KOHMOTO,1983).

Há um grupo de espécies de *Alternaria* patogênicas que tem sido classificado principalmente em base de sua especificidade ao hospedeiro. Entre estas espécies estão:

A. kikuchiana

A. mali

A. citri

A. alternata f. sp. *lycopersici*

A. fragariae

Nenhum destas espécies tem ciclo sexual descrito, mas todas são morfologicamente semelhantes em seus estádios assexuais para ser classificada como *A. alternata* (NISHIMURA & KOHMOTO, 1983), sendo consideradas por estes autores como patótipos de *A. alternata* (TABELA 4).

Verificou-se que entre isolados de campo destes patotipos, aqueles que produzem uma toxina específica ao hospedeiro são patogênicos somente a planta que é sensível a toxina produzida.

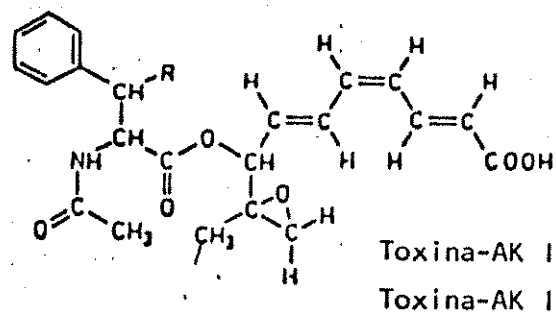
O fungo pode perder a habilidade de produzir toxina. Quando isso acontece, patogenicidade específica também é perdida, mas o fungo retém sua agressividade, isto é, habilidade para penetrar tecidos em geral sem causar doenças.

Os isolado sem toxinas encontrados no campo parecem existir como saprófitas não patogênicos. Quando cultivados, estes saprófitas podem aparentemente mutar para patogenicidade.Até

o presente, tem sido observada mutação aparente à patogenicidade em maçã (*A. mali*) e pera (*A. kikuchiana*).

Os mutantes patogênicos para maçãs produzem toxina AM e aqueles patogênicos para pera japonesa produzem toxina AK. Estas toxinas parecem serem fatores de patogenicidade, desde que mutação para perda de toxina resulta em perda de patogenicidade, enquanto que, mutação para aquisição de toxina resulta em ganho de patogenicidade.

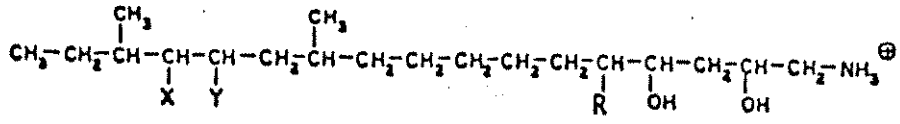
As estruturas químicas de toxinas específicas ao hospedeiro dentro do gênero *Alternaria* podem ser vistas na FIGURA 2.



(a) Toxina-AK

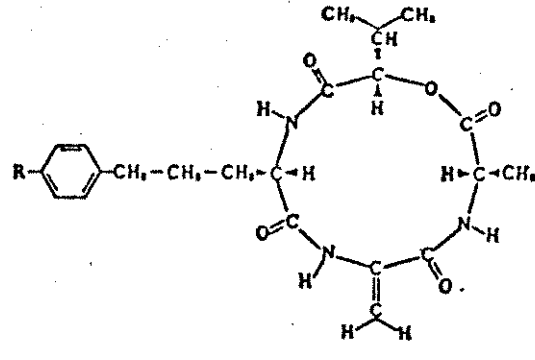
Toxina-AK I R = CH_3

Toxina-AK II R = H



Toxina-AL		R	X	Y
	a	OH	OH	$^{\ominus}O_2C-CH_2-CH(CO_2^{\ominus})-CH_2-CO_2$
T_A	b	OH	$^{\ominus}O_2C-CH_2-CH(CO_2^{\ominus})-CH_2-CO_2$	OH
	a	H	OH	$^{\ominus}O_2C-CH_2-CH(CO_2^{\ominus})-CH_2-CO_2$
T_B	b	H	$^{\ominus}O_2C-CH_2-CH(CO_2^{\ominus})-CH_2-CO_2$	OH

(b) Toxina-AL



(c) Toxina-AM

Toxina-AM I R = OCH_3

Toxina-AM II R = H

Toxina-AM III R = OH

FIGURA 2 - Estruturas químicas de toxinas específicas ao hospedeiro de *Alternaria*, segundo NISHIMURA & KOHMOTO, 1983b. Para correspondência do nome da toxina com fungo, doença e hospedeiro, ver TABELA 4.

TABELA 4 - Toxinas específicas ao hospedeiro de Alternaria (patotipos de Alternaria alternata (Fries) Keissler segundo NISHIMURA & KOHMOTO, 1983a.

Patotipo de A. Alternata nomes anteriores	Doença	Hospedeiro	Toxina
1. Patotipo de maçã (A. mali)	Mancha Alternaria de maçã	maçã, pera	toxina-AM
2. Patotipo de citros (A. citri)*	Pinta marron de citros	citros	toxina-AC
3. Patotipo de pera japonesa (A. Kikuchiana)	Pinta preta de pera japonesa	pera japonesa	toxina-AK
4. Patotipo de morango	Pinta preta de Alternaria de morango	morango pera japonesa	toxina-AF
5. Patotipo de tabaco (A. longipes)	Pinta marron de tabaco	tabaco	toxina-AT
6. Patotipo de tomate (A. alternata sp. lycopersici	Câncer de caule de tomate	tomate	toxina-AL

* Dois isolados diferentes, patogênicos, foram encontrados para Citrus reticulada (por exemplo, cvs."tangerina Dancy" e "mandarina Imperador") e patogênico para C. jambhiri (limão bravo). Cada isolado produz toxina seletiva para cada planta-hospedeira: ACT - toxina e ACR - toxina, respectivamente.

Toxinas Seletivas de *Alternaria kikuchiana*

Uso amplo de novas variedades de plantas cultivadas , geralmente traz novos problemas de doenças. Desta maneira, a doença da mancha-preta das peras japonesas (*Pyrus serativa*) apareceu devido à introdução de uma variedade de mutante natural "Nijisseiki". O organismo causal foi identificado em 1917, como *Alternaria*, mais tarde denominado *A. kikuchiana* (TANAKA, 1933 *in* PRINGLE & SHEFFER, 1964).

Variedades mais velhas são ditas serem altamente resistentes à doença, embora as peras japonesas cultivadas pareçam variar grandemente na resistência relativa e susceptibilidade. Somente poucas variedades são consideradas altamente susceptíveis . Variedades americanas e européias (*P. comunis*) são, aparentemente, resistentes à doença e *A. kikuchiana* nunca foi mostrado nos EUA.

TANAKA, em 1933 (*in* PRINGLE & SHEFFER, 1964), relatou a produção de um fator seletivo ao hospedeiro, termolabel, pelo fungo causal em cultura. Ele aspergiu filtrados de cultura nos frutos e verificou que as peras da variedade sensível ficaram danificadas, enquanto que aquelas das variedades resistentes permaneceram ilesas.

As observações originais da toxicidade relativa dos filtrados de cultura foram confirmadas por vários grupos, no Japão , nos anos posteriores (1947, 1952, 1954, 1958 e 1962 *in* PRINGLE & SHEFFER, 1964). Trabalhos histológicos também reforçaram este fato, mostrando que células de plantas susceptíveis foram mortas bem antes do avanço do fungo.

A toxina seletiva de *A. kikuchiana* (toxina AK - Fig. 2) foi caracterizada como um ester de N-acetil B-metilfenilalanina e um ácido decatrienólico, com um grupo exopido: uma segunda forma conhecida contém um derivado -dimetilado (NAKASHIMA et al. 1982).

2.6.4. *Alternaria solani*

A Mancha de alternaria, ou pinta-preta, doença causada por *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout, é encontrada em todas as regiões onde são cultivados o tomateiro e a batatinha.

A importância da Mancha de alternaria cresce nos meses mais quentes, ocorrendo condições de alta umidade. Nestas condições, é comum a descruição completa das culturas em qualquer idade da planta. Deve-se realçar que, sendo uma doença que ataca também o fruto do tomateiro, leva à uma perda total (planta e frutos) das plantas doentes. Quando a sua ocorrência se verifica nas plantas novas ou de viveiro, ela pode destruir toda a cultura, causando danos graves.

A doença de Mancha de alternaria é causada pelo fungo *A. solani*, cujos conídios germinam em ampla faixa de temperatura (1° a 45°C), sendo o ótimo entre 26° e 30°C. Os conídios produzidos nas lesões e nos restos de cultura são levados pelo vento, por insetos, sementes, homem e implementos agrícolas. N a presença de água, a germinação ocorre em 1 a 2 horas. Normalmente, os primeiros sintomas surgem de 2 a 3 dias após a penetração. Em condições de alta umidade relativa do ar, as lesões esporulam abundantemente (GALLI & TOKESHI, 1979).

Um gene parcialmente dominante, chamado Ad, foi incorporado aos cultivares de mesa Manalucie, Manapla, India River e Floradel de *Lycopersicon esculentum*, conferindo resistência moderada à *A. solani*. Mesmo esta moderada resistência de certos cultivares de mesa é problemática.

A Mancha de alternaria é uma doença que evolui em três fases: manchas foliares, lesões no caule e podridão de frutos . Sabe-se que este gene Ad só atua na fase de lesões do caule.Para uma resistência eficiente para esta doença, a indução e seleção de mutantes pelas técnicas de culturas *in vitro* podem ser uma alternativa bastante eficiente para localizar estas novas fontes de resistência, a partir de células de cultivares comerciais para o consumo *in natura* e industrial.

O ácido alternárico ($C_{21}H_{30}O_8$ - Figuras 1 e 3), produzido por *Alternaria solani* foi o primeiro metabólito tóxico identificado a partir de filtrados de culturas (BRIAN et al., 1949 ; BARTELS-KEITH, 1952).

Em 1951 o grupo de BRIAN verificou que este apresenta características antibióticas. O antibiótico é isolado do meio ótimo de crescimento de A. solani por extração com clorofórmio após ajustar-se o pH para 3,5; o solvente é então evaporado e o resíduo cristalizado com benzeno. São obtidas produções na ordem de 150 mg/l.

O ácido alternário não é antibacteriano e a sua ação antifúngica se faz de duas maneiras:

a) inibe a germinação de esporos de alguns fungos (por exemplo, Absidia glauca, Myrothecium verrucaria) na concentração de 1 µg/ml e até menos

b) retarda marcantemente o crescimento dos tubos germinativos logo após a germinação, que não é afetada por concentrações tão altas como 100 µg/ml, embora, o efeito inibidor de crescimento seja afetado por concentrações extremamente baixas (0,01 µg/ml) como foi observada em Botrytes alhi (BRIAN et al, 1951).

Embora o ácido alternárico seja comprovadamente antibiótico, seu papel em patogênese é questionado (GOODMAN, et al. 1967). Mais recentemente foi proposto por pesquisadores russos (in STOESSL, 1982) que o ácido alternárico (que é produzido também para Macrosporium solani Ell& Grout) aumentou a resistência da batata e do tomate a estes fungos quando aplicados em aspersão nas concentrações de $1x\ 10^{-4}$ e 1×10^{-3}%. Em concentrações mais altas o efeito do ácido revelou ser o oposto. Segundo STOESSL (1982) este efeito protetor do ácido alternárico pode estar funcionando como de fitoalexina Este autor enfatiza que outros metabólitos de A. solani que só eram conhecidos anteriormente de culturas em meios de laboratório, (STOESSL, 1967; STOESSL, 1969; GORDON et al. 1972; STOESSL et al. 1979), são sintetizados pelo fungo em tecido de batata e que pelo menos um deles atua como fitoalexina (STOESSL, 1982). Este autor verifica que realmente, o ácido alternárico não teve efeito de eliciador em seus experimentos.

A pesquisa da natureza dos metabólitos fitotóxicos de A. solani levou o grupo de STOESSL (STOESSL et al. 1983 e STOESSL & STOTHERS, 1983) a descobrir em A. solani a produção da fitotoxina ziniol que também foi encontrada em outras espécies do

genêro Alternaria (A. dauci e A. cathami) e de mais um metabólito de origem antraquinônica, o tetrahidroaltersolanol B. Neste mesmo ano, um grupo do Japão (ICHIHARA et al 1983) isolaram três metabólitos fitotóxicos de Alternaria solani, os quais denominaram solanopirona A, ($C_{18}H_{22}O_4$), solanopirona B ($C_{18}H_{24}O_4$) e solanapirona C ($C_{19}H_{25}NO_4$). Estes autores verificaram que a solanopirona A induziu lesões necróticas na folha da batata em concentrações de 100 µg//100 ml.

ICHIHARA et al (1983) baseando-se na similaridade estrutural entres estas solanopironas com betaenonas e compactina antecipam atividade biológica promissora para estes metabólitos de A. solani não só em fitotoxicidade mas, também, em atividade de inibição enzimática.

As estruturas dos metabólitos fitotóxicos de A. solani podem ser vistas na Figura 3.

O grupo de STROBEL (MATERN et al. 1978), procurou isolar e identificar a toxina de Alternaria solani. Verificaram que, pelo menos dois compostos de origem lipídica são requeridos para o aparecimento dos síntomas típicos associados com a doença, em bioensaios com folhas de batata cultivar Russet Burbant. Os dois compostos são individualmente inativos e podem ser usados para selecionar clones sensíveis e insensíveis à toxina. Os clones são regenerados a partir de protoplastos em cultura. Além disso, a sensibilidade ou insensibilidade à toxina nesses clones é bem correlacionada com suceptibilidade e resistência a A. solani. Clones de batata que tem sido produzidos por técnicas de regeneração de células somáticas mantém seu tipo de reação a esta toxina por pelo menos duas gerações de propagação vegetativa. O mesmo grupo de pesquisadores utilizou a toxina de A. solani em folhas de centenas de plantas de batata derivadas de protoplasto. O resultado revelou uma variação nos clones com relação a sensibilidade à toxina. Alguns eram severamente afetados, outros mantinham a resposta dos pais e, alguns clones possuiam elevada resistência à toxina e à doença.

O grupo de STOESSL (HOLLENSTEIN & STOESSL, 1983) estudou também a fitotoxicidade do pigmento produzido por A. solani, uma substância tetrahidrozntraquinônica, o altersolanol A. Os autores

verificaram que a fitotoxicidade desta substância (o terceiro metabólito caracterizado quimicamente, isolado de *A. solani*, que mostrou possuir atividade fitotóxica) é somente moderada e não específica, pois foi fototóxica na batata, tomate e ervilha, causando necrose nas folhas e inibindo o crescimento de raízes, sendo encontrada em quantidades diminutas, o que levanta dúvidas quanto ao papel que desempenha na patogenicidade, embora apresente atividade citotóxica no sistema 9 KB, quando testada na atividade antitumoral.

Testes do filtrado de cultura de *A.solani* foram feitos por HANDA et al. (1982), utilizando células em suspensão, para estudar-se a produção de toxina(s) específica(s) por *A. solani*. Os resultados mostraram que as preparações de toxinas de filtrados de cultura de *A. solani* foram mais tóxicas às suspensões de células das espécies vegetais que são hospedeiras de *A. solani* do que suspensões de células de espécies que não são hospedeiras deste patógeno. Os resultados também mostram que as suspensões de células das espécies hospedeiras podem ser usadas para quantificar, de maneira reproduzível, a quantidade de atividade fitotóxica extracelular do PTA (preparação tóxica de *Alternaria*) produzida pelo fungo durante seu crescimento em cultura.

HANDA et al. (1982), também obtiveram linhas de células de batata que exibiram um aumento de tolerância de crescimento em relação ao preparado tóxico (PTA).

Por esses resultados mencionados, verifica-se que toxina(s) específica(s) de *A. solani* pode(m) ser usada(s) na obtenção de plantas resistentes à doenças.

A possibilidade de pré-seleção *in vitro*, através do emprego da toxina do fungo *A. solani* no meio de cultura, poderá aumentar a eficiência de seleção dos genótipos favoráveis.

FIGURA 3 - ESTRUTURA DOS COMPOSTOS FITOTÓXICOS ENCONTRADOS EM *Alternaria solani*.

A. Metabólitos de origem terpenica (STOESSL, 1982)

(1) ácido alternárico
(2) altersolanol A
(3) macrosporina
(4) metil alternato
(5) capsidiol
(6) capsenona
(7) fituberina
(8) rishitina
(9) solavetivona
(10) 2 - epilubimina
(11) 10- epilubimina
(12) lubimina
(13) hidroxilubimina
(14) 15 - dihidro - 2 - epilubimina
(15) 15 - dihidro - 10- epilubimina
(16) 15 - dihidrolubimina
(17) fituberol

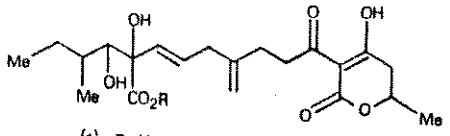
B. Metabólitos de origem antitraquinonica (HOLENSTEIN & STOESSL, 1983)

1a altersolanol A
1b altersolanol B
1c dactilariol
1d bostricina
2a macrosporina
2b antraquinona
2c antraquinona

C. Metabólitos de origem pironica (ICHIHARA et al, 1983)

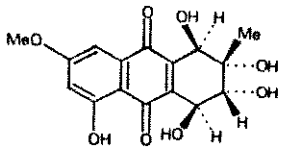
1 - solanopirona A
2 - solanopirona B
3 - solanopirona C

FIGURA 3

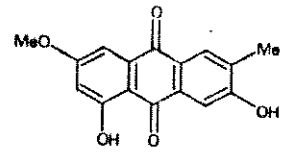


(1) R=H
(4) R=Me

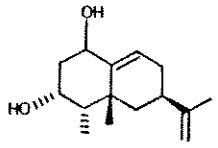
A



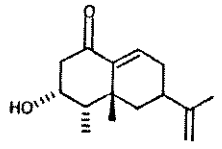
(2)



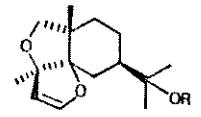
(3)



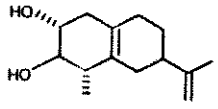
(5)



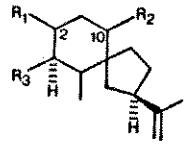
(6)



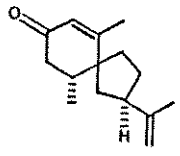
(7) R = Me·CO
(17) R = H



(8)

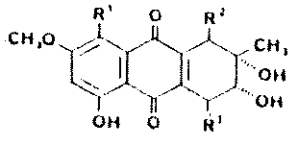


(10) R_1 = β-OH, R_2 = α-CHO, R_3 = H
(11) R_1 = α-OH, R_2 = β-CHO, R_3 = H
(12) R_1 = α-OH, R_2 = α-CHO, R_3 = H
(13) R_1 = α-OH, R_2 = α-CHO, R_3 = OH
(14) R_1 = β-OH, R_2 = α-CH_2OH, R_3 = H
(15) R_1 = α-OH, R_2 = β-CH_2OH, R_3 = H
(16) R_1 = α-OH, R_2 = α-CH_2OH, R_3 = H

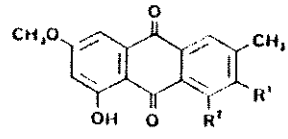


(9)

B

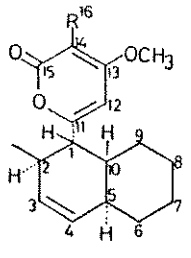


	R¹	R²	R³
1a	H	β-OH	β-OH
1b	H	H	H
1c	H	β-OH	H
1d	OH	H	α-OH

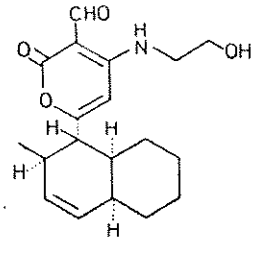


	R¹	R²
2a	OH	H
2b	H	H
2c	OH	OH

C



1 R=CHO
2 R=CH_2OH



3

2.6.5. Controle genético da produção de toxina

A análise genética da produção de toxina por vários fungos patogênicos tem mostrado, ma maioria dos casos examinados, um loco único com alelos alternados que podem determinar se a toxina é produzida ou não (YODER, 1980). Isto é verdadeiro para *Cochliobolus heterostrophus* Drechsler [anamorph: *Helminthosporium maydis* Nisik. = *Bipolaris maydis* (Nisik.) Shoemaker = *Drechslera maydis* (Nisik.) Subram. and Jain], que produz T-toxina da família dos policetôis (LEACH & YODER, 1981) que causa alta virulência do fungo em direção ao milho (*Zea mays* L.) contendo citoplasma macho-estéril Texas (T) (YODER, 1980). Embora muitos locos possam estar envolvidos no controle de produção da toxina T, somente um, designado como *tox 1* tem sido geneticamente definido. Em nenhum caso, incluindo aquele de *C. heterostrophus*, foi examinado o locus que controla a produção de toxina para determinar-se se o alelo que codifica a síntese da toxina é dominante ou recessivo. Esta deficiência é devida ao fato que os fungos em questão são haplóides nos seus estádios negativos.

Heterocariotos de *Cochliobolus heterostrophus* foram considerados ter aproximadamente o número igual de núcleos, possuindo tanto o alelo *tox* 1^+ para a presença de T-toxina ou o alelo *tox* 1^- para a ausência de T-toxina nos filtrados de cultura. Os heterocariotos cresceram em um meio líquido conhecido por manter a produção da toxina-T, os filtrados de cultura resultantes foram ensaiados para atividade de T-toxina usando 2 bioensaios diferentes: inibição do crescimento da radícula e a fixação do CO_2 no escuro. Ambos os procedimentos de bioensaios detectaram a presença da T-toxina nos filtrados de cultura dos heterocariotos *tox* 1^+/*tox* 1^-, os níveis de atividade foram ligeiramente menores do que aqueles encontrados nos filtrados dos heterocariotos *tox* 1^+/*tox* 1^-. Desde que estes heterocariotos são conhecidos por funcionar como diplóides, a interpretação mais simples dos resultados é aquela em que o alelo *tox* 1^+, que determina tanto alta virulência como a produção da toxina-T, é tanto dominante como semi-dominante (LEACH et al., 1982).

Os estudos genéticos da produção de toxina foram anali

sados em profundidade no trabalho de revisão feito for SCHEFFER (1976). Nesta revisão, o autor se fixou principalmente em quatro casos de toxina específica: HV, HC, PC e AK (ver TABELA 2).

O papel chave para a toxina HV como um determinante essencial da patogenicidade é evidente dos dados genéticos, tanto do hospedeiro como do patógeno. Todos os genótipos de aveia que foram suscetíveis ao fungo eram sensíveis à toxina. Todas as espécies vegetais e genótipos de aveia que eram resistentes ao fungo, eram altamente tolerantes à toxina. Genótipos de aveia que foram intermediários na resistência ao fungo, foram intermediários n a sensibilidade à toxina. Não foram encontradas excessões em muitos testes. Suscetibilidade à doença e sensibilidade à toxina podem ser analisadas pelo cruzamento de hospedeiros resistentes e suscetíveis. Vários grupos de pesquisadores concordam que resistência ou suscetibilidade à *H. victoriae* em aveia é controlada por um único par de genes. O mesmo par de genes controla resistência e tolerância à toxina HV, como mostrado por muitos dados e observações. Suscetibilidade é dominante sobre tolerância e sobre intermediário; resistência é recessiva para o intermediário. Desta maneira, a faixa completa de reações, tanto para o fungo como para a toxina, é controlada por um único loco do gene (V_b), que parece ser composto de 2 ou mais alelos exibindo semi-dominância (LUKE et al., 1966).

Resistência e suscetibilidade à *H. carbonum* em milho , também está correlacionada com a tolerância e sensibilidade à toxina produzida pelo fungo *H. carbonum* (SCHEFFER et al., 1967) . Um gene dominante maior para a resistência (*Hm*) está localizado no cromossomo 1; suscetibilidade controlada neste loco é recessiva (*Hm*). O gene tem 2 alelos conhecidos (Hm_A e Hm_B), os quais dão níveis intermediários de resistência. Um gene menor (Hm_2) para resistência, está localizado no cromossomo 9; este gene dá um nível intermediário de resistência, o qual novamente é dominante sobre suscetibilidade (hm_2). Várias combinações destes genes e alelos podem resultar plantas que variam de resistência inequívoca através de vários níveis intermediários à suscetibilidade extrema. Conforme cada gene menor para resistência é adicionado ao genótipo, aumenta a tolerância ao fungo. Seleções comparáveis podem ocorrer na natureza, conforme as espécies vegetais se adaptam a novos patógenos do ambiente. Três genótipos (*hm/hm-hm2/hm2;*

Hm_A/Hm_A - *hm2/hm2; Hm/Hm2)* foram testados para sensibilidade à toxina HC; eles foram: suscetível, intermediário e resistente como prognosticado.

Suscetibilidade a *P. circinata* no grão de sorgo é controlada por um único gene dominante. Todos os cultivares testados que foram suscetíveis ao fungo *P. circinata* foram sensíveis à toxina PC, e todos os cultivares resistentes ao fungo foram insensíveis à toxina (SCHEFFER & PRINGLE, 1961; PRINGLE & SCHEFFER, 1964). A suscetibilidade e resistência à toxina PC e ao fungo foram controladas pelo mesmo loco do gene. Foi encontrado que os heterozigotos são intermediários na suscetibilidade ao fungo e na sensibilidade à toxina, e que os mutantes resistentes aparecem freqüentemente nas linhas suscetíveis de sorgo.

Dados recentes mostraram que o controle da resistência e suscetibilidade à *A. kikuchiana* e a respectiva toxina são controladas por um único par de genes na pera japonêsa (KOZAKI,1973 apud SCHEFFER; 1976). O mesmo acontece com *A. alternata* f. sp. *lycopersici* em relação ao tomate (GILCHRIST & KEEN, 1982).

Há dados genéticos nos patógenos que são pertinentes ao problema da toxina. Todos os isolados de *H. victoriae* e *H. carbonum* que produzem toxinas específicas ao hospedeiro foram patogênicos aos genótipos hospedeiros suscetíveis.

Os controles genéticos de resistência e suscetibilidade a *H. victoriae* e *H. carbonum* (que ataca o milho) são bem conhecidos. Em cada caso, a reação é controlada por um único par de alelos; resistência de *H. victoriae* é recessiva e de *H. carbonum* é dominante. A tolerância e sensibilidade de cada toxina é controlada pelo mesmo par de alelos que controla resistência e suscetibilidade ao fungo. Todos os genétipos que são suscetíveis a estes fungos são sensíveis às respectivas toxinas. Todas as plantas e genótipos que são resistentes ao fungo são tolerantes às respectivas toxinas. Genótipos que são intermediários em resistência são intermediários na sensibilidade às toxinas. Na aveia, a faixa de reação do fungo e sua toxina é controlada por um loco do gene (V_b), que tem dois ou mais alelos com semi-dominância, outros são intermediários (SCHEFFER, 1976).

SCHEFFER (1976) concluiu a revisão de toxinas específicas ao hospedeiro, declarando que dados fisiológicos, bioquímicos e anatômicos mostram que a toxina produzida pelo fungo é necessária para a patogenicidade e, que a habilidade do fungo de produzir toxinas é controlada pelos mesmos genes que controlam a patogenicidade. Estudos genéticos com as plantas hospedeiras e fungos patogênicos produtores de toxina, reforçam o conceito de que toxinas específicas ao hospedeiro são determinantes essenciais de patogenicidade, seletividade ao hospedeiro e desenvolvimento da doença.

SCHEFFER, junto com PRINGLE (PRINGLE & SCHEFFER, 1964) lançou a hipótese de que longa permanência é compatível com o controle gene-gene: células suscetíveis tem receptores ou sítios sensíveis às toxinas; tais sítios não ocorreriam em células resistentes ou, então, nestas os sítios teriam menor afinidade pela toxinas. Após 20 anos, o mesmo autor, acredita que a hipótese ainda é válida, embora não existam provas conclusivas (SCHEFFER & LIVINGSTONE, 1984).

2.6.6. Uso potencial de toxinas

Foram feitos testes de seleção de resistência, usando toxinas, com populações de aveia (em relação a H. victoriae); sorgo açucareiro (em relação a Periconia circinata) e cana-de-açúcar (em relação a H. sacchari, segundo SCHEFFER (1976).

Este mesmo autor, recentemente (1984) afirma categoricamente que o mais amplo interesse no estudo de toxinas se situa na seleção de linhas resistentes com cultura de tecidos e afirma expressamente que "os melhores modelos disponíveis de manipulação genética para se alcançar resistência à doença parecem ser aqueles que envolvem toxinas seletivas." Para SCHEFFER & LIVINGSTON (1984) os modelos com toxinas fornecem:

1. moléculas quimicamente caracterizadas;
2. os produtos finais dos genes para habilidade indutora de doença;
3. genes simples na planta hospedeira que controlam resistência e susceptibilidade a estes fungos, e;
4. os mesmos genes simples que controlam resistência e susceptibilidade aos fungos controlam resistência e susceptibilidade às respectivas toxinas.

SCHEFFER & LIVINGSTON (1984) afirmam que os mesmos genes que controlam a produção de toxina, controlam também a habilidade de causar a doença e que as células resistentes podem ter falta de sítios receptores de toxinas.

III. MATERIAL VEGETAL

1. TOMATEIRO (*L. esculentum*)

A. Tomate de banco de germoplasma (acessões)

B. Tomate comercial

A. Tomate de banco de germoplasma

As acessões de *Lycopersicon esculentum* Mill. P.I. 367977 e P.I. 367991, de origem brasileira, foram caracterizadas geneticamente in vivo, tendo a herança destas linhagens P.I. 367977 (sensível a Al) e P.I. 367991 (tolerante a Al) sido efetuada detalhadamente por RAMOS (1981). Esses genótipos representam extremos de tolerância ao Al numa discriminação de 18 cultivares, tanto em solo como em solução nutritiva (FOY et al.,1973).

B. Tomate Comercial

Estudou-se predominantemente tomateiro com fins industriais (processamento). Em certos experimentos, cultivares para consumo in natura (mesa) foram também utilizados.

CULTIVO DE TOMATE PARA A INDÚSTRIA

Devido ao desenvolvimento da indústria de alimentos,o cultivo de tomate rasteiro para fins industriais tem aumentado consideravelmente, a ponto de, em muitas regiões,a sua importân

cia suplantar a do cultivo do tomate para consumo direto. Com respeito às doenças, as variedades rasteiras apresentam algumas características diversas e que mercem ser ressaltadas. Assim , são encontradas variedades altamente produtivas e que apresentam uma resistência maior às doenças. Podem ser encontradas variedades comerciais como VFN e que são resistentes à murcha de *Verticillium* (V), *Fusarium* (F) e nematóides (N), podendo ainda apresentar um grau variável de resistência a *Phytophthora*, *Septoria* e *Stemphilium* e alguma suscetibilidade ao cancro bacteriano e a pinta-preta, *Alternaria solani* (TOKESHI & CARVALHO,1980).

Como tomate de indústria, utilizou-se como material vegetal o cultivar comercial Petomech. Este cultivar comercial corresponde ao cultivar desenvolvido pela Universidade da Califor nia, sob a sigla de UC82B (SÖNDHAL, comunicação Pessoal).

Cultivar Petomech desenvolvido na Califórnia pela Petoseed Co. Inc., tem sido considerado um dos cultivares mais promissores em testes feitos na Austrália (SUMEGHY et al.,1978a). A planta é pequena, com crescimento determinado, com folhagem compacta, boa habilidade de estabelecimento de frutos sob uma larga faixa de condições de temperatura, resistência a ruptura da pele (SUMEGHY, 1979). Outras características: excelente abscisão; é precoce para maturação dos frutos; os frutos são redondos e uniformes e o uso comercial é para extrato (SUMEGHY et al., 1978b). Petomech é um cultivar ótimo para industrialização, que apresenta alto rendimento e resistência aos fungos *Verticilium* e *Fusarium* (ANDERLINI, 1982). A murcha de *Verticilium* é a infecção causada pelo fungo que penetra nas raízes e impede que a umidade seja levada até a planta, bloqueando os canais de passagem de água (FLAWN, 1981).

Os lotes 5.319.004 e 5.319.006 de "Petomech" utiliza

dos em nosso trabalho, foram fornecidos por Petoseed Brasileira Ltda., são de origem chilena, assim como o híbrido "Joaquim" , com resistência a *Pseudomonas* (mancha bacteriana), doença que pode adquirir importância no norte do país, assim como acontece em outros países latino-americanos de clima quente,na região equatorial (MARANCA, 1981). As sementes de "Petomech" e "Joaquim" foram armazenadas à baixa temperatura (cerca de 4°C).

TOMATE DE MESA

Foram utilizados apenas dois cultivares: Ângela e Marglobe.

"Ângela" é um híbrido que apresenta como caráter fundamental a resistência ao vírus Y (risca do tomateiro), com notável precocidade, crescimento indeterminado e frutos de cor brilhante, boa firmeza, apto para consumo fresco, raramente atingido por podridão apical (MARANCA, 1981).

Marglobe é um cultivar bastante antigo, utilizado como padrão de análises genéticas para resistência a nematóides (MEDINA FILHO, comunicação pessoal). É de crescimento determinado, mas de grande desenvolvimento e abundante folhagem,resistente a *Fusarium* e não é um híbrido (MARANCA, 1981).

O material vegetal dos cultivares utilizados para tomate de mesa foram fornecidos pela Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas. As sementes, neste caso, foram armazenadas em câmara seca fria (umidade relativa 60% e temperatura de 12°C).

Nos experimentos, o material vegetal obtido de sementes (acessões ou cultivar) será designado conforme a sigla

mostrada na Tabela 5. As plantas obtidas de sementes são desig nadas S (HOMEDAN, 1982).

Após a regeneração de novas plantas pela técnica de cultura de tecidos (designadas tecnicamente como "plantlete") estas foram aclimatadas progressivamente em condições de estufa e posteriormente no campo , florescendo e frutificando normal mente, produzindo sementes. As plantas regeneradas diretamente de cultura de tecidos são a geração R_0 e as sementes obtidas des tas plantas por auto-fertilização são a geração R_1 (CHALEFF,1981).

"Plantlete" é um termo não constante do vernáculo,mas que é empregado em toda literatura de cultivo em cultura para distinguir as plantas obtidas através de técnicas de cultivo in vitro.

Os explantes iniciais de plantas S e R foram obtidas de duas fontes: plantas adultas cultivadas em estufa e plântu las estéreis, ou seja, crescidas assepticamente a partir de se mentes esterilizadas superficialmente (explante, termo que não ocorre no vernáculo se refere a qualquer orgão, tecido, que se rá testado como ponto inicial no cultivo in vitro).

TABELA 5 - Siglas do material vegetal (*L. esculentum*) utilizadas nos experimentos. Em todo o trabalho, o material vegetal será designado conforme a convenção abaixo. Plantas S (obtidas de sementes).

ACESSÕES CULTIVAR	SIGLA DO MATERIAL VEGETAL (S)
Acessões	
P.I. 367977	1
P.I. 367991	2
Tomate de Indústria	
"Petomech" 5319004 original	A
"Petomech" 5319006 original	B
"Petomech" 5319004 multiplicado	C
"Petomech" 5319006 multiplicado	D
"Joaquim" original	E
Tomate de Mesa	
"Ângela"	F
"Marglobe"	G

2. PATÓGENO

Origem do material para o isolamento de *Alternaria solani*

As folhas e hastes com lesões típicas foram coletadas de cinco localidades, a saber:

Localidade	Sigla
1 - Secção de Microbiologia Fitotécnica, Instituto Agronômico de Campinas	A.F.
2 - Fazenda Santa Eliza, Instituto Agronômico de Campinas	S.E.
3 - Município de Jaguariúna	A.J.
4 - Fazenda do Instituto Agronômico de Campinas	IAC
5 - Município de Mococa	Mococa

O isolado (colônias puras de *A. solani*) desse material foi utilizado para obtenção de filtrados estéreis de cultura de fungo e conseqüente utilização *in vitro*.

IV. MÉTODOS

Toda a vidraria, água destilada e desmineralizada utilizadas em todos os experimentos foram esterizadas numa autoclave hospitalar marca Luferco à temperatura de 120ºC, com pressão de uma atmosfera pelo período de 20 minutos.

As operações em condições assépticas sempre foram feitas em câmara de fluxo laminar marca Veco, modelo HLFS-12.

1. Estabelecimento de metodologia para obtenção de plantas de tomate a partir de cultura de tecidos

1.1. Origem da fonte de explante

1.1.1. Plantas cultivadas em estufa

O primeiro resultado positivo de regeneração de tomateiro foi obtido por PADMANABANN et al (1974) que utilizaram como fonte de explante de plantas crescidas em estufa (na verdade, as folhas mais jovens perto do ápice das plantas). Desde então, folhas têm sido a fonte de explante praticamente mais utilizada.

O material vegetal original de tomate de indústria, assim como o do tomate de mesa foi cultivado em estufa como fonte de explante (no caso, utilizaram-se apenas folhas). As plantas foram submetidas a desbrotamento (no caso de tomate de mesa) e amarrio, tendo sido constantemente vigiadas contra a instalação de pragas e pulverização com Manzanate-D foi feita sempre que necessária, para evitar a proliferação das pragas. Cultivaram-se nas mesmas condições e com os mesmos cuidados plantas regeneradas obtidas *in vitro* tanto de tomate de mesa, como de indústria.

O cultivo das plantas de tomate em condições de estufa acarreta, no entanto, muitas possibilidades de acúmulo de agentes contaminantes como poeira, esporos de fungos e bactérias, acúmulo - este favorecido pela presença maciça de pelos nas folhas desta espécie.

Em experimento preliminar utilizaram - se oito técnicas, combinando-se agente esterilizante, período de esterilização, número de esterilizações numa tentativa de se diminuir a contaminação. Obteve-se, porém, alta contaminação e baixa viabilidade - dos explantes de folha adulta no meio definitivo, observadas independentemente do tipo e agente esterilizante empregados, o que nos levou a procurar outro caminho para sobrepujar o problema. A solução tentada foi a pré-incubação das folhas trazidas da estufa lavadas em água corrente, ou seja, serem mantidas em câmara úmida por - um período que variou de 4 a 15 horas.

A idéia seria de que em condição úmida haveria um maior favorecimento de germinação dos esporos de fungos e estes, em germinação seriam mais efetivamente atacados pelo agente oxidante.

A técnica de pré-incubação consiste em colocar as folhas (preferiu-se folhas mais jovens em bom estado, sem apresentarem ferimentos causados por insetos) sobre uma tela de polietileno, tela esta colocada sobre caixa de PVC com água no fundo. Este conjunto é coberto com placa de vidro para conservar-se a umidade e é mantido em luz.

Após a pré-incubação, os folíolos foram esterilizados superficialmente utilizando-se solução de hipoclorito de sódio(NaOCl) comercial (marca QBoa) diluído a 20% com água estéril juntamente

com 3 gotas de TWEEN (20%) por um período de 30 minutos em agitação suave. A concentração de NaOCl em solução aquosa comercial é de 5,21. Após a realização do tratamento de esterilização superficial, os folíolos foram lavados 5 vezes com água estéril. Ainda em condições assépticas, dos folíolos esterilizados foram excisados quadrados do limbo foliar (sem presença dos bordos) de cerca de 6x6mm com auxílio de bisturi e pinças esterilizadas (flambadas). Estes quadrados foram, então, individualmente transferidos para placas de Petri com meio sólido, sem presença de fitoreguladores (ver item nº 1.3.1- Meios de Cultura). Esta incubação foi feita no escuro. Após um período de 5 dias, foi verificada a contaminação (presença de fungo e/ou bactéria) e a viabilidade dos quadrados. Os quadrados viáveis e não contaminados foram transferidos individualmente, em condições assépticas, para frascos quadrados, ("French bottle Square") contendo 10 ml do meio sólido definitivo, suplementado de reguladores de crescimento, o meio primário padrão que convencionamos como To-M_3 .

As etapas de esterilização das folhas adultas (com e sem pré-incubação); obtenção de explantes; inoculação em meio de placa e inoculação em meio definitivo são mostradas esquematicamente (Figura 4).

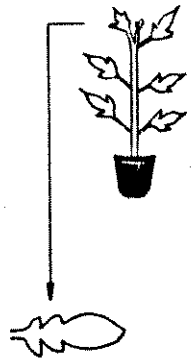
1.1.2. Explantes obtidos a partir de plântulas estéreis

O problema de contaminação dos explantes provenientes de plantas crescidas em condições não controladas de assepsia, nos levou a procura de outra origem da fonte de explante, na qual houvesse menor incidência de agentes de contaminação . Para tanto, utilizou-se explantes (cotilédone, hipocótilo, folha definitiva, caule e submeristema) provenientes de plântulas estéreis.

FIGURA 4 - Esquema de obtenção de explantes viáveis, não contaminados, obtidos a partir de plantas cultivadas, em estufa. Folíolos com ou sem pré-incubação (12-16 h. em câmara úmida) antes da esterilização superficial propriamente dita.

PLANTAS CULTIVADAS EM ESTUFA

ETAPA 1
COLETA DE MATERIAL



LAVAGEM DOS FOLÍOLOS
ÁGUA CORRENTE COM DETERGENTE

SEM PRÉ-INCUBAÇÃO

COM PRÉ-INCUBAÇÃO



INCUBAÇÃO EM CÂMARA
ÚMIDA POR 12-16 h

ETAPA 2
ESTERILIZAÇÃO
DO MATERIAL

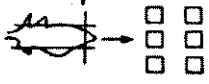


FOLÍOLOS ESTERILIZADOS

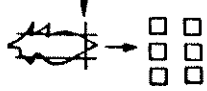


FOLÍOLOS ESTERILIZADOS

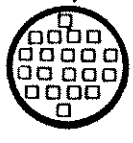
ETAPA 3
OBTENÇÃO
DO EXPLANTE

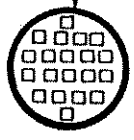


EXCISÃO DOS BORDOS DOS
FOLÍOLOS E CORTE DO
LIMBO EM QUADRADOS
(EXPLANTES)



EXCISÃO DOS BORDOS DOS
FOLÍOLOS E CORTE DO
LIMBO EM QUADRADOS
(EXPLANTES)





ETAPA 4
INOCULAÇÃO
DOS EXPLANTES
EM MEIO DE
CULTURA

EXPLANTES COLOCADOS
EM MEIO DE PLACA (ESCURO)



EXPLANTES COLOCADOS
EM MEIO DE PLACA (ESCURO)



CÂMARA ASSÉPTICA

EXPLANTE VIÁVEL, NÃO CONTAMINADO, COLOCADO EM MEIO PADRÃO OU MEIO DE PRÉ-SELEÇÃO.

1.1.2.1. Pré-tratamento e esterilização de sementes

Para eliminação do cancro bacteriano, devido a *Corynebacterium michiganense** e, parece, também se apresentar in vitro, as sementes de tomateiro foram submetidas a pré-tratamentos a seguir:

1. ácido acético 0,8% durante 24 horas e a seguir, esterilização superficial com NaOCl 25% por um período de 30 minutos (CAMPACCI, 1982);

2. banho em água quente (53°C) durante 30 minutos, seguido de esterilização superficial com NaOCl 25% por um período de 30 minutos (D.F. COURSEN, comunicação pessoal);

3. esterilização superficial com NaOCl 10% por um período de 10 minutos, seguido de banho em água quente (53°C) durante 30 minutos e secagem sob fluxo laminar contínuo por 24 horas, tudo em condições assépticas. Após o período de 24 horas, as sementes foram inoculadas sem passarem por lavagem (T.H.BARKSDALE, comunicação pessoal);

Após o período de 30 minutos em NaOCl 25% (tratamentos 1 e 2) as sementes foram, com auxílio de um coador de chá de polietileno (que permaneceu cerca de 24 horas em etanol absoluto) lavadas repetidamente de 3 a 5 vezes.

1.1.2.2. Incubação das sementes esterilizadas

---

* [pv. Michiganense (Smith) Jensen. (MARANCA, 1981), cuja disseminação a longa distância é feita pela semente, onde a bacteria é capaz de sobreviver por 2 anos e meio (TOKESHI & CARVALHO, 1980)].

Após passagem pelos tratamentos descritos no item anterior, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro previamente esterilizados com capacidade total de 600 ml, contendo meio de cultura descrito no ítem 1.3.4. As etapas de esterilizações superficial (com e sem pré-tratamento) de inoculação das sementes esterilizadas são mostradas esquematicamente (Figura 5).

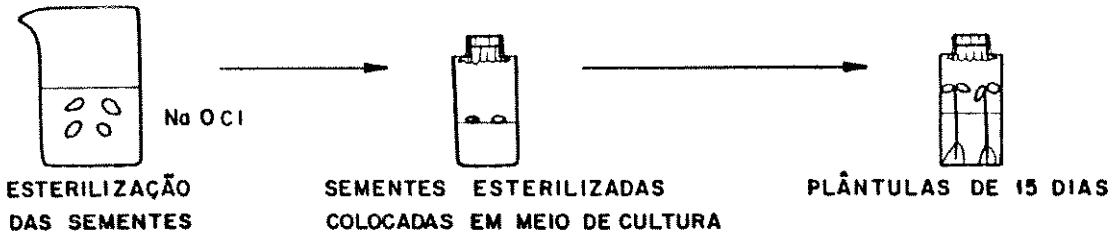
1.2. Orgãos utilizados como explante

Das plantas cultivadas em estufa, utilizou-se apenas folhas como fonte de explante (ver item 1.1.1).

Das plântulas estéreis foram utilizadas como orgão fornecedores de explantes além das folhas cotiledonares, o hipocótilo (TAL, et al. 1978) e a região apical (correspondente ao submeristema, ou seja, o meristema e as regiões circunvizinhas). Estes explantes foram obtidos assepticamente, excisando-os da plântula estéril. O isolamento dos explantes foi efetuado após cerca de 15 dias de protrusão da radícula. Estudos preliminares feitas com plântulas estéreis de 6, 15, 21 e 33 dias, utilizando 2 tipos de explantes: cotilédone e hipocótilo, mostraram que ocorreu melhor regenerações quando se utilizou plântulas de 15 dias de idade, independente do explante utilizado. Foi utilizado, então, no trabalho plântulas de 15 dias de idade. É interessante lembrar que, HOMEDAN (1982) trabalhando com multiplicações vegetativa in vitro do tomateiro utilizou plântulas estéreis de 14 dias de idade.

OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS ESTÉREIS

a) SEM PRÉ-TRATAMENTO



b) COM PRÉ-TRATAMENTO

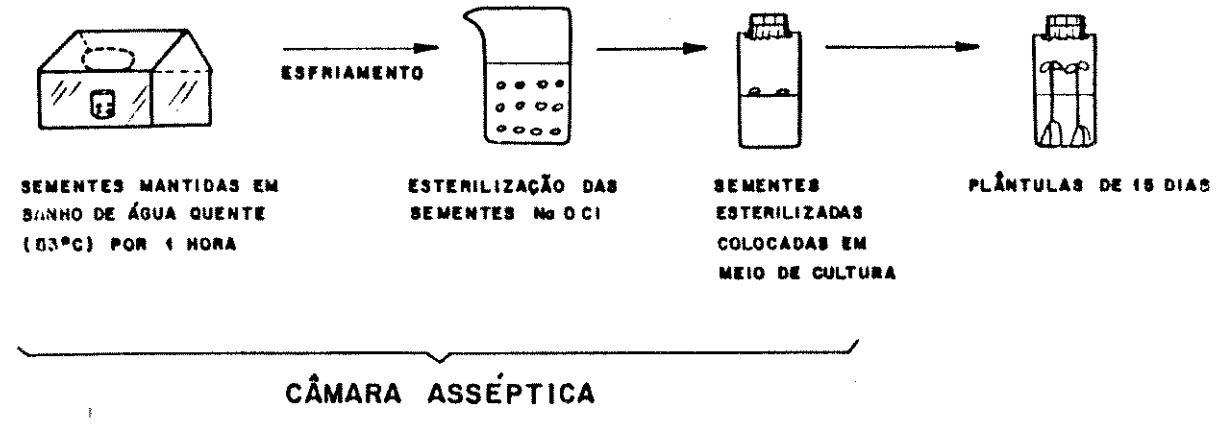


FIGURA 5 - Esquema de obtenção de plântulas estéreis como fonte de explantes a partir de sementes esterilizadas superficialmente. Sementes com ou sem pré-tratamento (banho quente a 53°C) anterior à esterilização propriamente dita.

1.2.1. Cotilédone

Para obtenção do explante de cotilédone,este foi inicialmente destacado da plântula estéril. Ainda em condições assépticas teve seu ápice distal cortado. Desta maneira, o cotilédone teve ambas as extremidades seccionadas para aumentar a região de cortes , região esta favorável a proliferação celular. Cada cotilédone foi inoculado individualmente ou em conjunto, conforme o caso.

1.2.2. Hipocótilo

Para o obtenção do explante de hipocótilo, este após ser removido da região da inserção do cotilédones, foi dividido equitativamente em segmentos de cerca de 1 cm. Estes segmentos foram inoculados individualmente ou em conjunto, conforme o caso.

1.2.3. Submeristema

A região apical da plântula estéril, após a obtenção dos explantes de cotilédone e hipocótilo, foi usada também como explante. Isto para que, após o desenvolvimento normal do ápice, obtenha-se uma planta igualmente estéril com várias folhas definitivas.Esta planta, assim obtida, seria a fonte de explantes e de submeristemas que continuariam o ciclo. Assim, ter-se-á sempre material vegetal estéril disponível.

A região apical excisada (submeristema) após o desenvolvimento normal do ápice em meio de cultura secundária (ítem 1.3.4.)resulta em uma planta estéril.

As plantas originadas in vitro a partir de submeristemas foram utilizadas: como fonte de explante (folha definitiva e caules estéreis crescidos em condições assépticas) e para aumentar a disponibilidade de material vegetal in vitro sem se necessitar de grande área de cultivo, nem estufa, obtendo-se além disso material já estéril dispensando-se, pois, o processo de esterilização. A obtenção de planta estéril in vitro também é mostrada esquematicamente (Figura 6).

Os explantes tanto de folhas de estufa como de plântulas estéreis foram utilizadas para:

a) formação de calos em meio sólido;

b) regeneração de plantas em meio sólido, expressando a variabilidade natural da espécie (variação somaclonal);

c) testes de resistência e suscetibilidade aos patógenos em estudo;

d) obtenção de novos clones em presença do filtrado de cultura do patógeno (pré-seleção in vitro);

e) regeneração de plantas em presença do filtrado de cultura do fungo, plantas estas que seriam potencialmente resistentes a estas toxinas;

f) testes in vivo nas próprias plantas e nas respectivas progênies para elucidar a possível resistência adquirida através da pré-seleção in vitro.

FIGURA 6

PLÂNTULAS ESTÉREIS

OBTENÇÃO DE EXPLANTES

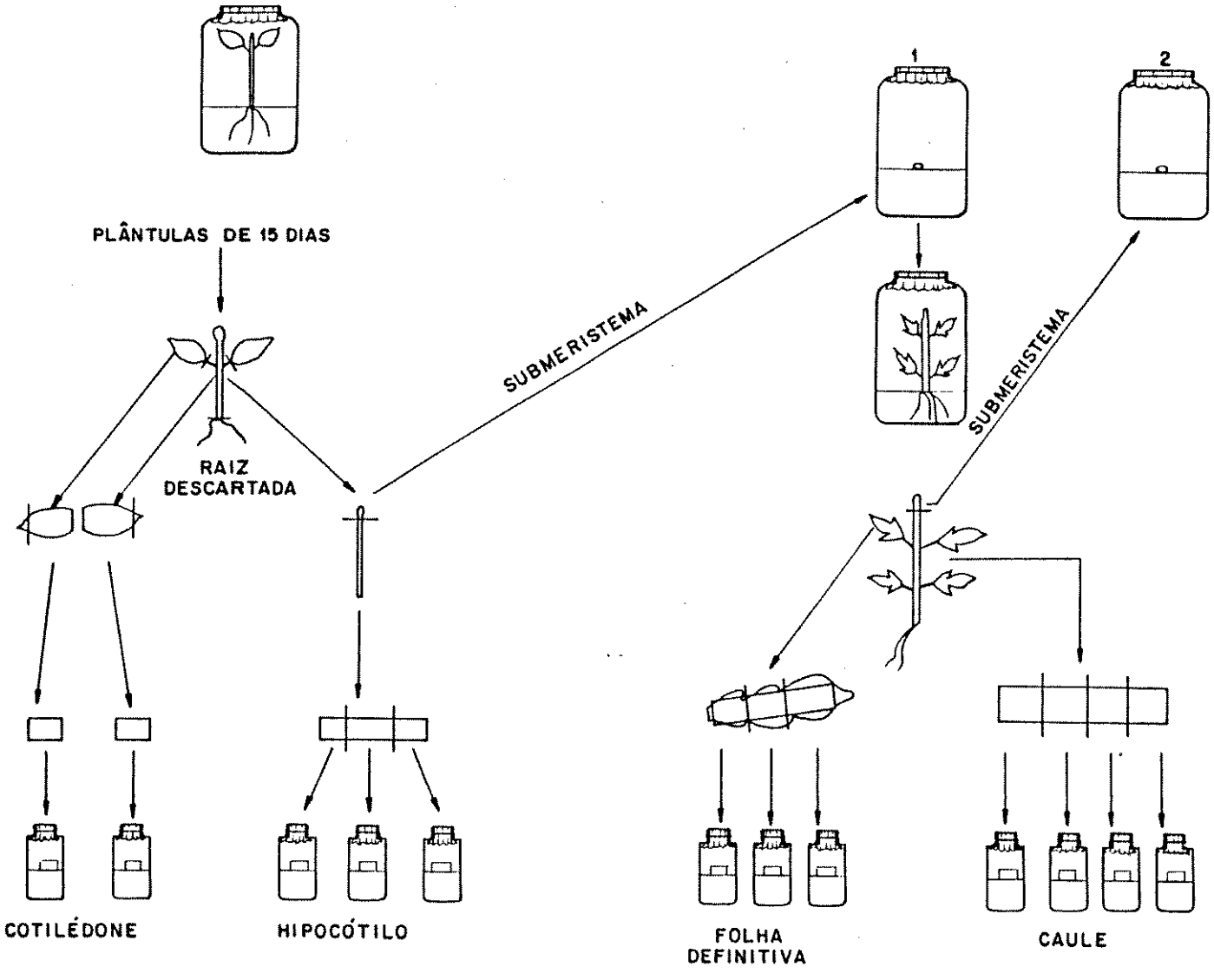


FIGURA 6 - Esquema de disponibilidade de material vegetal estéril cultivado *in vitro*. Plantas originadas *in vitro* a partir de submeristemas.

1.3. Cultivo *in vitro*

1.3.1. Meio de Placa

Para se testar a eficiência da esterilização superficial, observou-se a contaminação, tanto por fungo como por bactéria, das folhas de plantas adultas, inoculadas previamente em placa de Petri de 9,0 mm de diâmetro contendo metade da concentração do meio MS, acrescido de 20 g/l de sacarose, 8 g/l de ágar e 200 mg/l do fungicida BENOMIL. Experimentos preliminares demonstraram que para o BENOMIL a concentração de 200 mg/l apresentou melhores resultados.

O pH foi ajustado para 5,5 com KOH ou HCl, conforme o caso. O meio foi esterilizado em autoclave e distribuído em câmara asséptica.

Após a inoculação dos explantes, as placas foram mantidas em escuro contínuo, à temperatura ambiente, durante aproximadamente cinco dias. Passado este tempo, os explantes viáveis foram transferidos para meio de cultura primária.

1.3.2. Meios citados para cultivo de submeristemas

1.3.2.1. Meios citados na literatura

Ápices meristemáticos foram cultivados em diferentes meios de cultura. Os meios de cultura testados citados na literatura, foram os seguintes:

a) citados para outras espécies:

I. para desenvolvimento de meristema de alho: sais de MS, vitaminas de MS na metade da concentração, 225 µM inositol ; 0,1% caseina; 3% sacarose; AIA (10 µM); 2,4-D (5 µM); cinetina a 10 µM; 0,8% ágar e pH = 5,5 (NOVÁK, 1977).

II. para desenvolvimento de meristema de batata: sais de MOREL & MILLER (1964); vitaminas de MS na metade da concentração; 225 µM inositol; ANA (5 µM); GA_3 (0,5 µM); 2% sacarose;0,8% ágar e pH = 5,5 (MOREL & MILLER, 1964).

III. para desenvolvimento de meristema de mandioca; sais de MS; vitaminas de MS na metade da concentração; 225 µM de inositol; 3% sacarose; 6-BA (0,5 µM); ANA (1,0 µM); GA_3 (0,5 µM); 0,8% ágar e pH = 5,5 (KARTHA & GAMBORG, 1975).

IV. para desenvolvimento de meristema de ervilha: sais de MS ; 550 µM de inositol; 2% de sacarose; 6-BA (0,5 µM); ágar e pH = 5,5 (KARTHA et al., 1979).

b) citados para o tomate:

V. para o cultivar tolerante a alumínio VFNT Cherry: sais de MS; inositol 100 mg/l, ácido nicotínico 5 mg/l, tiamina 5 mg/l; piridoxina 0,5 mg/l; 3% sacarose; ANA (10,0 µM);6-BA (5,0 µM); 0,8% ágar e pH = 6,0 (MEREDITH, 1978a,b). Designaremos este meio de To-A.

VI. para o cultivar sensível ao alumínio Marglobe: sais de MEREDITH (1978a,b), inositol 1000 mg/l; ácido nicotínico 5 mg/l; tiamina 5 mg/l; piridoxina 0,5 mg/l; 3% sacarose , AIA (25 M); 2,4-D (M); cinetina (1,5 M); 0,8% ágar e pH = 6,0 (MEREDITH, 1978a,b). Designaremos este meio TO-B.

VI . para o cultivar Starfire: sais de MS, inositol 100 mg/l ; ácido nicotínico 1 mg/l; tiamina 10 mg/l; piridoxina 1 mg/l; 3% sacarose; AIA (0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µM); 6-BA (10 µM); 0,8% ágar e pH = 5,5 (KARTHA et al. , 1977). Designaremos este meio de To-D.

1.3.2.2. Meio básico acrescido de combinação de fitorreguladores em experimento dialélico tipo Lattice 5 x 5

Observou-se o crescimento dos submeristemas em combinações dialélicas na interação de AIA e 6-BA, utilizando-se para ambos os reguladores as concentrações de: 0,0; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,50 µM. Em cada combinação testada utilizou-se 10 replicatas por tratamento.

Os submeristemas foram mantidos em condições de luz natural ou então, em luz artificial à temperatura controlada de $25 \pm 2^{o}C$. Ambos os cultivares foram testados em relação aos meios mencionados.

1.3.3. Cultura primária (regeneração)

A nomenculatura adotada para as diversas fases da cultura

de tecido foi a de MURASHIGE (1974).

1.3.3.1. Meios citados na literatura

Dos trabalhos anteriores feitos com tomate ou espécies relacionadas (WHITE, 1943); NORTON & BELL (1954); GREESHOFF & DOY (1972); SHARP et al. (1972); de LANGUE & de BRUYSNE (1974); PADMA NABHAN et al. (1974); BEHKI & LESLEY (1976); KARTHA et al. (1976); de WIT (1976); TAL et al. (1977); KARTHA et al. (1977); VNUCHKOVA (1977); ZAPATA et al. (1977); DRUVA et al. (1978); OKHI et al., (1978); HERMAN & HAAS (1978); MEREDITH (1978 a,b); TAL et al. , (1978); MEREDITH (1979); BEHKI & LESLEY (1980); FRANKENBERGER et al. (1981 a,b); HOMEDAN (1982); ILLG & SIQUEIRA (1984), a composição salina (macro e micronutrientes) do meio mais utilizado foi a de MURASHIGE & SKOOG (1962).

No presente trabalho, a composição salina do meio se baseou neste meio, composição salina esta que designaremos de composição salina MS. Os componentes orgânicos foram os seguintes: mio - inositol (550 µM), tiamina (30 µM), ácido nicotínico (30 µM), piridoxina (15 µM), sacarose 30 g/l e ágar 8 g/l. Estes componentes e as concentrações utilizadas também se basearam em MURASHIGE & SKOOG (1962) e esta composição orgânica designaremos de composição orgânica MS. Este meio de cultura (composição salina MS + composição orgânica MS) foi padrão do nosso trabalho e passaremos a designá-lo de meio MS. A este meio foram adicionados fitorreguladores de crescimen

to: auxinas como ácido indol-acético (AIA), ácido naftaleno-acético (ANA) e ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D); citocininas como 6-furfuril-adenina (cinetina), 6-benzil-adenina (6-BA). O pH do meio padrão foi ajustado para 5,5 com KOH e HCl após a adição de todos os componentes, antes da autoclavagem (1 atmosfera, 120°C, durante 20 minutos). Foram igualmente testados em determinados experimentos, outros meios, cuja composição será dada através da referência bibliográfica. Os fitorreguladores foram adicionados ao meio antes da autoclavagem, mesmo o AIA. YAMAKAWA et al.(1979) verificaram através de métodos físicos e bioensaios que este hormônio vegetal é estável à autoclavagem, não perdendo atividade promotora de crescimento em bioensaio específico.

1.3.3.2. Interações de fitorreguladores na morfogênese

O objetivo deste ítem é o de obter-se calos com bons índices de crescimento, textura adequada e regeneração. Para tanto, faz-se o estudo de interações dialélicas com delineamento de Quadrados Reticulados (Lattice 5 x 5) com fitorreguladores.

As fontes de explantes utilizadas (cotilédone e folha definitiva) foram obtidas de plântulas estéreis. Os cotilédones foram obtidos assepticamente excisando-os diretamente da plântula estéril. A folha definitiva foi obtida com o desenvolvimento da parte apical destas plântulas in vitro, em ausência de reguladores de crescimento.

Os segmentos foliares foram cultivados no meio de sais

inorgânicos de MURASHIGE & SKOOG, suplementado com tiamina (15 µM), piridoxina, 7,5 µM), ácido nicotínico 6,5 µM), inositol (550 µM), sacarose (30 g/l) e ágar (8 g/l) com diferentes combinações dialélicas de citocininas e auxinas. As interações estudadas foram as seguintes:

dialélico I
6-BA = 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 µM/AIA = 10,0 - 25,0 - 50,0 - 75,0 - 100,0 µM
dialélico II
C = 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 µM/AIA = 10,0 - 25,0 - 50,0 - 75,0 - 100,0 µM
dialélico III
6-BA = 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 µM/ANA = 2,5 - 5,0 - 10,0 - 25,0 - 50,0 µM
dialélico IV
C = 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 µM/ANA = 2,5 - 5,0 - 10,0 - 25,0 - 50,0 µM
dialélico V
6-BA = 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0 µM/2,4-D = 0,25 - 0,50 - 1,00 - 2,50 - 5,00 µM

Para cada interação testada foram feitas 10 repetições, utilizando-se frascos quadrados com 10 ml de meio sólido.

A avaliação foi feita após 50 dias de permanência no escuro contínuo, através de índices de crescimento. Foram feitas também anotações da textura de calos e presença de raízes.

1.3.3.3. Cultura primária padrão (To-M_3)

Para a indução de calos a partir de explantes de folhas de estufa e plântulas estéreis, utilizou-se o meio MS, no qual foram adicionados os fitorreguladores (AIA 25 µM e 6-BA 10µM) ainda 30 g/l de sacarose e 8 g/l de ágar, sendo o pH ajustado para 5,5 de KOH ou HCL. O meio foi esterilizado em autoclave, como já descrito anteriormente. Esta é a constituição do meio primário padrão, que convencionamos como To-M_3.

1.3.3.4. Condições de Cultivo

Após a inoculação dos explantes no meio descrito estes foram mantidos em escuro contínuo durante aproximadamente 15 dias, quando há o início da formação de calos. A manutenção dos calos no escuro foi feita para inibir oxidação de fenóis (KUT et al., 1984). A seguir, alguns explantes foram transferidos para fotoperíodo, outros para estufa.

Com fotoperíodo a temperatura é constante de 25 $\pm$ 2°C, com 16 horas de luz. A luz artificial foi obtida com uma mistura de lâmpadas incandescentes e fluorescentes, a intensidade luminosa nas diversas prateleiras, a partir da fonte de luz, foi:

1ª prateleira - 800 a 2100 $\mu W.cm^{-2}$

2ª prateleira - 700 a 460 $\mu W.cm^{-2}$

3ª prateleira - 620 a 440 $\mu W.cm^{-2}$

4ª prateleira - 130 a 160 $\mu W.cm^{-2}$

5ª prateleira - 60 a 80 $\mu W.cm^{-2}$

6ª prateleira - 30 a 60 $\mu W.cm^{-2}$

7ª prateleira - 28 a 55 $\mu W.cm^{-2}$

8ª prateleira - 25 a 40 $\mu W.cm^{-2}$

9ª prateleira - 16 a 85 $\mu W.cm^{-2}$

10ª prateleira - 35 a 48 $\mu W.cm^{-2}$

Para a estufa, as temperaturas máximas e mínimas estão demonstradas nas Figs. 7 e 8, enquanto que as horas de insolação estão demonstradas na Fig. 9. Também aqui foi medida a intensidade de luz que alcança as diversas prateleiras. Esta varia de 3400 $\mu W.cm^{-2}$ na prateleira mais superior a 1000.$\mu W\ cm^{-2}$ na prateleira mais inferior. Estas intensidades foram medidas com radiômetro VDT-40x da United Detector Tecnology.



FIGURA 7. Registro das temperaturas máximas em Campinas e dentro de estufa durante o mês de julho de 1982.

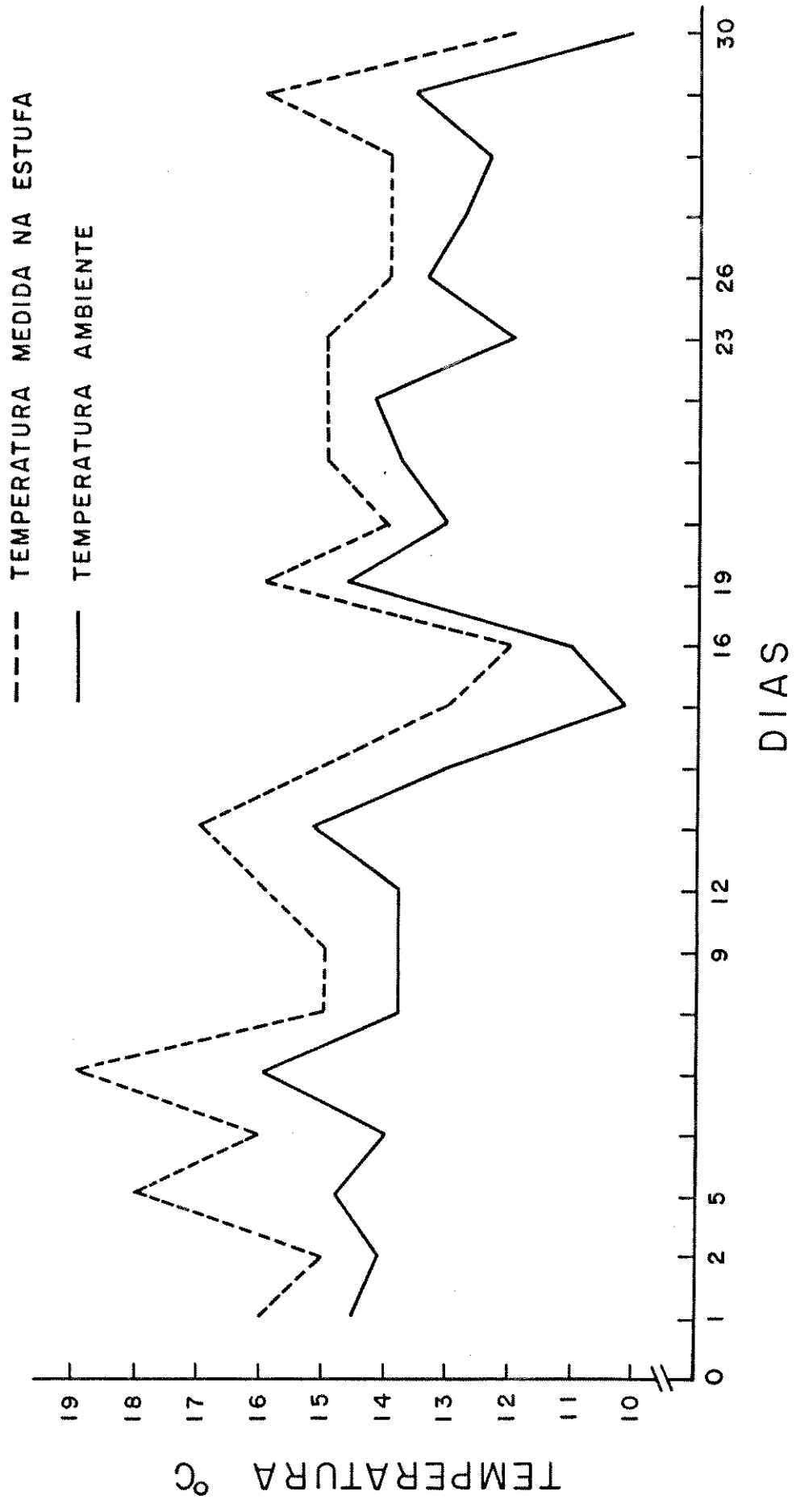


FIGURA 8. Registro das temperaturas mínimas em Campinas e dentro de estufa durante o mês de julho de 1982.

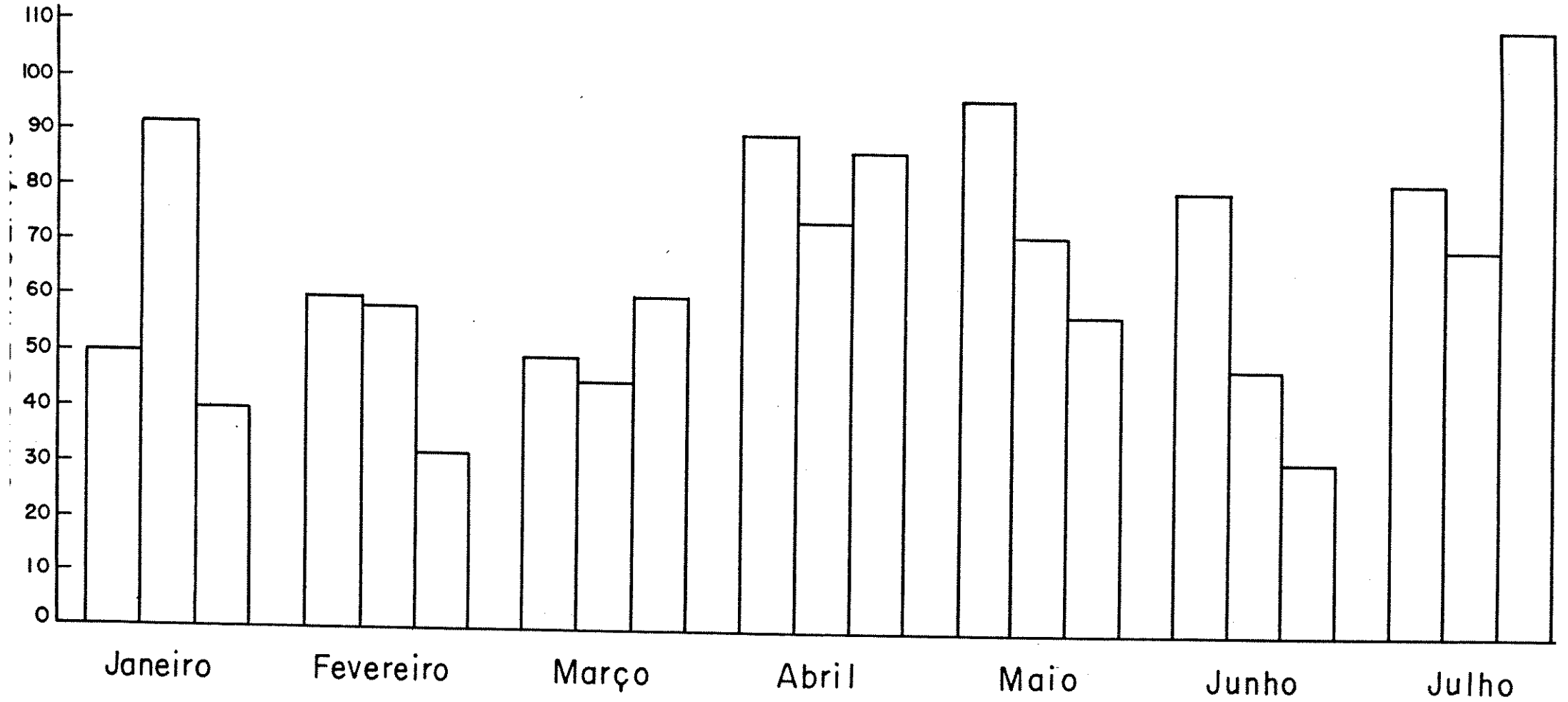


FIGURA 9 - Médias de horas de insolação, por período de 10 dias, obtidas com o heliógrafo. Registro de janeiro a julho de 1982 em Campinas, SP.

1.3.3.5. Avaliação da Cultura Primária

1.3.3.5.1. Crescimento de calos

Ao término da cultura primária foram feitas leituras avaliando-se a contaminação e aspecto dos calos. Os calos foram avaliados por meio de índice de crescimento. Neste critério atribuiu-se notas de 0 a 4, com intervalo de 0,5 para cada nota, conforme o aspecto do calo. Nota zero foi dada ao explante que permaneceu viável, com bom aspecto, porém sem crescimento de calo. Os calos referentes a cada nota foram fixados em glicerina e utilizados como padrão em todas as avaliações, como mostra a Fig.10.

Os calos foram também avaliados quanto à cor e textura . Em alguns experimentos, quando houve diferenciação de raízes, contou-se o número de raízes considerando-se a média aritmética e em determinados casos o comprimento das raízes.

Em todas as avaliações foi anotada a presença de contaminações quer por fungos quer por bactérias.

Após atribuídas as notas foi calculado um ÍNDICE DE CRESCIMENTO (I.C.) através de uma fórmula empírica apresentada a seguir a fim de melhor expressar o crescimento relativo dos calos, segundo SÖNDAHL, 1978:

$$I.C. = \frac{[(\text{nota } 0) \times n_0 \times 0,2] + [(\text{nota } 0,5) \times n_{0,5}] \ldots [(\text{nota } 4,0) \times n_{4,0}]}{n_0 + n_{0,5} + n_1 \ldots n_4}$$

n_0 = número de calos com nota 0

$n_{0,5}$ = número de calos com nota 0,5

$\vdots$

$n_{4,0}$ = número de calos com nota 4,0

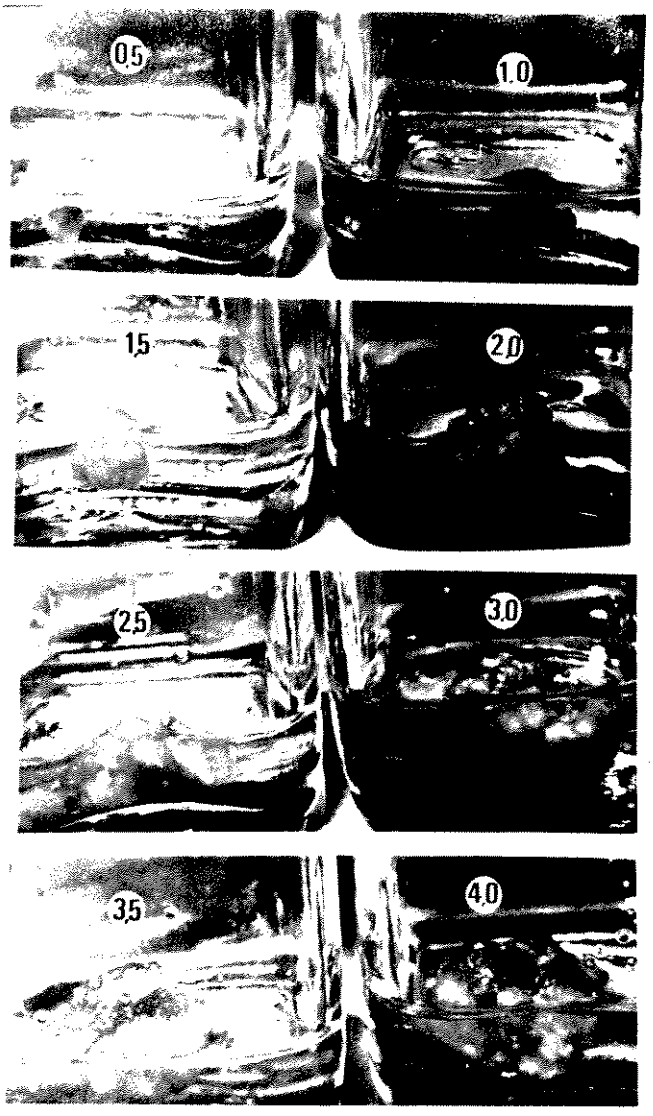
$n_0 + n_{0,5} + n_{1,0} + \ldots + n_{4,0}$ = número total de calos viáveis

FIGURA 10 - Padrão de notas (com intervalo de 0,5) atribuídas visualmente segundo o crescimento dos calos. Calos padrões obtidos em vários tratamentos fixados no mesmo dia em glicerina. Todas as avaliações foram feitas comparando - se os calos nos tratamentos com o calo padrão de cada nota. A fixação de glicerina alterou a cor original dos calos que era creme.

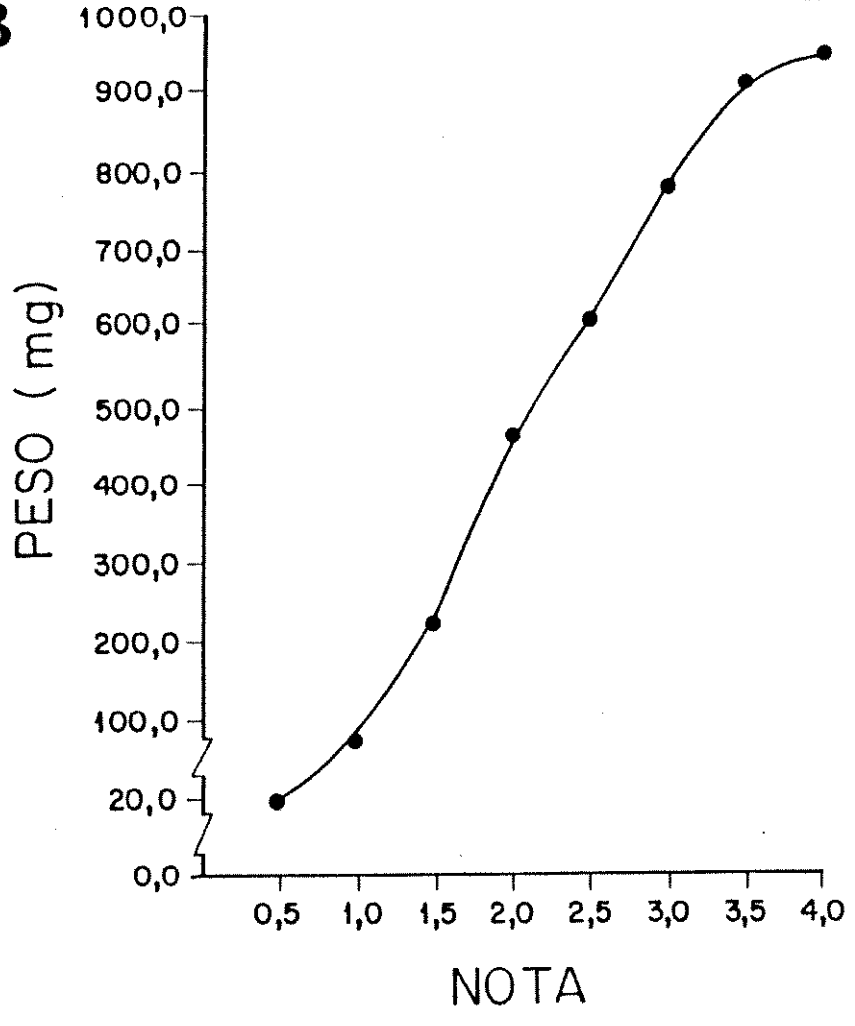
A) Visualização dos calos padrões.

B) Peso dos calos padrões.

A


0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0

B


1000,0
900,0
800,0
700,0
600,0
500,0
400,0
300,0
200,0
100,0
20,0
0,0
PESO (mg)
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
NOTA

1.3.3.5.2. Avaliação de regeneração

A avaliação de regeneração fei feita através de número de gemas formadas e do desenvolvimento destas gemas, até a sobrevivência no campo.

A regeneração de *L. esculentum* no meio primário não é homogênea obtendo-se após aproximadamente 8 semanas de cultivo, o que convencionamos como:

Estádio 0 - gema de 1-2 mm, como pode ser vista na Fig. 11 a olho nu, e na Fig. 12 com lupa esteroscópica (aumento de 10,3 vezes). Nas gemas não desenvolvidas de 1-2 mm, sob lupa esteroscópica, pode-se distinguir limbos foliares.

Estádio 1 - gema com 5 mm, apresentando início de diferenciação. Este tipo de gema pode ser observada na Fig. 13 a olho nu e na Fig. 14 com lupa esteroscópica (aumento de 10,3 vezes). São pequenas folhas, onde pode-se distinguir perfeitamente o limbo foliar.

Estádio 2 - folha com 1 mm, apresentando período, o que pode ser observado na Fig. 15 a olho nu e na Fig. 16 com lupa esteroscópica (aumento de 10,3 vezes).

Estádio 3 - grande desenvolvimento foliar, com pecíolo bem diferenciado (Figs. 17 e 18, a olho nu). A Fig. 17 mostra a regeneração de uma estrutura anômala. As folhas são bem desenvolvidas com pecíolos, podendo alcançar até 3 cm de comprimento neste estádio. O que caracteriza este estádio é a ausência de ápice.

Estádio 4 - desenvolvimento de plantas com ápice, que podem apresentar várias folhas partidas (típicas) ou inteiras (1-2 folhas). Este estudo pode ser visualizado na Fig.19 (a olho nu).

Estádio 5 - planta vigorosa com ápice e 3-5 folhas. Na Fig. 20 (a olho nu) pode-se visualizar perfeitamente que neste caso a diferenciação resultou em uma planta completa.

Observou-se a freqüência de regeneração em cada estádio para cada explante considerado. Agrupou-se as plantletes regeneradas em classes:

a) plantas (plantas com ápice, de 1-5 folhas, podendo ser pequenas ou vigorosas; engloba os estádios 5 e 4):

b) folhas (não há presença de ápice, apenas folhas que podem ser bem desenvolvidas ou em início de diferenciação. Engloba os estádios 3, 2 e 1);

c) gemas (são gemas sem diferenciação marcante. É o estádio dito zero).

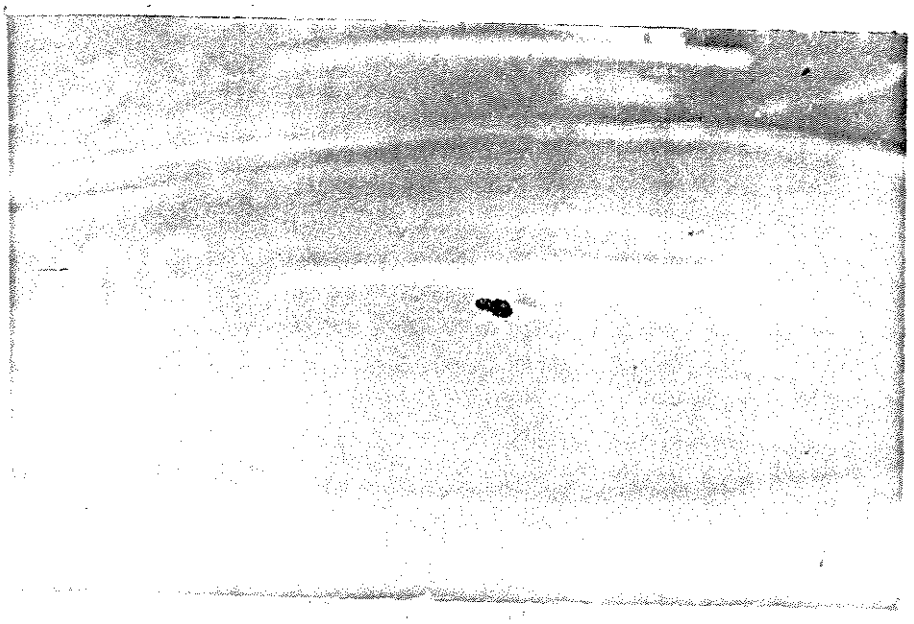


FIGURA 11 - Aspecto a olho nu da plantlete regenerada no ESTÁDIO ZERO (gema de 1-2 mm), em cultura primária. Meio padrão To-M_3 (meio MS + 6-BA 10 μM e AIA 25 μM).

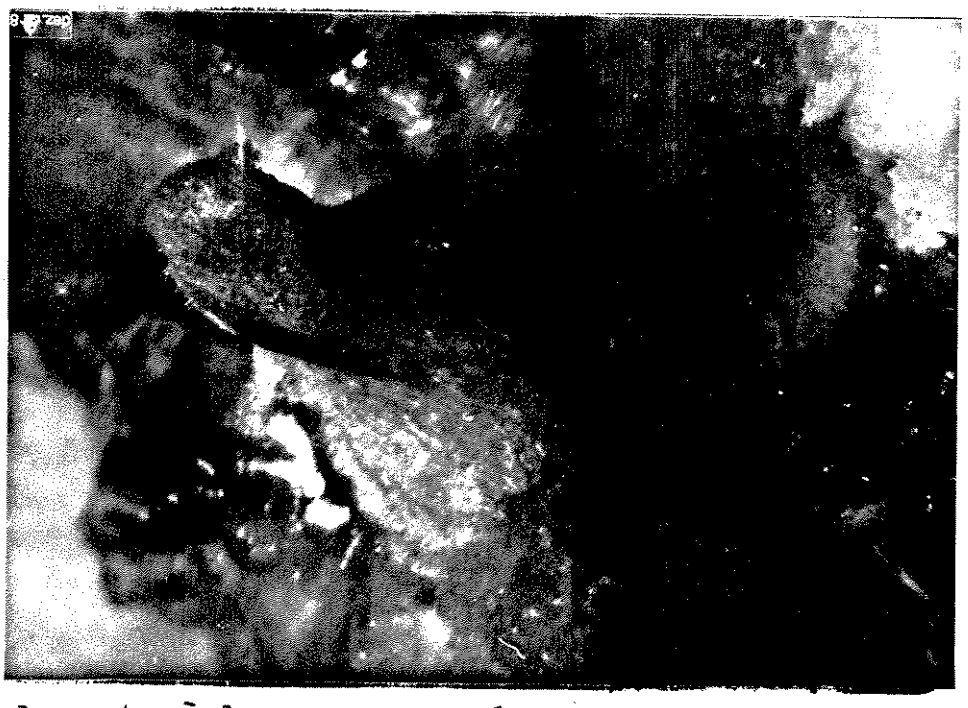


FIGURA 12 - Aspecto à lupa esteroscópica (aumento de 10,3 vezes) da plantlete regenerada no ESTÁDIO ZERO, em cultura primária (meio To-M_3).



FIGURA 13 - Aspecto a olho nu da plantlete regenerada (gema com 5 mm) em ESTÁDIO 1, em cultura primária (meio To-M_3). Neste estádio há diferenciação do limbo foliar.



FIGURA 14 - Aspecto à lupa esteroscópica (aumento de 10,3 vezes) da plantlete regenerada em ESTÁDIO 1, em cultura primária (meio To-M_3).

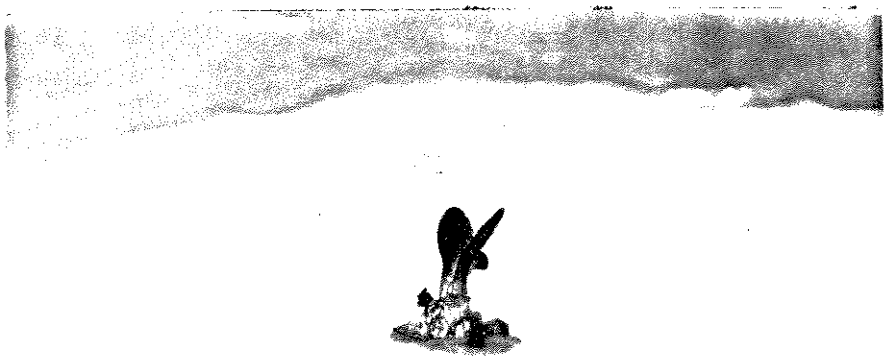


FIGURA 15 - Aspecto a olho nu da plantlete regenerada no ESTÁDIO 2, (folha com 1 cm) em cultura primária (meio To-M_3).

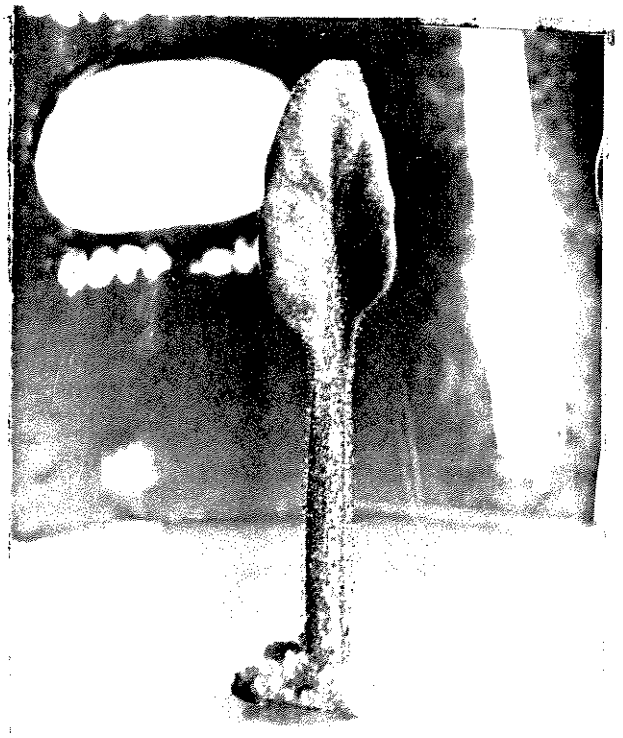


FIGURA 16 - Aspecto a olho nu de plantlete regenerada no ESTÁDIO 3, em cultura primária (meio To-M_3). Há grande desenvolvimento foliar, mas o que caracteriza o estádio 3 é a ausência de ápice.



FIGURA 17 - Regeneração de uma estrutura anômala, em cultura primária (meio To-M_3).

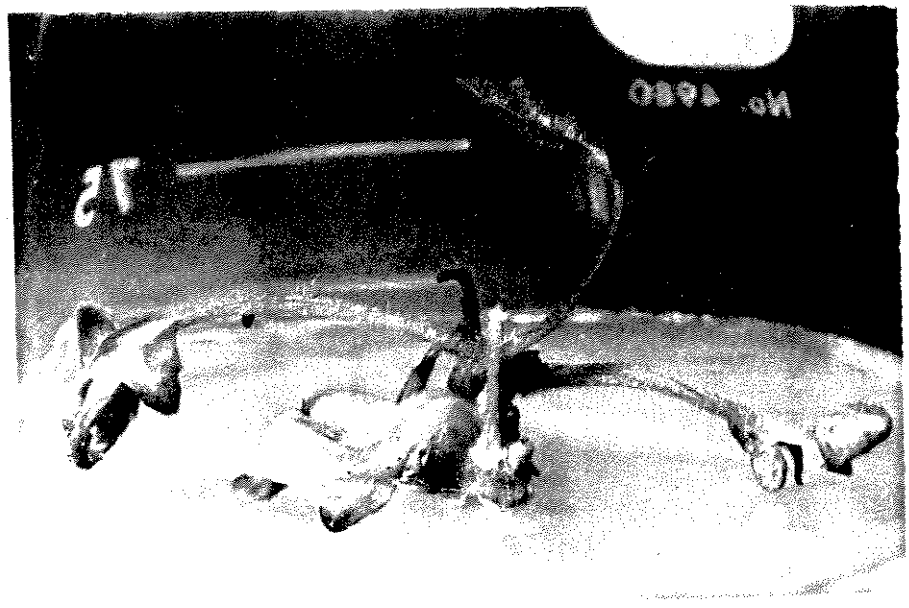


FIGURA 18 - Aspecto a olho nu da regeneração de planta com ápice (2-3 folhas) em ESTÁDIO 4, podendo apresentar folhas típicas (partidas) ou inteiras. Regeneração em cultura primária (To-M_3).

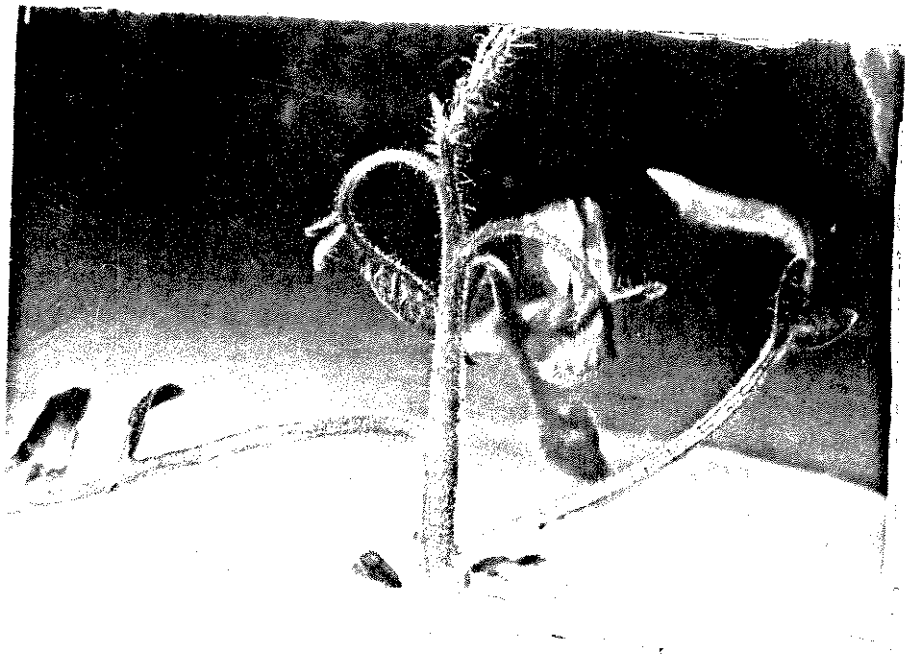


FIGURA 19 - Aspecto (a olho nu) da regeneração de planta com ápice, vigorosa, em estádio bem avançado de diferenciação. Regeneração em cultura primária ($To-M_3$). ESTÁDIO 5.



FIGURA 20 - Visualização de plantas completas, vigorosas, ESTÁDIO 5, regenerada em cultura primária ($To-M_3$). Pode-se observar o calo da qual se diferenciou.

Na anotação de regeneração, consideramos o número total de:

calos viáveis = N

calos regenerados = N_1

regenerações = N_2

plantletes enraizadas = N_3

plantletes aclimatadas = N_4

(estufa)

plantas no campo = N_5

Os parâmetros de regeneração considerados foram:

$$\text{Porcentagem de regeneração} = \frac{N_1 \cdot 100}{N}$$

$$\text{Freqüência de regeneração} = \text{nº gema/calo} = \frac{N_2}{N_1}$$

Freqüência de regeneração por classe é expressa em porcentagem em relação ao total de plantletes

$$\frac{\text{n plantas} \cdot 100}{N_2} \; ; \; \frac{\text{n folhas} \cdot 100}{N_2} \; ; \; \frac{\text{n gemas} \cdot 100}{N_2}$$

Considerou-se também a sobrevivência das plantas regeneradas expressa pela porcentagem de sobrevivência:

$$\text{Porcentagem de sobrevivência} = \frac{N_5 \cdot 100}{N_2}$$

Todas as anotações de freqüência de regeneração em cultura primária feitas utilizando-se vários parâmetros com diversos explantes iniciais e em relação a vários fatores, são mostradas na Tab. 6.

TABELA 6 - Relação das anotações da freqüência de regeneração com cultura primária

PARÂMETROS	EM RELAÇÃO A:	EXPLANTE INICIAL	RESULTADO NA TABELA
a) Número de calos formados e número de calos regenerados	Comparação de fonte de explante	Cotilédone	17.1
		Folha definitiva	17.2
b) Porcentagem de regeneração, nº de regenerações (gemas)/calos - regenerados e porcentagem por classe. $\frac{N_1 . 100}{N} ; \frac{N_2}{N_1}$	Avaliação global dos experimentos de variação somaclonal dos anos de 1982 e 1983.	I) Origem: plântulas estéreis	
		Cotilédone de planta multiplicada	18
		Cotilédone de planta regenerada R_1	19
		Caule de planta multiplicada	20
		Caule de planta regenerada R_1	21
		Folha definitiva planta multiplicada	22
		Folha definitiva planta regenerada R_1	23
classe de plantas: $\frac{n\ Estádio\ 5 + n\ Estádio\ 4}{N_2}$		II) Origem: plantas cultivadas em estufa	
		Folha adulta de planta multiplicada - 1ª etapa	24
		Folha adulta de planta multiplicada - 2ª etapa	25
classe de folhas: $\frac{n\ Est.3 + n\ Est.\ 2 + n\ Est.\ 1}{N_2}$		Folha adulta de planta regenerada R_1 2ª etapa	26
		Folha adulta de planta multiplicada - 3ª etapa	27
classe de gemas: $\frac{n\ Estádio\ zero}{N_2}$		Folha adulta de planta regenerada R_1 3ª etapa	28

1.3.4. Cultura secundária (enraizamento)

Para o enraizamento das plantas regeneradas a partir dos calos, utilizou-se igualmente o meio MS acrescido de 40 g/l de sacarose e 6 g/l de ágar, sem adição de fitorreguladores, com o pH ajustado para 5,5.

O meio de cultura secundária foi também utilizado para:

a) germinação de sementes previamente esterilizadas (ver item 1.1.2.1).

b) inoculação dos submeristemas retirados das plântulas estéreis. As plantas desenvolvidas a partir dos submeristemas serviram como fonte de explantes (ítem 1.2).

As plantas regeneradas e os submeristemas foram cultivados em condições naturais de temperatura e luz. A intensidade luminosa, nestas condições, variou de 120 $\mu W.cm^{-2}$ a 43 $\mu W.cm^{-2}$.

1.3.5. Cultura terciária (aclimatação)

A planta regenerada, mesmo enraizada, não está em condições de ser plantada diretamente no solo, pois uma mudança brusca do ambiente estéril com alta umidade relativa as condições ambientais pode-lhe ser fatal. Para evitar isto, a plantlete deve ser aclimatada, vagarosamente, às condições externas.

Inicialmente, a plantlete enraizada foi transferida para frascos com mistura de vermiculita e areia umedecidos com o meio MS (sem açúcar e fatores de crescimento) que foram previamente es

terilizados.

Nestas condições, a abertura da proteção, filme de PVC marca Resinite da Alba Adria S.A., que cobre a plantlete, foi feita gradualmente, em intervalos regulares de 4-5 dias, sempre em pequenas dimensões. Após um período de cerca de um mês, ocorre a abertura total, quando então a plantlete se encontra aclimatada ao ambiente natural. As plantas foram regadas, sempre que necessário, com solução de HOAGLAND & ARNON (1950), com pH ajustado 5,5, sem esterilização. Todas estas operações foram realizadas em condições ambientais, não assépticas. Aí, então, foram transferidas para o solo. Depois do plantio as plantas permaneceram em estufa e, posteriormente, em campo, onde as plantas cresceram, floresceram e frutificaram normalmente.

2. Produção de plantas por variação somaclonal

2.1. Efeito de explante inicial

Neste tópico iremos discutir globalmente, em termos quantitativos, a regeneração em cultura primária dos experimentos realizados nos anos de 1982 e 1983, utilizando-se como fonte de explante plântulas estéreis (cotilédone, caule e folha definitiva) e folha de estufa. Os resultados serão analisados por explante inicial utilizado.

2.2. Correlação entre estádios de regeneração, enraizamento, aclimatação e sobrevivência no campo

Fez-se o acompanhamento das plantletes, a partir de sua identificação, passando pela fase de enraizamento, aclimatação de sobrevivência no campo, com o intuito de se verificar a eficiência da metodologia e verificar a possível correlação entre o tipo de regeneração observada em cultura primária (ver ítem 1.3. 3) e sobrevivência no campo. Este acompanhamento foi feito considerando cada fonte de explante inicial em particular (cotilédone, caule e folha definitiva), quer se tenha considerado os experimentos globalmente; quer se tenha relacionado os experimentos com os estádios de regeneração.

2.3. Acompanhamento das Plantas Regeneradas no Campo

2.3.1. Cultivo

Após a aclimatação, as plantas foram transplantadas para o solo e foram mantidas em condições naturais de campo. As condições do ambiente temperatura e horas de insolação) durante o período em que as plantas foram observadas são mostradas na TABELA 7.

Sempre que necessário, foram feitas pulverizações para evitar proliferação de pragas. Foram utilizados os seguintes produtos comerciais: Manzate-D , para o combate de *Phytophthora*; Derosal ou Benlate, para *Alternaria*; Ekatox + Tamaron ou Malix,para traça, ácaros, cochonilha e lagarta do fruto.

De 15 em 15 dias era feita adubação com NPK.

2.3.2. Observações de crescimento (fenotípicas) e de desenvolvimento (floração e frutificação)

Fez-se o acompanhamento no campo das características de plantas regeneradas, acompanhamento feito semanalmente. Observou-se tanto as características fenotípicas como floração e frutificação. Dentre as características fenotípicas estiveram: altura e porte de planta; forma e textura de folha; produtividade da planta ; características e medidas de eixos dos frutos. Os resultados da anotação do acompanhamento no campo para os parâmetros considerados serão mostrados conforme descrito na TABELA 8.

Os frutos eram recolhidos no estádio "RED" (RICK,1978).A relação entre as medidas do eixo maior e eixo menor forneceu o formato de fruto. Estes eram cortados transversalmente para retirada e contagem das sementes. As sementes retiradas eram colocadas para fermentar por 2 e 3 dias. A fermentação inibe o vírus do mosaico de tabaco (VMT) e elimina externamente a bactéria do cancro bacteriano (ROBBS,1971).

TABELA 7 - Condições do ambiente durante o período de observação de características fenotípicas e de produção de plantas de tomate regeneradas (R_O). Dados fornecidos pela Seção de Climatologia do Instituto Agronômico de Campinas e referentes ao município de Campinas, SP.

TABELA 7.1

Temperatura °C	Mês		
	Agosto	Setembro	Outubro
temperaturas médias	18,6°C	18,2°C	20,7°C
médias das mínimas	12,7°C	14,5°C	16,5°C
médias das máximas	26,3°C	23,3°C	26,5°C

TABELA 7.1 - Temperaturas médias; média das temperaturas mínimas; média das temperaturas máximas. Período considerado: agosto, setembro e outubro de 1983.

TABELA 7.2

	Mês		
	Agosto	Setembro	Outubro
Horas de insolação no mês	277,6	128,0	183,2

TABELA 7.2 - Horas de insolação durante os meses de agosto a outubro de 1983.

TABELA 8 - Anotação do acompanhamento no campo, das plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos

PARÂMETROS	EM RELAÇÃO A:	EXPLANTE INICIAL	RESULTADOS
a) Características fenotípicas de folhas e produção de frutos	Dados obtidos de forma e borda de folha, nº de frutos/cacho; nº total de frutos produzidos; forma do fruto; presença de bicos; nº de sementes e retirada de sementes.	cotilédone	Tabela 33
		folha definitiva	Tabela 34
		caule	Tabela 35
	Dados analisados das características acima.	cotilédone, folha definitiva e caule	Tabela 36
b) Proporção de frutos obtidos em relação às plantas regeneradas.	Material vegetal	cotilédone, folha definitiva e caule	Tabela37.1
	Explante inicial	cotilédone, folha definitiva e caule	Tabela37.2
c) Características fenotípicas de plantas; precocidade de floração; vigor; coloração das folhas.	Plantas obtidas em 3 ciclos (1983, 1984 e 1985) de regeneração.	cotilédone, folha definitiva e hipocótilo	Tabela 38

Métodos para seleção in vitro (pré-seleção)

Nestes tópicos estudaram-se os efeitos *in vitro* dos filtrados de cultura (exsudato) de *Alternaria solani*.

No Ítem 3 é descrita a metodologia empregada em relação ao patógeno, tanto para a cultura do fungo, como para a obtenção de filtrados tóxicos.

No Ítem 4 é descrita a metodologia do emprego dos filtrados obtidos,em cultura dos tecidos, com o intuito de se obter plantas regeneradas com pressão de seleção.

Metodologia empregada em relação ao patógeno

3. Cultura do fungo e obtenção de filtrados fitotóxicos

3.1. Cultura de *A. solani*

3.1.1. Isolamento do fungo *A. solani*

Para o isolamento de *Alternaria solani* procedeu-se da seguinte maneira:

1. coletou-se folhas e hastes com lesões típicas em plantações nas imediações
2. colocou-se em sacos plásticos e rotulou-se
3. emergiu-se pequenos pedaços da região marginal dos tecidos necrosados por 10 segundos em solução de álcool 50% v/v
4. em seguida, colocou-se os tecidos em solução de hipoclorito de sódio comercial 10% v/v por 3 minutos
5. lavou-se e colocou-se os tecidos em suspensão com água estéril.

6. colocou-se, com auxílio de pinças estéreis, o tecido na placa contendo papel de filtro esterilizado;
7. cortou-se com o bisturi o tecido em explante com área de mais ou menos 1 cm^2;
8. inoculou-se em placas de Petri contendo meio de cultura apropriado para o desenvolvimento do fungo.

3.1.2. Manutenção do fungo em meio sólido

A manutenção do fungo em meio sólido foi feito por inoculações, pois WELLMAN (1943) obteve resultados mais satisfatórios com *A. solani* a partir do inóculo crescido em ágar. Para a inoculação, utilizou-se a técnica proposta por WELLMAN (1943): inoculação de um pequeno pedaço do fungo isolado, de cerca de 0,5 cm de diâmetro, colocado no centro de uma placa de Petri com meio de cultura. Preliminarmente, foi utilizado o meio de cultura de batata-dextrose-ágar (BDA).

O meio de cultura mais indicado para manutenção do fungo é composto de 20% de suco de legumes V8 comercial, acrescido de 5 g/l de sacarose e 10 g/l de ágar e pH ajustado para 5,5. As condições de cultivo foram semelhantes à cultura líquida (ítem 3.4.2.).

V_8 é o nome do produto da Campbell Soup Company, uma mistura de sucos de oito legumes: tomate, cenoura, alface, beterraba, espinafre, aipo, salsinha e agrião d'água. Foi testado para crescimento de vários fungos: *Stemphilium solani* Weber, *Alternaria solani*, *Septoria lycopersici* Speg, *Helminthosporium turcium* Pass, *Phytophthora infestans* Mont du Cary, entre outros (MILLER, 1955). STOESSL (1982), cultivando duas linhagens de *A. solani* no meio V_8-ágar, para posterior extração do ácido alternárico, observou que a produção deste ácido é dependente da linhagem, pois, ambas as linhagens apresentam bom crescimento no meio V_8, mesmo a linhagem que não produziu o ácido.

O meio de cultura sólido utilizado para posterior obtenção de filtrado estéril de cultura consistiu de 200 ml/ 1 de extrato de tomate comercial, mais 200 ml/1 de extrato de folhas sadias de tomateiro, 10 g/1 de sacarose e 8 g/1 de ágar com pH ajustado para 5,5.

As modificações feitas no meio sólido se devem a dois fatos:

1º) o meio ótimo para *A. solani* deve conter altas concentrações 7,5% (ou mais até) de sacarose, que é melhor fonte de carbono (BRIAN *et al*, 1951).

2º) presença de folhas do tomateiro estimula o crescimento do micélio e foi verificado que a quantidade do ácido alternárico é diretamente relacionada com a quantidade de micélio formada (BRIAN *et al* 1951).

Além disso, foi verificado que o fungo *Helminthosporium sacchari* para manter sua habilidade de causar doença em cultura necessita crescer em meio contendo extrato da planta hospedeira (cana-de-açúcar). Se o fungo é mantido em um meio de cultura completamente sintético e transferido várias vezes, perde a habilidade de produzir toxina e também a capacidade de causar a doença. Quando este é transferido novamente para um meio que contém o extrato de cana-de-açúcar, começa novamente a produzir a toxina e recuperar a habilidade de colonizar a planta de cana. Foi demonstrado que existe um composto no extrato de cana-de-açúcar carregado positivamente, com um peso molecular de cerca de 1.500 que apresenta a habilidade de "ligar" o fungo através de indução da produção de toxina, o composto não está presente nas plantas resistentes (STROBEL, 1975). Mas, como o autor frisa não se conhece a natureza deste composto indutor e nem o predomínio deste na indução dos fenômenos na doença vegetal.

Ambos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave e posteriormente vertidos em placa de Petri, em câmara asséptica.

Uma semana após a inoculação e selecionadas as placas com colônias pertencentes todas a um mesmo tipo, fez-se as repicagens.

Áreas do micélio (0,77 cm^2) retiradas da periferia da colônia, zona de crescimento mais ativo, junto com o meio de cultura são retiradas e reinoculadas em novas placas, quando então foram colocados sobre a superfície do ágar, em posição central (SHEPARD, 1979). Estes inoculados foram, sempre que necessário, testados, para verificar a manutenção da patogenicidade.

3.2. Teste de Patogenicidade

3.2.1. Isolados do Fungo

Para manutenação da cultura pura (*Alternaria solani*), no laboratório, estas devem ser transferidas para meios novos a intervalos regulares. Os meios e as condições de cultivo para este fim, visam assegurar a sobrevivência do microorganismo ao máximo.

Teste:

1. Retirar amostras dos isolados do fungo e colocar em um tubo com água estéril;
2. inocular em folhas sadias, destacadas de tomateiro;
3. manter estas folhas em câmara úmida, por cinco dias;
4. após o tempo de incubação, avaliar os testes através de nota (Figura 21).
5. verificar, através dos resultados obtidos, se os isolados são efetivos, ou seja, são capazes de causar os sintomas típicos da doença (pinta-preta).

3.2.2. Teste de Patogenicidade do Fungo Crescendo em Meio Sólido

1. retirar amostras dos isolados do fungo e colocar em um tubo com água estéril
2. inocular em folhas destacadas de tomateiro
3. manter estas folhas em câmara úmida por cinco dias
4. após o tempo de incubação, avaliar os testes através de nota (Figura 21)
5. verificar através da visualização da sintomatologia obtida se os isolados apresentam-se patogênicos, capazes de causar sintomas típicos da doença, ou seja, que o cultivo em meio sintético não alterou a patogenicidade do fungo.

3.3. Crescimento do Fungo em Meio Líquido

O fungo foi crescido em meio líquido natural (natureza química não determinada) e em meio líquido sintético de natureza química determinada.

3.3.1. Meio líquido natural

Usam-se 30 ml de suco de legumes V8 comercial e 200 ml de água destilada. Áreas de micélio de tamanho padronizado (cada área 0,77 cm^3).

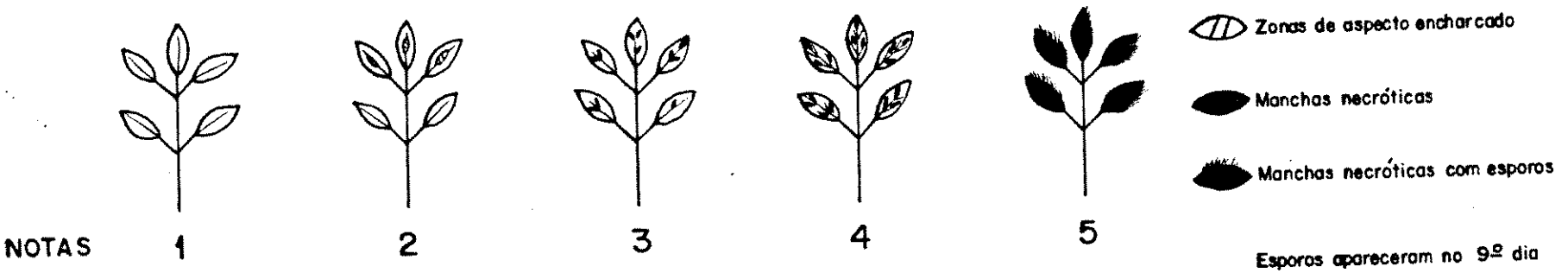
Inoculam-se duas áreas para cada 150 ml de V8 mencionado, em condições estéreis.

FIGURA 21 - Teste de patogenicidade de *Alternaria solani*. Considerou-se a patogenicidade pelo aparecimento de sintomas, aos quais de atribuiu uma escala de notas (1-5) conforme os critérios descritos no esquema abaixo.

Nota	Sintoma
1	- sem sintomas
2	- aparecimento de zonas de aspecto encharcado
3	- aparecimento de manchas necróticas em fase inicial, na região das nervuras
4	- aumento da progressão das manchas necróticas na região das nervuras
5	- todo o limbo foliar apresenta-se necrosado e são visíveis os esporos do fungo nos folíolos completamente necrosados

FIGURA 21

TESTE DE PATOGENICIDADE DE *ALTERNARIA SOLANI*



3.3.2. Meio líquido sintético

O meio de cultura utilizado foi de Czapek-Dox (in PELCZAR & CHAN, 1972) modificado, ficando as concentrações da seguinte maneira:

$NaNO_3$	2 g/l
KCl	0,5 g/l
$MgSO_4$	0,5 g/l
K_2HPO_4	1,0 g/l
$FeSO_4.H_2O$	0,028 g/l
Na_2EDTA	0,037 g/l
Sacarose	15 g/l

O pH foi ajustado para 5,0 (BRIAN et al., 1951). As modificações foram feitas nas concentrações de nitrato, adição de ferro quelado e concentração de sacarose. Esta última modificação foi baseada em POUND & STAHMANN (1951). Inicialmente, utilizou-se erlenmeyers de 2 litros (MATERN et al., 1981) para o cultivo em meio líquido. Devido a alta taxa de contaminação passou-se para erlenmeyers de 250 ml.

Inoculou-se duas áreas padronizadas (0,77 cm^2 por área) em cada 150 ml de meio líquido em condições assépticas. As culturas foram mantidas em câmaras ambientais de cultivo "Biotronette Mark III". A fonte luminosa constitui-se de uma mistura de lâmpadas incandescentes e fluorescentes com intensidade luminosa de 1300 $\mu W.cm^{-2}$. A temperatura foi de 19 $\pm$ 1°C. Tempo de incubação variou conforme o experimento (o cultivo do fungo foi estacionário).

O padrão de crescimento do fungo no meio de Czapek-Dox modificado pode ser visto na Figura 22, onde se observa a relação

entre a nota dada e o respectivo tipo de crescimento.

3.4. Obtenção do Filtrado de Cultura de *Alternaria solani*

3.4.1. Filtrado obtido a partir do fungo crescendo em meio natural (V8)

Após 20 dias de incubação, filtrou-se o meio líquido no funil de "Büchner", sob vácuo para eliminação de partículas maiores presentes no meio líquido. Posteriormente, o filtro foi submetido à centrifugação por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi colhido em becker, sendo então esterilizado por meio de filtro de membrana 0,4 μ (Millipore). O filtrado, agora estéril, foi coletado em recipiente estéril e conservado à baixa temperatura.

3.4.2. Filtrado obtido a partir de fungo crescendo em meio sintético (Czapek-Dox modificado)

Após inoculação do micélio no meio líquido, este foi submetido a uma filtração simples em algodão comum. Posteriormente, o filtrado foi submetido a uma nova filtração em funil de "Büchner", sob vácuo. Desprezou-se o resíduo formado no papel, obtendo-se um líquido límpido, com pH ajustado para 5,5.

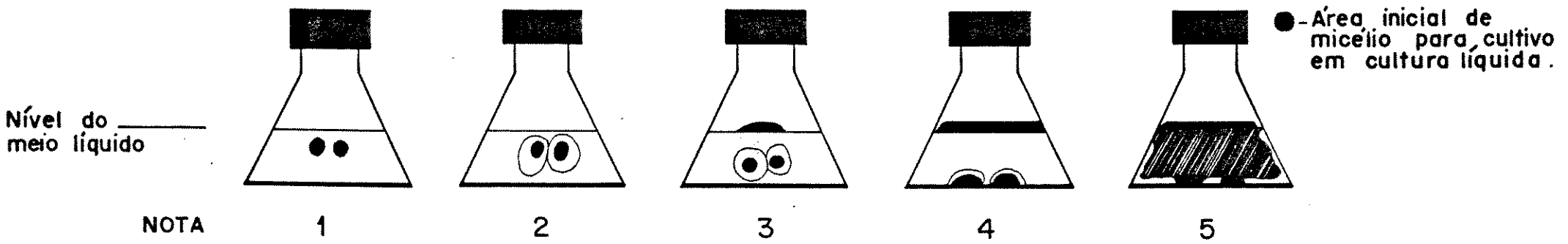
O filtrado assim obtido foi esterilizado e após esterilização foi utilizado nos testes de fitotoxicidade.

FIGURA 22 - Crescimento de *Alternaria solani* em meio líquido (Czapek-Dox). Considerou-se o crescimento por uma escala de notas (1-5) conforme os critérios descritos no esquema abaixo:

Nota	Tipo de Crescimento
1	sem nenhum crescimento
2	crescimento hialino envolve completamente as áreas iniciais de inóculo
3	início da formação do micélio sobre a superfície do meio líquido
4	micélio cobre completamente a superfície do meio líquido, à procura de aeração
5	crescimento do micélio do fungo cobre tanto a superfície do meio líquido como também se desenvolve em praticamente todo o meio líquido, formando uma massa compacta, sobrando apenas os inóculos iniciais e pouco do meio líquido original

FIGURA 22

CRESCIMENTO DE ALTERNARIA SOLANI EM MEIO LÍQUIDO (CZAPEK - DOX)



3.5. Teste de Fitotoxicidade do Filtrado Estéril de Cultura de Fungo

Método do fluxo de transpiração em estacas de tomateiro (WELLMANN, 1943; POUND & STAHMANN, 1951; BASU, 1974)

Este teste é feito para se verificar a fitotoxicidade do filtrado de *Alternaria solani*.

Coletou-se estacas de plantas sadias crescendo no campo, de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Ângela, dando-se preferência às plantas não floridas, e utilizando-se estacas do terço superior da planta. Teve-se o cuidado de cortar a base das estacas dentro d'água para evitar a entrada de ar, o que dificultaria o fluxo de transpiração.

Em câmara asséptica, as estacas, após serem lavadas com água destilada estéril, são transferidas para frascos que contém o filtrado previamente esterilizado não diluído. Os frascos com as estacas são mantidos em condições normais de laboratório com ar condicionado ligado para aumentar a transpiração pelas folhas. Nessas condições, após 24 horas é feita a avaliação do teste, verificando-se a ação do filtrado através dos sintomas por ele produzido. Verificou-se preliminarmente que a visualização máxima dos sintomas ocorre após 24 horas. Períodos mais longos levam a danos do material, como foi verificado com o controle do meio de cultivo do fungo e com o controle de água destilada estéril.

O teste foi avaliado visualmente através do aparecimento sucessivo de sintomas macroscopicamente visíveis (Figs. 23 e 24). A progressão dos sintomas nos folíolos foi determinada e a cada grau correspondeu a um gradiente de notas de 1 (sem sintomas)

a nota 5 (necrose total do folíolo). O conceito de notas de fitotoxicidade do filtrado segundo o observado com isolados de *A. solani* em estacas de tomate já está bem estabelecido (WELMANN, 1943; POUND & STAHMANN, 1951 e BASU, 1974).

. Teste de resistência em estacas de tomateiro

Notas	Sintomas
1	. ausência total de sintomas
2	. epinastia (leve a acentuada)
3	. murcha (leve e acentuada)
4	. aparecimento de manchas necróticas (do tipo a ao tipo e). O esquema do tipo de manchas pode ser visto na Fig. 23.
5	. a mancha necrótica pode apresentar o halo cloró tico como apresenta a doença no campo. Aumento no número de folíolos, afetados com os vários tipos de manchas necróticas (Fig. 24), até toda a esta ca estar necrosada.

É interessante ressaltar que a progressão de sintomas (epinastia, murcha, clorose e necrose) observadas neste teste de estacas corresponde exatamente ao síndrome de murcha causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em tomate (DICKINSON & LUCAS, 1982). Como os autores salientam, nesta doença, o efeito final depende não só dos efeitos físicos (obstrução de vasos) e químicos (metabólitos) do patógeno, como da resposta do tomateiro, o hospedeiro, que produz gomas e mucilagens e forma tiloses nos vasos. No caso do teste de estacas de tomateiro, o efeito final se deve apenas aos metabólitos do fungo (*A. solani*) testado, pois, além de não haver presença física do fungo, as estacas destacadas não podem produzir estes tipos de respostas num período tão curto.

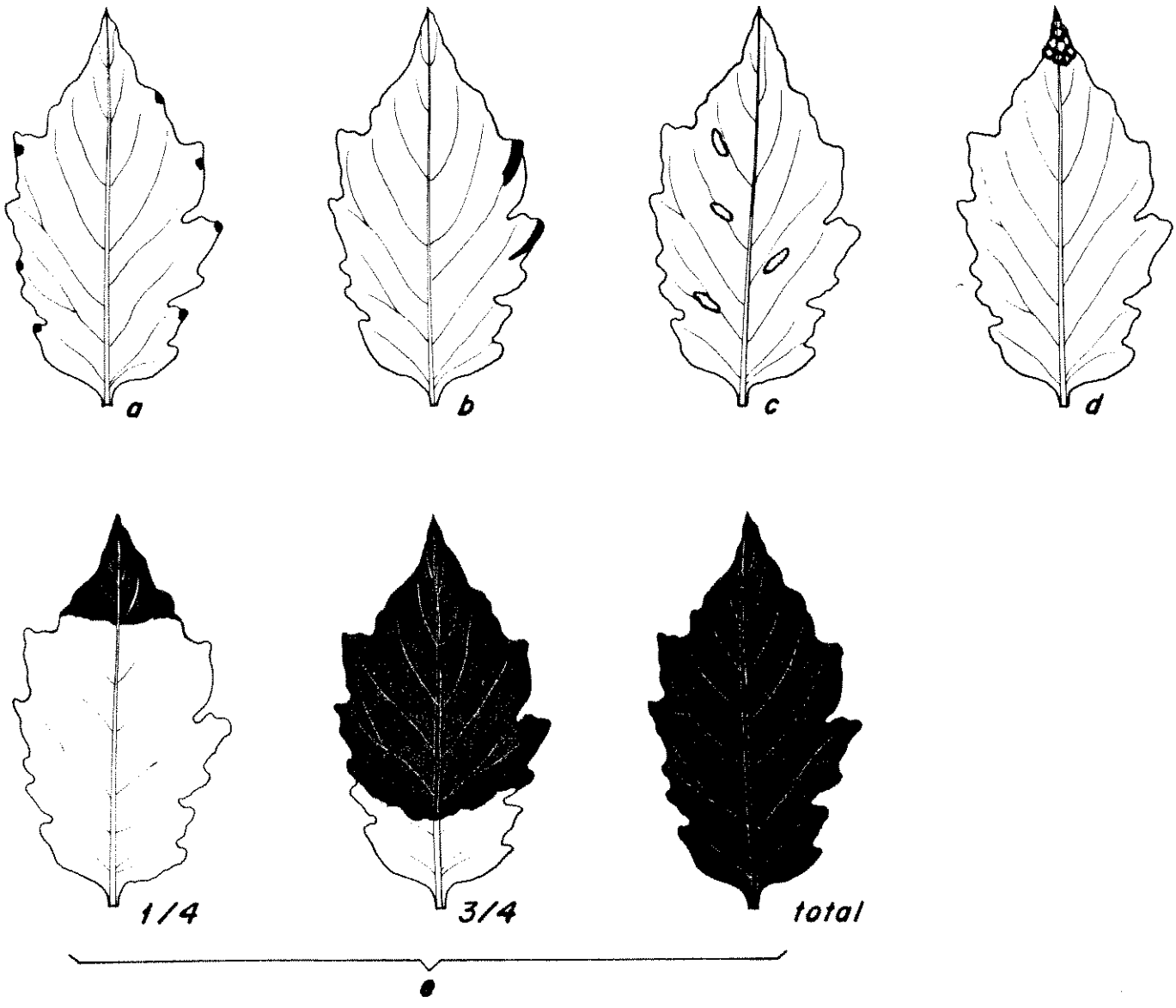


FIGURA 23 - Sintomatologia causada pelo filtrado estéril no teste de estacas de tomateiro.

Tipos de sintomas:

(a) pequenos pontos necróticos nos bordos dos folíolos

(b) manchas necróticas abrigadas nos bordos dos folíolos

(c) manchas intercostais claras pela destruição do mesófilo

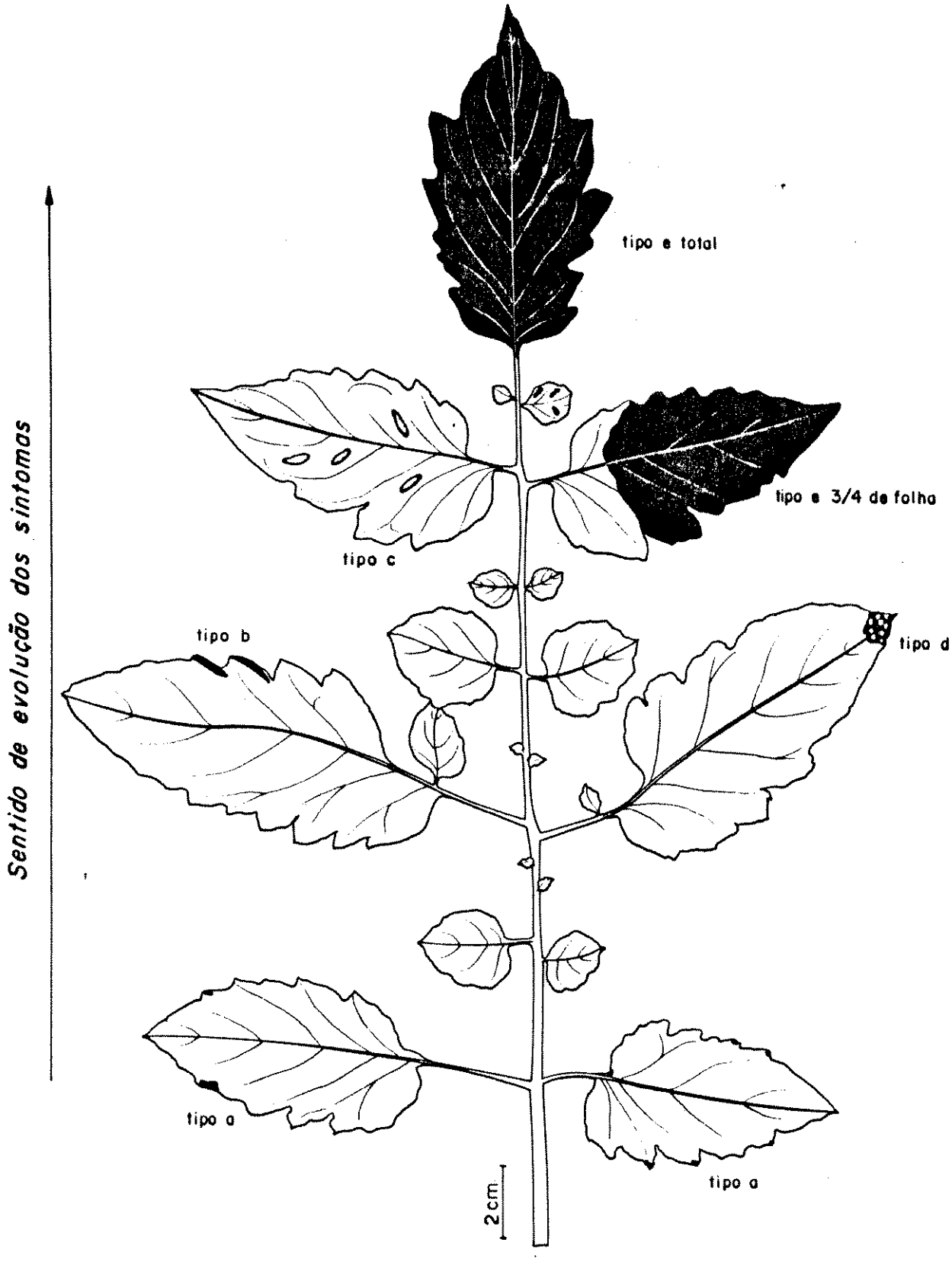
(d) ponta distal do folíolo com o mesófilo e epiderme completamente danificados

(e) necrose do limbo foliar, podendo afetar 1/4 ; 3/4 ou todo o folíolo

FIGURA 24 - Progressão dos sintomas de fitotoxicidade do filtrado estéril de cultura de fungo em folhas de estacas de tomateiro. O folíolo terminal apresentando a mancha necrótica tipo e total caracteriza o "blight" , que é definido por ROBERTS & BOOTHROYD, 1984 como um sintoma necrótico não restrito caracterizado pela morte derradeira de tecidos inteiros, tais como folhas ou flores. Este síntoma é tão marcante que denomina a doença causada por *A. solani* em língua inglesa. Nesta língua a doença causada por *A. solani* é denominada de "early blight" em contraponto a doença causada por *Phytophthora infestans* Mont du Bary denominada de "late blight".

FIGURA 24

Tipo da mancha necrótica



3.6. Relação entre o Período de Crescimento do Fungo em Meio Líquido e a Produção de Metabólitos Fitotóxicos

A avaliação da fitotoxicidade do filtrado de cultura de *Alternaria solani*, relacionando o crescimento do fungo *in vitro* com a produção de metabólitos fitotóxicos, foi obtida através da resposta fitotóxica do filtrado não diluído pelo método de fluxo de transpiração em estacas de tomateiro.

O isolado do fungo testado foi Santa Eliza e as estacas (de no mínimo 10 cm e máximo 50 cm, geralmente em torno de 20 e 40cm) foram retiradas dos ramos do terço superior de plantas sadias do cultivar Ângela, de preferência não floridas.

Montagem das Curvas-Padrões

I) Preparo dos filtrados

Para se iniciar a curva-padrão de fitotoxicidade foi feita a inoculação de áreas padronizadas do micélio (2 cm^2 para 150 ml de meio líquido) a partir de uma única colônia do isolado em uma bateria de cultura líquida estéril. O meio sintético utilizado foi o de Czapek-Dox (*in* PELCZAR & CHAN, 1972) modificado. O dia da inoculação das áreas miceliais em toda a bateria foi considerado dia zero de permanência do fungo em meio líquido.

O material do fungo utilizado (Santa Eliza) foi isola

do em 30/03/83 a partir de lesões no caule de plantas infectadas no campo. O fungo isolado foi mantido por 19 dias no meio de batata-dextrose-ágar (BDA) e transferida para o meio com suco de tomate (ver ítem 3.1.2.- Cultivo do fungo em meio sólido) por mais 11 dias, totalizando, assim, um período de 30 dias de crescimento do fungo em meio sólido.

Em 29/04/83, o fungo foi inoculado em meio líquido (dia zero). O aspecto do crescimento do fungo a partir das áreas miceliais iniciais pode ser visto na Fig. 50 . A inoculação das áreas miceliais foi feita em ambiente sob constantes correntes de convecção a fim de se permitir a máxima assepsia possível. As correntes de convecção foram formadas pelo calor formado por 2 bicos de Bünsen. A operação foi feita com todo cuidado possível, com instrumentos submetidos ao calor e com intervalos de tempo regulares para limpeza do ambiente. Com estes cuidados, a inoculação de áreas miceliais do fungo sob correntes de convecção constante não apresentou contaminação, tendo, então, se constituído na técnica padrão, quer para manutenção do fungo em meio sólido (inoculação e repicagens periódicas) quer para se iniciar o crescimento do fungo em meio líquido.

Foram feitas duas curvas-padrões, nas quais foram retiradas amostras independentes (2 replicatas por amostra) após:

a) 27, 30 e 45 dias de permanência em meio líquido

b) 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55 e 60 dias de permanência em meio líquido

As condições de cultivo do fungo já foram descritas previamente.

Para cada amostra, correspondente ao determinado período, as culturas do fungo (2 replicatas por amostra) foram retiradas das condições de cultivo e submetidas à filtragem. Quando certas culturas apresentaram características cromogênicas, estes foram utilizadas misturadas às demais.

O processo de filtragem foi feita em condições não assépticas mas com vidraria (Kitassato, funil de Büchner e frascos coletores), algodão e papel de filtro previamente esterilizados.

O filtrado obtido foi, então, em câmara asséptica distribuido em frascos coletores previamente esterilizados (30 ml por frasco), sem qualquer diluição. Nesta forma, os filtrados foram:

1. imediatamente colocados à baixa temperatura (cerca de $5^{o}C$). Tratamento NÃO AUTOCLAVADO.

2. submetidos a autoclavagem ($120^{o}C$ por 20 minutos). Tratamento AUTOCLAVADO.

Junto com os frascos com o filtrado foram igualmente autoclavados frascos com meio de Czapek-Dox, nos quais não foram inoculadas áreas miceliais do fungo no dia zero, em período correspondente em dias a amostra considerada. Este tratamento se constituiu no controle. Outra aferição foi feita a partir de água destilada, igualmente esterilizada por autoclavagem.

O preparo dos filtrados foi feita sempre no dia imediatamente anterior a montagem do teste de estacas, de preferência no final da tarde, para permitir o menor tempo possível entre obtenção dos filtrados e o teste fitotóxico dos mesmos.

II. MONTAGEM DO TESTE

Nas primeiras horas do dia foram coletados ramos de plantas sadias crescendo no campo, que foram, imediatamente, colocados em contato com água.

No laboratório, destes ramos, *sob água*, foram excisadas estacas. O corte das estacas dentro d'água foi feito não só para evitar-se a interrupção do fluxo de transpiração nos vasos condutores, mas, também, para se impedir infecção bacteriana, procedimento este efetuado nos testes de fitotoxicidade , igualmente em fluxos de transpiração, de filtrados de cultura do fungo *Didymella applanata* (Niessl)Sacc (SCURING & SALEMINK, 1972).

Os passos seguintes da montagem ocorreram em câmara asséptica. As estacas foram profusamente lavadas com água destilada esterilizada e colocadas nos frascos (150 ml de capacidade) autoclavados com filtrados colocados imediatamente à baixa temperatura (tratamento 1) e filtrados submetidos à autoclavagem (tratamento 2).

Foram colocadas 2-3 estacas por frasco. Em cada tratamento, considerando cada período de permanência em meio líquido, foram feitas 3 replicatas (3 frascos). Como as estacas apresentaram de 3-6 folhas e de 10-50 folíolos, no teste, foram avaliadas em média 4 folhas e 30 folíolos para cada período de crescimento do fungo em meio líquido. Isto foi feito em todos os tratamentos, nos quais as estacas foram mergulhadas em 30 ml de:

Tratamento 1 - filtrado NÃO AUTOCLAVADO - submetido à baixa temperatura

Tratamento 2 - filtrado AUTOCLAVADO

Tratamento 3 - meio de Czapek-Dox sem inoculação do fungo, pelo mesmo período correspondente à amostra, autoclavado (CONTROLE).

Tratamento 4 - água destilado estéril.

A porção de estaca em contato com os líquidos dos tratamentos foi fechada com algodão estéril ainda em condições assépticas.

As estacas permaneceram, durante todo o período do teste, em todos os tratamentos, submetidas à ventilação constante em condições não mais assépticas.

4. Utilização de filtrado de cultura de *A. solani* como pressão de seleção (Regeneração de plantas em presença do filtrado)

Neste tópico estudou-se o efeito *in vitro* do filtrado (exsudato) de *Alternaria solani*. Foram estudados isolados da Fazenda Santa Eliza (IAC - Campinas), denominado *A. solani* Santa Eliza e da cidade de Mococa (isolado Mococa).

A seguir descreveremos a metodologia de cada experimento separadamente.

4.1. 1º EXPERIMENTO - Isolado Santa Eliza

Investigação do efeito do calor e de diluição do filtrado em testes in vitro. Fungo cultivado em meio líquido natural (natureza química não determinada).

Utilizou-se meio líquido V8 (usa-se 20 ml de suco de legumes V8 comercial em 200 ml de água destilada) para inoculação de *Alternaria solani* (STAVELY, 1979). Áreas de micélios de tamanho padronizado (0,77 cm^2) e contendo o fungo em desenvolvimento foram inoculados em meio líquido V8 mencionado, em condições estéreis.

Após dezenove dias filtrou-se o meio líquido primeiramente em papel de filtro comum, sob vácuo para eliminação de partículas maiores presentes no meio líquido. Posteriormente, foi submetido à centrifugação por 15 minutos a 3.000 rpm.

O sobrenadante foi colhido em béquer, sendo então esterilizado por meio de filtro de membrana (0,4 micra). Para maior rapidez no processo de filtragem foi adaptado ao kitassato um sistema de pressão negativa. O filtrado, agora estéril, foi coletado em recipiente igualmente estéril e conservado à baixa temperatura.

Este filtrado foi então utilizado para seleção de plantas resistentes, através de diluições, em meio MS.

Foram feitos 2 tratamentos, cada um com várias diluições descritas a seguir:

Tratamento 1 - Filtrado de cultura esterilizado em membrana Millipore de 0,4 micras.

IA - 50% de filtrado (v/v)

IB - 25% de filtrado (v/v)

IC - 10% de filtrado (v/v)

ID - controle V8 - 50% de diluição do suco de legumes (v/v)

Tratamento 2 - Filtrado de cultura esterilizado em autoclave (120°C por 20 minutos a 1 atmosfera de pressão).

2A – 100% de filtrado (sem diluição)

2B – 50% de filtrado (v/v)

2C – controle V8 – 50% de diluição de suco de legumes (v/v)

2D – controle (meio MS utilizado em cultura primária)

Cumpre salientar que em ambos os tratamentos utilizou-se os fitorreguladores AIA (25 μM/l) e 6-BA (10 μM/l).

As plantas regeneradas foram testadas "in vivo" para confirmação de resistência, bem como as respectivas progênies. Este trabalho foi baseado em GILCHRIST & GROCAN (1976) e BENKE (1979).

Os explantes iniciais inoculados foram explantes recém - excisados e calos originados também de folha definitiva. Células vegetais cultivadas não têm sido muito usadas em estudos de toxicidade. Entretanto, apresentam muitos usos potenciais no estudo de compostos tóxicos: 1) oferecem um sistema axênico no qual quase todas as células são metabolicamente ativas; 2) podem ser usadas como rápida microteste para determinações fitotóxicas; 3) constituem-se num sistema homogêneo livre de cutícula e 4) não necessitam de muito transporte intercelular (ZILKAH & GRESSEL, 1977).

4.2.- 2º EXPERIMENTO - Investigação do efeito de esterilização e de auxina em testes in vitro. Fungo cultivado em meio sintético de natureza química conhecida (isolado Mococa).

Após 21 dias da inoculação do micélio em meio líquido de Czapek-Dox modificado, as culturas do fungo passaram primeiramente por filtragem simples com algodão comum. Depois, um papel de filtro em kitassato e bomba a vácuo. Desprezou-se o precipitado formado no

papel, obtendo-se um líquido límpido, com o pH acertado para 5,5.

Os testes in vitro sempre foram feitos com os filtrados de cultura de fungos. O filtrado de cultura obtido, como descrito foi utilizado nos experimentos 2 e 3.

No experimento nº 2, foram feitos 3 tratamentos completado com 50% do meio MS diluído na metade tanto nos micro como nos macronutrientes, com exceção de $FeSO_4$. EDTA que foi mantido na concentração normal do meio MS. Os 3 tratamentos são descritos a seguir:

Tratamento I - Filtrado de cultura esterilizado em membranas de Millipore na ordem de 8; 0,8 ; 0,45 e 0,22 micras.

To-A/I/a - 50% de filtrado (v/v), + 10 µM/l de 6-BA e 25 µM/l de AIA.

To-A/I/b - 50% de filtrado (v/v), 10 µM/l de 6-BA.

Tratamento II - Filtrado de cultura esterilizado em autoclave (120°C por 20 minutos).

To-A/II/a - 50% de filtrado (v/v) + 10 µM/l de 6-BA e 25 µM/l de AIA.

To-A/II/b - 50% de filtrado (v/v), 10 µM/l de 6-BA.

Tratamento III - Controle - meio MS sem filtrado de cultura de *A. solani*. Esterilizado em autoclave (120°C por 20 minutos).

To-A/III/a - meio MS + 10 µM/l de 6-BA e 25 µM/l de AIA

ToA/III/b - meio MS + 10 µM/l de 6-BA.

4.3. 3º EXPERIMENTO

Investigação dos efeitos das diluições da composição salina do meio de cultura e do filtrado de altura em testes in vitro. Esterilização com calor. Fungo cultivado em meio sintético de natureza química conhecida (Isolado Mococa).

O filtrado de cultura foi obtido com descrito no experimento nº 2. Neste caso e em todas as filtrações posteriores utilizou-se tanto vidraria como algodão previamente esterilizado.

Neste 3º experimento foram feitos 6 tratamentos e em todos estes, a concentração salina do meio MS foi diluída a 1/4 da concentração normal.

To-A/II/1 - 75% de filtrado (v/v) + 25% de meio MS diluído (v/v)

To-A/II/2 - 50% de filtrado (v/v) + 50% de meio MS diluíco (v/v)

To-A/II/3 - 25% de filtrado (v/v) + 75% de meio MS diluído (v/v)

To-A/II/4 - 75% de meio Czapek-Dox (v/v) + 25% de meio MS diluído (v/v)

To-A/II/5 - 50% de meio Czapek-Dox (v/v) + 50% de meio MS diluído (v/v)

TO-A/II/6 - 25% de meio Czapek-Dox (v/v) + 75% de meio MS diluído (v/v)

Em todos os tratamentos utilizou-se os fitorreguladores AIA (25 µM/l) e 6-BA (10 µM/l). O pH foi ajustado para 5,5. Neste como em todos os experimentos e testes utilizados *in vitro* os calos utilizados como explantes iniciais foram cultivados no escuro contínuo antes de serem testados para pré-seleção, e, imediatamente antes de serem colocados para cultivo em meio de pressão de seleção (meio MS + filtrado de cultura do fungo + fitorreguladores + ágar), estes calos foram mergulhados em câmara asséptica por 1-2 minutos nos filtrados correspondentes aos tratamentos que permaneceram em contacto, durante todo o período dos experimentos e ensaios *in vitro*, posteriormente, em cultura sólida.

No 3º tratamento, os explantes foram inoculados, ao acaso, como se segue:

Condições de cultivo		Idade dos calos (dias)	Nº de duplicatas por tratamento	Total por explante
Plântula crescida assepticamente	cotilédone	0	3	$\Sigma x = 3$
	folhas definitivas	25 - 37	32	
	folhas definitivas	66	3	
	folhas definitivas	83	41	$\Sigma x = 76$
	caule	83	5	$\Sigma x = 5$
planta crescida em estufa	utilizou-se apenas folha	0	1	2
		25 - 28	1	$\Sigma x = 2$

Sigla do experimento	Material vegetal		Nº de inoculados por tratamento C	F	H	D	Total (Σx)
A=Si-92/1	Petomech 5319004	original	-	3	-	-	3
B=Si-92/2	Petomech 5319006	original	-	17	4	-	21
B=Si-92/3	Petomech 5319006	original	-	4	-	-	4
B=Si-92/5	Petomech 5319006	original	-	5	1	-	6
C=Si-92/6	Joaquim	original	-	39	-	-	39
C=Si-95	Petomech 5319994	multiplicado	-	5	-	-	5
C=Si-96/1	Petomech 5319004	original	-	3	-	-	3
C=Si-119	Petomech 5319004	original	3	-	-	-	3
C=Si-120	Petomech 5319004	multiplicado	-	-	-	1	1
C=Si-125	Petomech 5319004	multiplicado	-	-	-	1	1
Total por explante			3	76	5	2	
Total Geral							86

C = cotilédone

F = folha definitiva

H = caule

D = folha de estufa

.4. 4º EXPERIMENTO - Investigação dos efeitos do período de permanência de fungo em meio líquido e do tipo de explante inicial. Esterilização com calor. Fungo cultivado em meio líquido de natureza química conhecida. Isolado Santa Eliza.

O fungo foi isolado de lesões localizadas no caule do tomateiro em 10/03/82. O fungo foi mantido por 20 dias em meio sólido como descrito anteriormente (ver item 3.1.2).

O crescimento desta colônia do fungo em meio sólido bem como o resultado positivo do teste de patogenicidade do isolado de fungo, nas condições descritas, são mostrados na Fig. 25

A colônia mostrada na figura foi, então, inoculada em meio líquido sintético Czapek-Dox (ver item 3.3.2). Foi feito o teste de patogenicidade do líquido sintético de cultivo de fungo com resultado negativo, isto é, o meio em si não apresentou fitotoxicidade.

Foram retiradas amostras independentes de 2 períodos de permanência do fungo em meio líquido sintético: após 33 e 60 dias de inoculação das áreas padronizadas de micélio.

Estes filtrados foram obtidos como descrito para o 2º e 3º experimentos e utilizados em meio de cultura, diluição 75% v/v acrescido de fitorreguladores (AIA 25 μM e 6-BA 10μM). Os meios de cultura com os filtrados de 33 a 60 dias foram autoclavados como descrito nos experimentos 2 e 3. O controle constitui-se no meio MS utilizado em cultura primária sem filtrado de fungo.

Foram utilizados os seguintes explantes iniciais, conforme o tratamento:

A) Meio de cultura com o filtrado de 33 dias.

Tratamento 1:

Calo de 14 dias de idade, obtido a partir de folha de estufa.

B) Meio de cultura com o filtrado de 60 dias.

Tratamento 2:

Calo de 21 dias de idade, obtido a partir de folha de estufa.

Tratamento 3:

Recém-inoculado, obtido a partir de folha de estufa.

As condições de cultivo foram: fotoperíodo de 16 horas, e temperatura de 25 $\pm$ 3°C. A luz artificial foi obtida com 4 lâmpadas fluorescentes (luz do dia 30 w).

Foi feita avaliação do crescimento de calo, em todos os tratamentos , após 15 dias de inoculação.

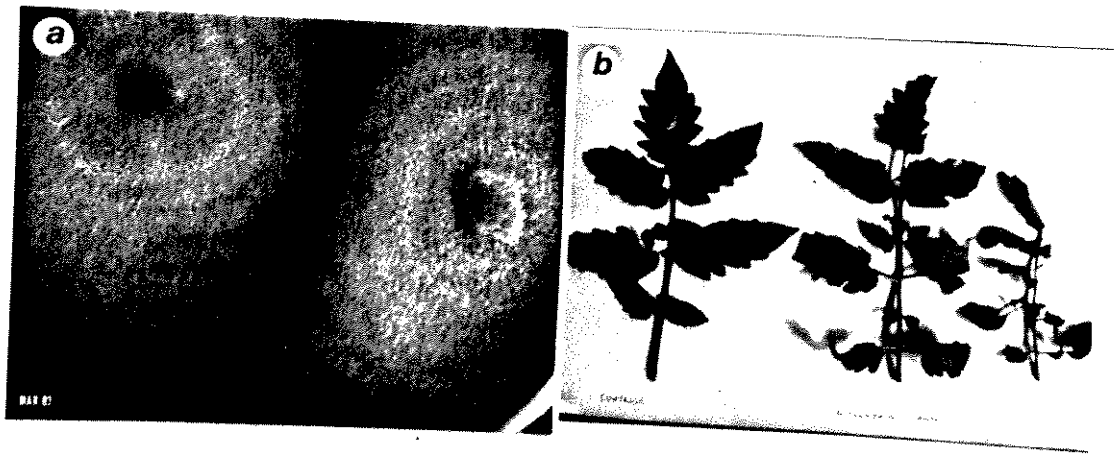
Observou-se o crescimento de calo, bem como regeneração em períodos mais longos após inoculação: Tratamento 1: 45, 60 e 92 dias; Tratamento 2: 60 dias; Tratamento 3: 34 e 94 dias. Regeneração só foi observada no Tratamento 1 após 45 dias da inoculação (meio com filtrado e controle) e no Tratamento 3 após 34 dias das inoculações (apenas no meio controle).

FIGURA 25

Comprovação da patogenicidade do isolado Santa Eliza utilizado como inóculo para obtenção de filtrados de cultura. Estes filtrados foram empregados em cultivo *in vitro* (4º experimento).

a) Aspecto da área micelial do fungo mostrando os círculos concêntricos típicos de crescimento de *A. solani*.

b) Visualização da patogenicidade do isolado do fungo através do aspecto dos folíolos de tomate após a inoculação com o isolado (folíolos apresentam manchas necróticas e clorose). Estes sintomas foram observados nos folíolos inoculados , mas não nos folíolos controle (à esquerda). A visualização da patogenicidade se refere ao isolado do fungo, cujo crescimento é mostrado em a).



4.5. Regeneração em presença de vários filtrados de cultura obtidos do isolado Santa Eliza de *A. Solani*

Neste item foi verificada a presença de regeneração em cultura de tecidos (tomate) com pressão de seleção. Os meios de culturas de pré-seleção, como um todo (100%) constaram de: parte de filtrados de culturas do fungo, isolado Santa Eliza, de várias idades e em várias diluições, e parte complementar do meio primário padrão To- M_3 (ver item 1.3.3.3), com diluição de 1/4 da composição salina do meio MS.

4.6. Condições de cultivo durante o período de pressão de seleção

Todos os ensaios com pressão de seleção foram mantidos em sala de cultivo por um período mínimo de 15 dias. Nesta sala as condições de luz foram: fotoperíodo de 16 horas; sendo que a luz artificial foi fornecida por 4 lâmpadas fluorescentes (luz do dia 30w). A temperatura, na sala, foi de $25 \pm 3^{o}C$. Após o período de 15 dias de permanência nas condições descritas foi feita a avaliação de crescimento de calos. Alguns ensaios permaneceram constantemente nesta sala de cultivo (experimentos nºs 1, 2, 3 e 4), enquanto outros ensaios foram transferidos, após o período de 15 dias, para condições de estufa (ver item 1.3.3.4).

5. Testes de resistência em plantas de geração R_0 e R_1

Os testes de resistência foram realizados em condições de laboratório.

Os tipos de teste de resistência realizados com plantas R_0 e R_1 estão descritos em SCHEFFER, 1976 e RUSSEL, 1978. As respostas dos testes foram avaliadas através de uma escala semi-quantitativa de notas, variável de 1-5. Esta escala de notas foi escolhida por 2 razões: a primeira, de ordem estatística, por apresentar um centro de distribuição; e a segunda por ser citada na literatura como escala de resistência aos fungos tanto para espécies em geral, como Seringueira (BERGAMIN FILHO & CARDOSO, 1980); beterraba açucareira (BRANCÃO et al, 1984), como também, para tomate em trabalhos de campo em relação a Pinta-preta (BARKSDALE & STONER, 1973) e septariose (MALUF et al 1985).

As sementes de plantas R_1 foram tratadas com os fungicidas ROVRAL marca comercial de RHODIA S/A para o composto de isopropilcarbomoil-1 (dicloro - 3-5 fenil) 3 - hidantoina.

5.1. Esquema do material vegetal testado para resistência ao filtrado de cultura do fungo

As plantas regeneradas (R) foram agrupadas conforme a composição do meio de cultura ao qual os explantes foram submetidos (*presença de pressão de seleção* - utilização do filtrado de cultura; *ausência de pressão de seleção* - variação somaclonal). Cada planta regenerada, independente do meio de cultura empregado, recebeu uma sigla individual, tanto na geração R_0 como na geração R_1. Estas plantas foram, então, submetidas a testes de resistência *in vivo* (método de estacas em geração R_0 e métodos de discos e folíolos para geração R_1). Estes testes foram feitos concomitantemente com plantas S , plantas obtidas diretamente de sementes (sem interferência da técnica de cultura de tecidos).

5.2. Testes de resistência das plantas de geração R_0

Para o teste de resistência de plantas da geração R_0 foi utilizado o método do fluxo de transpiração em estacas de tomateiro, descrito pormenorizadamente no ítem 3.5. de Métodos.

A correlação entre o emprego deste teste nas plantas de geração R_0 com a obtenção destas plantas é mostrada na FIGURA 26; esquematicamente, desde a fase de obtenção do explante até a visualização de resistência/suscetibilidade em presença de filtrados de cultura comprovadamente tóxicos. SCHEFFER(1976) frisa que, embora, fitotoxinas não específicas sejam, geralmente, ensaiadas com estacas que absorvem as soluções teste pelo fluxo de transpiração, os ensaios de estacas são, algumas vezes, utilizados para toxinas específicas ao hospedeiro.

5.3. Testes de resistência de plantas de geração R_1

Os testes de resistência foram feitos em plantas de geração R_1 para se verificar se as características de resistência/suscetibilidade observadas nas plantas da geração R_0 são características estáveis, incorporadas ao genótipo.

As várias etapas desenvolvidas desde a obtenção das sementes das plantas de geração R_0 até a sintomatologia de suscetibilidade ou não observada nos testes de fitotoxicidade dos folíolos e discos, são mostradas na FIGURA 27. As etapas a, b, c mostradas nesta figura se referem a obtenção de sementes de plantas regeneradas, etapas que foram feitas como descrito no item de Resultados e Discussão (item 1.2.3). As sementes após terem sido tratadas com fungicida foram semeadas em solo previamente tratado e adubado em fileiras, com 3 replicatas, em disposição

aleatórica, em canteiro móvel plantágil modelo CM 128-120, canteiro fabricado pela CIRAGRO. Estes canteiros foram mantidos em ripado. Os vários tipos de procedência do material vegetal foram colocados, ao acaso, nos canteiros móveis (FIGURA 27d). Nestas condições, as plantas de geração R_1 cresceram por cerca de 30 dias, quando, foram retiradas as folhas que foram usados para os testes, de folíolos e de discos (FIGURA 27e).

5.3.1. Teste de folíolos

Folíolos foram separados de folhas uniformes, coletadas na mesma região das plantas. Este folíolos foram, então, testados em testes de fitotoxicidade após serem lavados profusamente.

Os folíolos inteiros, com a superfície inferior voltada para cima, foram colocados em câmera asséptica sobre uma tela metálica de malhas finas, tela esta colocada dentro de uma caixa de polietileno (tamanho 48 x 64 x 10cm), contendo no fundo água destilada esterilizada, a qual não chegou a tocar a tela. Os folíolos foram pincelados com as soluções dos filtrados testes comprovadamente fitotóxicos, em 4 concentrações, a saber: *sem diluição* - 100% e *com diluição* de 75; 50; 25% v/v. Ao mesmo tempo, foram feitos 2 outros tratamentos: meio de cultivo do fungo(Czapek-Dox) não metabolizado, não diluído (controle) e H_2O destilada (FIGURA 27g). Tanto as soluções do filtrado como o controle e H_2O destilada receberam 3 gotas de TWEEN (20%) e foram esterilizados por autoclavagem. Foram utilizados filtrados de 30 e 45 dias de cultura do fungo, que foram pincelados com 2 pincéis distintos. Dentro do filtrado de cultura de determinada idade a pincelagem iniciou-se sempre com a água destilada estéril, con-

trole, e da menor concentração do filtrado (25% v/v) para maior (100%), lavando-se cuidadosamente o pincel correspondente ao período da cultura do fungo considerado, a cada tratamento. Evitou-se, ao máximo, a interferência de uma concentração por outra e de um determinado período de cultura do fungo por outro. Todo esse processo de montagem do teste foi feito em câmara asséptica (FIGURA 27g) e os materiais permaneceram em condições controladas de temperatura ($19^{+}_{-}2$°C).

Após 3 e 5 dias da montagem do teste foi observada a sintomatologia, principalmente o sintoma de necrose (FIGURA 27h) A anotação da necrose foi feita em relação a área do folíolo que apresentou este sintoma. Nestas leituras, foi dada nota pela área necrosada, de cada folíolo individualmente, em escala de 1-5 conforme as áreas crescentes de necrose. A cada classe de nota correspondeu uma classe de resistência, numa escala de 1-5, segundo RIBEIRO, 1984:

CLASSE DE NOTA	CLASSE DE RESISTÊNCIA
1 - sem necrose	IMUNE
2 - 1/4 do folíolo com área necrosada	RESISTENTE
3 - 1/2 do folíolo com área necrosada	INTERMEDIÁRIA
4 - 3/4 do folíolo com área necrosada	SUSCETÍVEL
5 - folíolo completamente necrosado	MUITO SUSCETÍVEL

Como foi dito as notas foram dadas aos folíolos individuais, extraindo-se depois as médias por tratamentos. Os dados foram analisados estatisticamente através da análise da variância.

Ensaios de folhas foram desenvolvidos para toxinas es

pecíficas no hospedeiro, conforme relatado por SCHEFFER, 1976: de *A. kikuchiana* (AK), de *H. sacchari* e de *H. carbonum* (HC) geralmente por punções. Para *A solani* foram feitos testes de folíolos, em relação a plantas de tomate: com pedaços de micélio de fungo - (WELLMAN, 1943); e com filtrados de cultura do fungo, em punções (MATERN et al 1978).

5.3.2. Teste de discos de folhas

Partes destacadas de plantas tem sido usadas para se determinar resistência a patógenos vegetais (YARWOOD apud ESKES, 1982). COSTA et al (1978) verificaram que discos foliares são mais facilmente mantidos em bom estado que folhas destacadas inteiras, em relação aos testes de resistência a ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk et Br. no cafeeiro. Os estudos de resistência de vários genótipos do cafeeiro ao fungo mostraram a excelência do método de discos de folhas: 1) é promissor; 2) é preciso; 3) serve para vários cultivares e 4) é satisfatório para resistência completa e incompleta (ESKES, 1977; 1978; 1982 ; 1983; ESKES & TOMA-BRAGHINI, 1981a; 1981b).

Toda a operação de retirada dos discos das folhas (no caso, folíolos) como a montagem dos testes foi feita em câmara de fluxo laminar. Na fase de retirada de discos, utilizou-se de rolha esterilizado (Ø1,50cm). Foram retiradas áreas de tamanho padronizado do limbo foliar, aleatoriamente, inclusive da região das nervuras, de vários folíolos de um mesmo material vegetal - (plantas S ou R), ao acaso (FIGURA 27h). Após a excisão destas áreas foliares em forma de círculos (discos), cada disco foi enxugado cuidadosamente em papel estéril para retirada do filme d'água existente, para evitar-se proliferação de bactérias. A montagem

dos testes dos discos foi a mesma e simultânea a dos testes de folíolos (ver item anterior 5.3.1.). Em ambos os casos, cada conjunto de tratamentos em discos e folíolos correspondeu a um determinado material vegetal. Por tratamento utilizar-se 6 discos foliares, mesmo número utilizado para os folíolos. Em cada caixa de plástico (ver FIGURA 27g; h) foram colocados 2 materiais vegetais a serem testados, ao acaso. Cada material vegetal teve 2-3 replicatas, ou seja, 2-3 caixas separadas, pois, utilizou-se para determinado material vegetal todos os tratamentos mencionados (ver FIGURA 27g - concentração do filtrado). Tanto no teste de folíolos, como no teste de discos foliares após a montagem, as caixas foram fechadas por placas finas de vidro transparente. A manutenção do material vegetal testado foi, assim, em câmara úmida, em condições controladas de temperatura ($19 \pm 2^{o}C$).

Foram feitos 3 testes de resistência *in vivo*, não simultâneos, nas plantas de geração R_1:

MONTAGEM	DATA	TESTE REALIZADO
1a. montagem	30/10/1984	discos de folhas
2a. montagem	06/12/1984	discos e folíolos inteiros
3a. montagem	11/12/1984	discos de folhas

ESKES (1982) verificou que a estação do ano em que se realiza o teste de discos em cafeeiro afeta o resultado de 2 maneiras:

1) pelo estádio de crescimento das plantas doadoras; no caso do cafeeiro, o autor sugere que os testes de discos de folhas devem ser feitos de outubro até abril, quando as plantas do cafeeiro estão ativamente em crescimento. Discos foliares retirados de plantas de outra época do ano senescem mais rapidamente.

2) no próprio teste, mesmo quando este é mantido sob condições controladas de temperatura. Assim, a resposta dos discos de cafeeiro ao inóculo do fungo é mais demorado no inverno do que no verão, mesmo em condições controladas de incubação do teste (no caso do café, temperatura constante de $22\pm2^{o}C$). Esta diferença de resposta ao teste, no caso do café, é de cerca de 30 dias.

No presente trabalho, a leitura de cada montagem de teste de plantas da geração R_1 (teste de folíolos e teste de 6 folíolos), foi feita como descrito para o teste dos folíolos (ver ítem anterior 5.3.1.) para cada disco ou folíolo, individualmente. Também para os testes de discos de folhas os dados foram analisados estatisticamente através da análise da variância.

5.3.3. Teste de germinação e crescimento de plântulas

As sementes foram colocadas em placas de Petri de ø 9cm, com 2 camadas de papel filtro e 5 ml por placa de:

a) filtrado na concentração de 100%

b) filtrado na concentração de 75% v/v

c) filtrado na concentração de 50% v/v

d) filtrado na concentração de 25% v/v

e) meio de cultivo do fungo, não metabolizado - 100% CONTROLE

f) H_2O destilada

Todos os tratamentos foram esterilizados por autoclavagem. Foram utilizadas 3 replicatas por tratamento. Foram colocadas 50 sementes por placa. Foram utilizados 2 tipos de materiais vegetais:

1) sementes de tomate "Petomech" (C + D)

2) sementes (aquênios) de alface (*Lactuca sativa* L.) cv. Grand Rapids

As placas permaneceram sobre um fundo de papel de filtro umedecido com água estéril dentro de uma caixa plástica, que foi coberta com lâmina de vidro, para se manter uma câmara úmida. As placas foram mantidas em sala controlada de cultivo (ver MÉTODOS item 1.3.3.4.): fotoperíodo de 16 horas, luz artificial obtida por uma mistura de 2 lâmpadas incandescentes de 60 e 100 watts e 1 lâmpada fluorescente luz do dia de 20 watt e com intensidade luminosa, conforme a distância de fonte luminosa de 160 a 620 $\mu w.cm^{-2}$.

Germinações foi considerada pela protrusão de radícula. Após 5-7 dias de germinação foi anotado o comprimento tanto da radícula como do hipocótilo, em todos os tratamentos, tanto para tomate como para alface.

A metodologia se baseou em estudos: de germinação e crescimento de plântulas de aveia (LUKE & WHEELER, 1955); com sementes de cevada em relação aos filtrados de cultura de *H. sativum* P.K. & B (DUTRECQ, 1977); correlação entre atividade do preparado de toxina *Periconia circinata* (Mangin) Secc., a toxina específica PC, com a inibição de crescimento de radícula e crescimento de plântula em bioensaio com sorgo de grão (WOLPERT & DUNKLE, 1983) e germinação com filtrados de *Phoma lingam*, a forma imperfeita do ascomiceto *Leptosphaeria masculans* (Desm.) Ces et De Not, agente causal de doenças de crucíferas. Este último trabalho utilizou também a técnica de cultura de tecidos, no caso haplóides de *Brassica napus* L. para pré-seleção *in vitro* (SÃ CRISTAN, 1982; 1985).

LEGENDA (FIGURA 26)

TESTE DE RESISTÊNCIA *in vivo* EM PLANTAS R_0

a. inoculação do explante em meio primário ($To-M_3$)

b. regeneração em cultura primária ($To-M_3$)

c. enraizamento em cultura secundária

d. aclimatação em vermeculita

e. transferência para solo (campo)

f. frutificação no solo (campo)

g. estaca recém-cortada colocada no filtrado de cultura do fungo autoclavado não diluído (100%). Montagem em câmara asséptica, frascos contendo filtrados autoclavados e estacas foram fechados com algodão autoclavado.

h. sintomatologia da estaca após 24 h de permanência no filtrado não diluído (100%) sob condições de ventilação constante e temperatura do ambiente ($25 \pm 4^{o}C$).

FIGURA 26

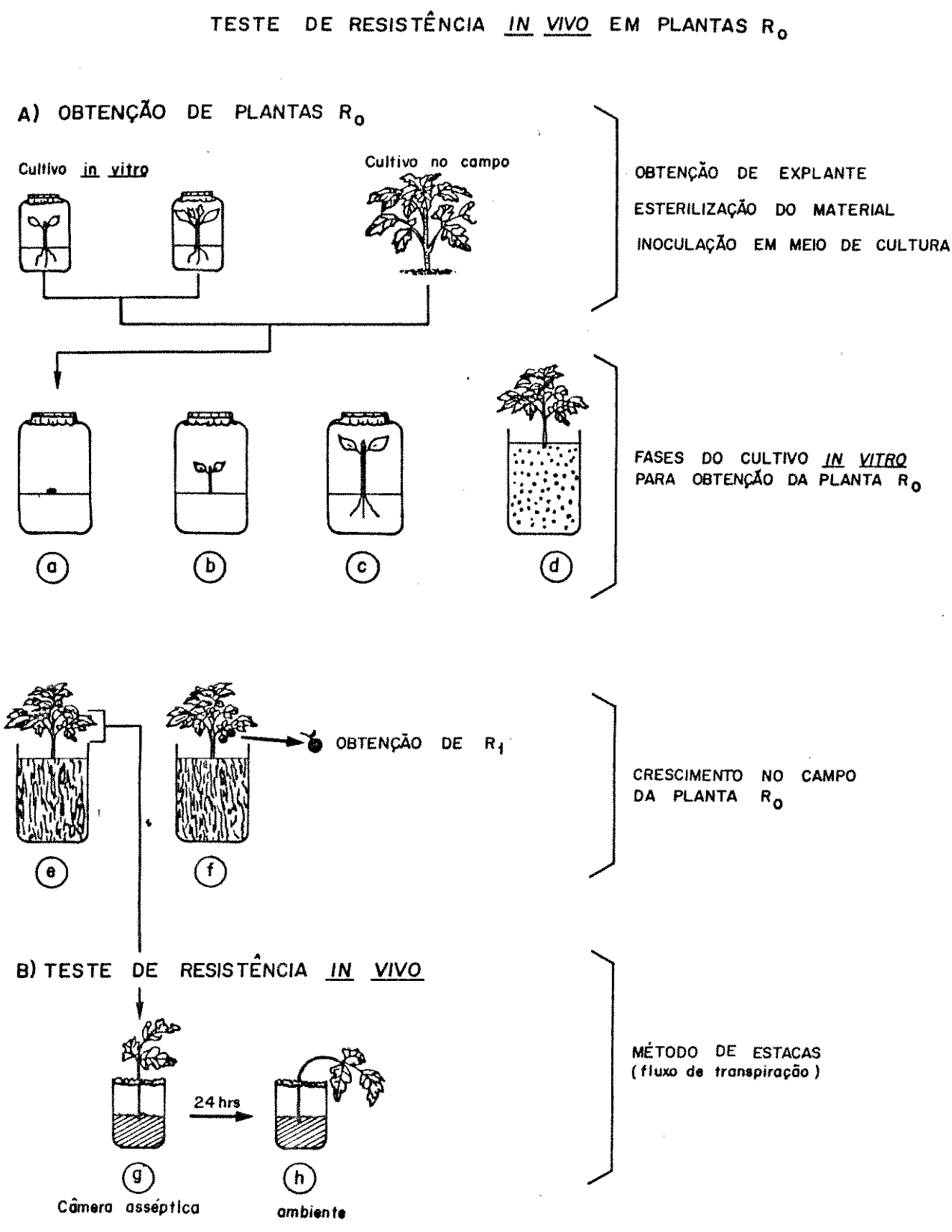


FIGURA 26. Apresentação esquemática do teste de resistência *in vivo* em plantas R_0 (método de estas-fluxo de transpiração) e das fases anteriores envolvidas para obtenção das plantas R_0, tanto no laboratório como no campo.

FIGURA 27 - Apresentação esquemática dos testes de resistência *in vivo* das plantas R_1 (Método de folíolos e discos) e das fases anteriores para obtenção das plantas R_1.

TESTE DE RESISTÊNCIA in vivo EM PLANTAS R_1

a. Fruto de planta R_0

b. Sementes R_1 retiradas do fruto da planta R_0 e colocadas para fermentar

c. Sementes R_1 após lavagem profusa colocada para secar em peneira

d. Folhas de plantas R_1 crescendo em solo em

   S = plantas provindas de sementes

   B = plantas R_1 provindas de planta R_0 regeneradas em presença do filtrado de cultura do fungo

   C = plantas R_1 provindas de planta R_0 regeneradas em presença do meio de crescimento do fungo, sem inoculação do fungo

   D = plantas R_1 provindas de plantas regeneradas pelo método de cultura de tecidos (variação somaclonal)

e. Aspecto da planta quando da retirada do material a ser testado

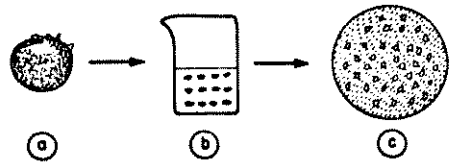
f. Obtenção dos discos, sob condições asspéticos, de tamanho padronizado

g. Montagem do teste de filtrado autoclavado em várias concentrações e 2 períodos de crescimento do fungo em folíolos e discos. Foram testadas as plantas R_1 descritas no item (d). A montagem foi feita em câmara asséptica. Os folíolos e discos pincelados com os filtrados foram mantidos em ambiente úmido à temperatura controlada ($19 \pm 2^{o}C$).

h. Sintomatologia observada nos folíolos e discos tratados com os filtrados testados. A classe de necrose foi dada uma determinada nota (1-5) correspondente a classes crescentes de área de necrose.

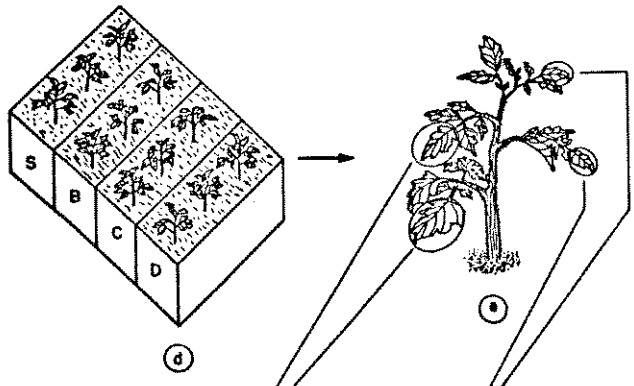
TESTE DE RESISTÊNCIA *IN VIVO* EM PLANTAS R_1

A) OBTENÇÃO DE SEMENTES R_1



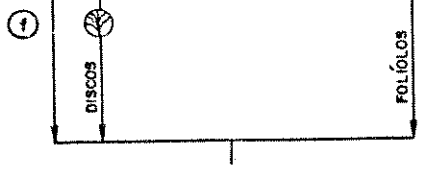
RETIRADA DAS SEMENTES

B) GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E OBTENÇÃO DAS PLANTAS TESTE



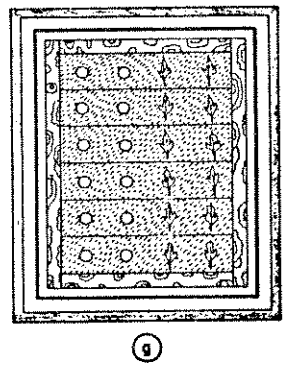
PLÂNTULAS R_1 NO RIPADO

OBTENÇÃO DE MATERIAL A SER TESTADO



RETIRADA DOS DISCOS (CÂMARA ASSÉPTICA)

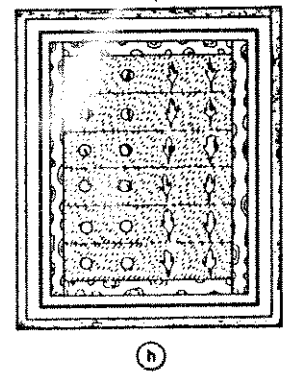
C) MONTAGEM DO TESTE DE RESISTÊNCIA *IN VIVO* (MÉTODO DE FOLÍOLOS E DISCOS)



CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (% V/V)
100
75
50
25
CONTROLE
H_2O

MONTAGEM DO TESTE DO FILTRADO EM CÂMARA ASSÉPTICA (filtrado colocado com pincel na superfície do material)

LEITURA APÓS 3-5 DIAS



SINTOMATOLOGIA DO EFEITO DO FILTRADO EM DISCOS E FOLÍOLOS

6. Análise estatística dos dados obtidos

As comparações múltiplas entre os tratamentos foram feitos por meio de análise da variância, usando-se o pacote estatístico MINITAB, versão 81, implantado no computador DIGITAL-PDP 10 da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Em um dos experimentos de pressão de seleção (1º experimento - ver RESULTADOS E DISCUSSÃO - item 4 - TABELA 43) as comparações foram feitas através de um teste t de Student, teste este feito com correção de Welch para os graus de liberdade, segundo BICKEL & DOKSUM, 1977, devido a distribuição desigual das variâncias.

No caso dos testes de resistência *in vivo* realizados nas plantas da geração R_1 foram feitos, pelo mesmo pacote estatístico, além dos testes de significância (F) os intervalos de confiança ao nível de 95%.

Todas estas análises foram efetuadas no Laboratório de Estatística Aplicada do Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação (IMECC) da UNICAMP sob a supervisão do Dr. José Antonio Cordeiro.

Nos testes de resistência, com discos de folhas, foram feitos também os contrastes de médias, quando os testes de significância (F) foram significativos. Estes contrastes foram feitos pelo teste de Scheffé, que é um teste de uso bem mais geral que os testes de Tukey e Duncan e permite julgar qualquer contraste, fazer *todas as comparações possíveis* (PIMENTEL GOMES, 1976; BOX et al. 1978).

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Estabelecimento da Metodologia para obtenção de plantas de tomate a partir de cultura de tecidos.

1.1. Origem da fonte de explante

1.1.1. Esterilização de folhas de plantas adultas

Experimentos preliminares para esterilização de folhas de plantas adultas foram feitas, sem se usar a técnica da pré incubação. A comparação com experimentos com pré-incubação (Tabela 9) mostrou que esta técnica ajuda a conter a contaminação principalmente por fungo. A melhor esterilização obtida com esta técnica nos levou a adotá-la como rotina em todos os experimentos com folhas de plantas adultas crescidas em estufa.

1.1.2. Pré-tratamento e esterilização de sementes

Dos vários tratamentos a que foram submetidas as sementes (Tabela 10) observou-se que mais eficiente foi o tratamento de banho de água quente durante 30 minutos seguida da esterilização superficial com solução de hipoclorito de sódio 25% durante 30 minutos.

Apesar do tratamento com ácido acético 0,8% durante 24 horas seguidas de esterilização, por solução de hipoclorito de sódio 25% por 30 minutos ter se mostrado eficiente, aparentemente, o ácido acético inibe a germinação. Por esta razão, este tratamento deixou de ser utilizado. O tratamento de banho de água a 53°C, seguido de esterilização superficial por hipoclorito de sódio 25% por 30 minutos, que se mostrou eficiente e não afetou a germinação foi adotado como rotina para toda e qualquer obtenção de plântulas estéreis (fonte de explantes de cotilédone, folha definitiva, hipocótilo e caule). Pela Tabela 10 verifica-se os demais tratamentos utilizados apresentaram porcentagens de contaminação altas, tornando-se inviável o processo de obtenção de explantes , processo este mostrado no item MÉTODOS (Fig. 4).

Além da presença da bactéria do cancro nas sementes de tomateiro , nesta encontra-se também a presença do fungo

TABELA 9 - Resultado dos experimentos com folhas de plantas de tomateiro "Petomech" cultivadas em estufa. Os experimentos foram realizados com e sem pré-incubação (metodologia descrita no item 1.1.1.). Melhores resultados foram obtidos em experimentos com pré-incubação.

EXPERIMENTOS SEM PRÉ-INCUBAÇÃO		EXPERIMENTOS COM PRÉ-INCUBAÇÃO	
Nº do experimento	Contaminação %	Nº do experimento	Contaminação %
1	100,0	1	39,4
2	45,0	2	87,5
3	61,5	3	45,0
4	41,5	4	58,1
5	18,1	5	72,0
6	32,7	6	51,8
7	100,0	7	54,0
8	100,0		
9	100,0	Σx =	407,8
10	100,0	$\bar{x}$ =	58,3
11	100,0		
12	100,0		
13	55,2		
14	100,0		
15	100,0		
16	100,0		
17	100,0		
18	100,0		
19	100,0		
20	60,0		
Σx =	1614,0		
$\bar{x}$ =	87,7		

A. solani, disseminado como camada micelial sob o envoltório de sementes. O fungo pode injuriar uma grande porcentagem de caules , causando no tomate, o "foot-rot" nas plântulas (CHUPP & SHERF,1960

É interessante ressaltar que várias espécies do gênero *Alternaria* são disseminadas pela semente; *A. bressecale* (Berleley) Sccardo que ataca repolho, couve-flor; *A. brassicola* (Scheweinitz) Wiltshire que ataca outras brassicas e *A. dauci* (Kühn) Groves & Skolko que ataca a cenoura.

Sementes se constituem, inclusive, em um exemplo do ser humano como vetor de dispersão de patógenos. Estes se localizam - tanto como contaminantes internos ou contaminantes de superfici e externa. Como sementes de plantas cultivadas não são mais dispersadas naturalmente, mas sim sujeitas a um comércio internacional, entende-se como patógenas são impostas e se estabelecem em países nos quais as condições de desenvolvimento da doença podem ser até mais favoráveis que as do país de origem. Por exemplo, a semente de soja apresenta uma quantidade considerável de patógenos tanto internamente (13, localizando-se nos cotilédones) ou externamente na testa (21, incluindo fungos do gênero *Alternaria* e bactérias do gênero *Corynebacterium*) como é mostrada por DICKINSON & LUCAS (1982).

1.1.3. Germinação das sementes esterilizadas

A germinação de sementes em meio de cultura com macro e micro nutrientes e com fonte de energia mostrou-se bastante eficientes, pois a plântula apresentou-se mais vigorosa, podendo, então, fornecer diretamente explantes de folhas definitivas e caule em necessitar de um ciclo adicional de cultivo de submeristema.

Após 15 dias de germinação as plântulas estéreis foram utilizadas para cultura in vitro, com média 5 cm de altura conforme pode se ver : FIGURA 5 (ver MÉTODOS - item 1.2) . A porcentagem de germinação das sementes foi de 85-90%.

A cultura axênica de plântulas estéreis foi extremamente adequada, tendo sido utilizada também por KOBLITZ & KOBLITZ (1982) para obtenção de plantas de protoplastos do tomate comercial , bem como por HOMEDAN (1982) para propagação vegetativa do tomatei

ro in vitro.

1.2. Orgãos utilizados como explante: submeristemas

1.2.1. Meios Citados na Literatura

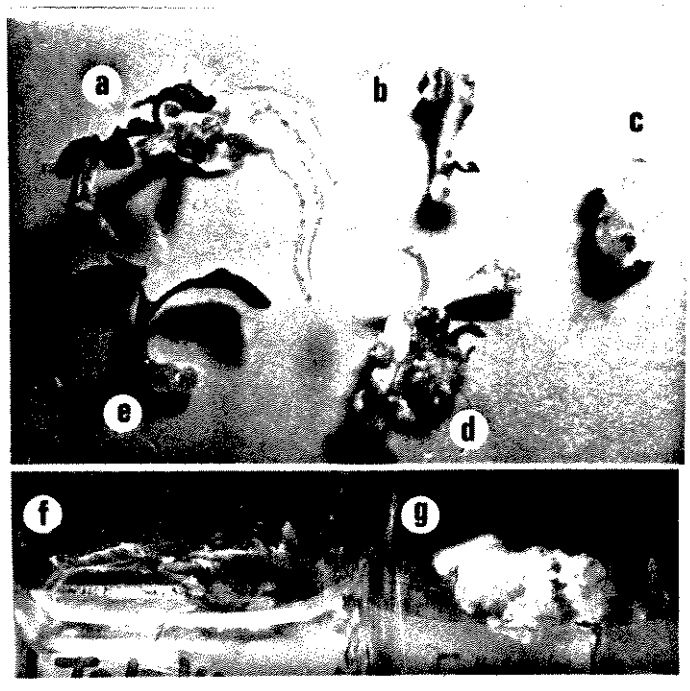
O crescimento de submeristemas, de ambos os cultivares foi melhor nos meios utilizados na literatura para *Lycopersicon esculentum* (ver Métodos, ítem 1.3.2.1). Com os meios desenvolvidos para outras espécies (alho, batata, mandioca) ou houve formação de raízes ou pequenos calos sem nenhum desenvolvimento do submeristema. Dos meios desenvolvidos para outra espécie o melhor resultado foi obtido com o meio de KARTHA et al., (1979) para meristemas de ervilha, o qual não contém auxina e apresenta baixa concentração de 6-BA (0,5µM). O desenvolvimento de submeristemas neste meio e nos meios específicos para plantas de tomate é mostrado na Fig.28.

Concentrações mais altas de auxinas empregadas (meio To/A MEREDITH a,b) resultaram em formação de calo (Fig.28a,b), ao invés do desenvolvimento do submeristema para formação de plântula. A concentração de citocinina 6-BA, neste caso, foi de 5,0µM. O gradiente de concentração de auxina utilizada (0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µM) no meio To/D (KARTHA et al., 1977)evidencia que quanto mais baixa foi a concentração de auxina (AIA) utilizada melhor foi o desenvolvimento do submeristema, tendo-se obtido desenvolvimento de plântula com AIA 0,1 µM, porém, sem formação de raízes (Fig.28f) em presença de 6-BA 10 µM. Houve o desenvolvimento do submeristema em plântula normal, inclusive com raízes (Fig.28g) na ausência de auxina e baixa concentração de 6-BA (0,5 µM), que foi o meio originalmente estabelecido para desenvolvimento de meristema de ervilha. Este tipo de resultados foi obtido nas 2 acessões testadas.

TABELA 10 - Efeito de pré-tratamentos conjugados à esterilização superficial de sementes de tomateiros de indústria ("Petomech") para eliminação de cancro bacteriano.

Tratamentos	Contaminação (%)
1. ácido acético 8% (24 horas) + hipoclorito de sódio 25% (30 minutos)	29
2. banho de água a 53°C (30 minutos) + hipoclorito de sódio 25% (30 minutos)	30
3. hipoclorito de sódio 10% (10 minutos) + banho de água a 53°C (30 minutos)	75

FIGURA 28 - Cultivo de submeristemas de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*. PI 367991) em dois meios de cultura descritos para tomate (To/A e To/D) e um meio descrito para meristema de ervilha. a) Ervilha (KARTHA et al., 1977); b) Tomate cv. Starfire com AIA 1,0 µM (To/D) KARTHA et al., 1977); c) Tomate cv. VFNT - Cherry (To/A) MEREDITH, 1978 a, b; d) Tomate cv. Starfire com AIA 1,0 µM (To/D); e) Tomate cv. Starfire com AIA 2,5 µM (To/D); f) Tomate cv. Starfire com AIA 5,0 M (To/D); g) Tomate cv. VFNT Cherry (To/A). Note-se que o meio (c) promove apenas proliferação de calos; nos meios (b, d, f) há um pequeno desenvolvimento, mas com proliferação de calo; no meio (c) se forma uma plântula com um intumecimento na parte distal, mas sem presença de raízes e o meio (a) descrito para uma leguminosa, permite um desenvolvimento normal de plantas de tomate. Documentação feita após 30 dias de cultivo.



1.2.2. Meio básico acrescido de combinação de fitorreguladores em experimento dialélico tipo Lattice 5x5.

Como o melhor desenvolvimento do submeristema se situa em baixas concentrações de auxina e citocinina(Fig.29) procurou-se a combinação hormonal (AIA x 6-BA) que resulte em melhor desenvolvimento do submeristema. Para tanto, testou-se para ambos os reguladores, as concentrações de 0,0; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,50 μM.

O esquema do desenvolvimento dos submeristemas nestas 25 combinações hormonais pode ser visto na Fig.29. O padrão de desenvolvimento do submeristema, para ambos os cultivares foi semelhante: a) houve enraizamento em ausência de citrocinina, plantas tiveram eixos principais mais longos; b) com AIA 0,5μM e principalmente 1,0 μM houve início de proliferação de calos; c) com a mais alta concentração de auxina testada (2,5 μM) em combinação com as 5 concentrações de 6-BA houve proliferação de calos em todas as combinações testadas com 6-BA, mesmo em ausência de citocinina; d) na ausência total de hormônios houve desenvolvimento do submeristema. O aspecto das plantas mostrado na Fig.29 se refere a 30 dias de cultivo.

Plantas podem ser obtidas de submeristemas inoculados em meio básico sem adição de fitormônios e este fato torna-se mais evidente com maior período de cultivo, por exemplo, 68 dias evidenciando assim que para o desenvolvimento de submeristema a 2 acessões testadas de *Lycopersicon esculentum* não há necessidade de aplicação exógena de fitorreguladores.

1.2.3. Obtenção de 2a.geração in vitro.

O submeristema pode originar in vitro uma única planta planta esta que tem o genótipo da planta-mãe (FIGURA 3- ver Ítem Métodos).

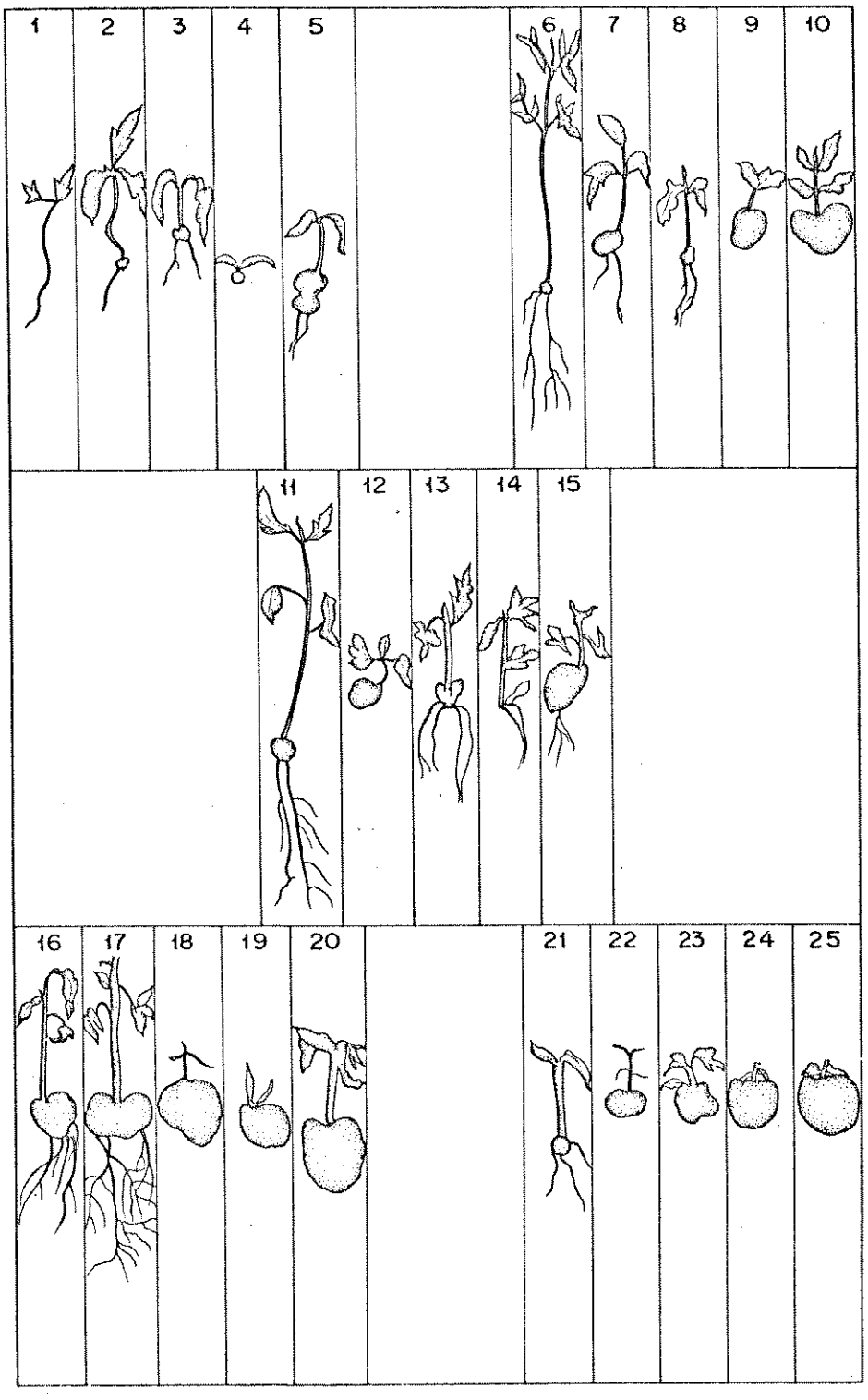
As plantas originadas in vitro a partir de submeristemas foram usadas: como fonte de explante (folha definitiva, hipocótilo, e caules estéreis crescidos em condições assépticas); para aumentar a disponibilidade de material vegetal in vitro sem necessitar de grande área de cultivo, nem estufa, obtendo-se além disso

FIGURA 29 - Cultivo de submeristemas plantas de tomate(*Lycopersicon esculentum* l) em combinação dialélila 5x5 de AIA e 6-BA. Cultivo em condições ambientais de luz e temperatura.Documentação após 30 dias de cultivo. Observe o desenvolvimento mais acentuado do submeristema nas condições de AIA até 0,50µM. AIA a partir de 0,25µM produziu proliferação de calos, principalmente com a concentração mais alta empregada (2.5 µM). Note que o enraizamento é mais acentuado, em todas as combinações de auxina, na ausência de citocinina e que vai progressivamente diminuindo com o aumento proporcional da citocinina até não se observar praticamente mais enraizamento nas mais altas concentrações de 6-BA empregada (1,00e 2,50 µM).

Número do tratamento se refere à combinação dos reguladores de crescimento, conforme o esquema abaixo:

Concentração de 6-BA (µM)	Concentração de AIA (µM)				
	0,00	0,25	0,50	1,00	2,50
0,00	1	6	11	16	21
0,25	2	7	12	17	22
0,50	3	8	13	18	23
1,00	4	9	14	19	23
2,50	5	10	15	20	25

FIGURA 29



material já estéril sem necessidade de esterilização; para o fornecimento de sementes das plantas originais, pois como já foi dito quando há a formação única de uma planta do submeristema esta é geneticamente igual a planta-mãe. A planta provinda de submeristema foi, então, progressivamente aclimatada (ver item 1.3.5), plantada no solo, transferida para estufa, onde floresceu e frutificou normalmente. As sementes foram então coletadas e serão usadas para iniciar novos ciclos, pois partimos de material estéril proveniente de plântulas estéreis obtidas após a esterilização de sementes. Esta técnica exige, pois, uma grande demanda de sementes que por meio de cultura in vitro (2a.geração) pode ser atendida.

As folhas definitivas da planta obtida in vitro tem o poder morfogenético igual ao do cotilédone (Fig.30) independente da posição destas no eixo principal, sem problemas de idade fisiológica (Fig. 30.2; 30.3; 30.4). Estas plantas regeneradas (Figura. 30.2) se desenvolvem perfeitamente originando novas plantas (Fig.30.5), aumentando o número de plantas originadas de um único explante (submeristema). É interessante ressaltar que no tomateiro, HOMEDAN (1982) verificou que plantas provindas de meristemas in vitro produziram estatisticamente mais folhas e flores do que plantas de sementes.

1.3. Cultivo in vitro (incluindo regeneração)

1.3.1. Coleta de sementes de plantas obtidas in vitro.

O procedimento para coleta de sementes foi feito tanto para as plantas obtidas diretamente de submeristemas, como para as plantas regeneradas a partir de explantes de folhas de estufa e/ou explantes de plântulas estéreis.

Os passos necessários para que as plantas obtidas in vitro possam fornecer sementes para continuar o ciclo são mostradas nas Figs. 31 (submeristema) e 32 (cotilédone e hipocótilo). Os passos desde que as plantas desenvolvidas sejam progressivamente aclimatadas e plantadas no solo são mostrados nesta figura (Fig.31a-d; 32a-d) bem como os passos de crescimento, floração e frutificação em estufa (Fig.32f-i; 32e-i). As plantas em estufa foram submetidas a amarrio e desbrotamento constante. Foi igualmente vigiada a instalação de pragas e pulverização com Manzanate-D foi feita sempre que necessário, para evitar proliferação de pragas. Este cuidado para evitar a instalação de pragas e moléstias pode ser visualizado inclusive nas manchas que os frutos apresentam (manchas que estão assinaladas na Fig.31i) e que são resultantes de pulverizações com pesticidas e fungicidas.

FIGURA 30 - Teste de regeneração de folhas originadas de uma única planta obtida *in vitro* a partir de submeristema (*Lycopersicon esculentum* material 2). Submeristema cultivado só em presença de 6-BA (2,60μM). Cada folha foi testada isoladamente, conforme a sua posição no eixo principal, testando-se os folíolos destas individualmente. O meio indutor utilizado foi AIA 20μM e 6-BA 10μM. O poder morfogenético das folhas foi comparado com o do cotilédone (Fig. 30.1). Documentação da regeneração do cotilédone e das folhas definitivas (Fig. 30.1-30.4) foi feita após 38 dias de cultivo e a documentação do crescimento de plantas regeneradas (Fig. 30.5) foi feita após 75 dias de cultivo. Em ambos os casos, o cultivo foi em condições ambientais de luz e temperatura.

1 = cotilédone estéril
2 = folha mais basal
3 = 2a. folha a partir da base
4 = 3a. folha a partir da base
5 = crescimento das plantas regeneradas a partir da folha mais a partir da folha mais basal.

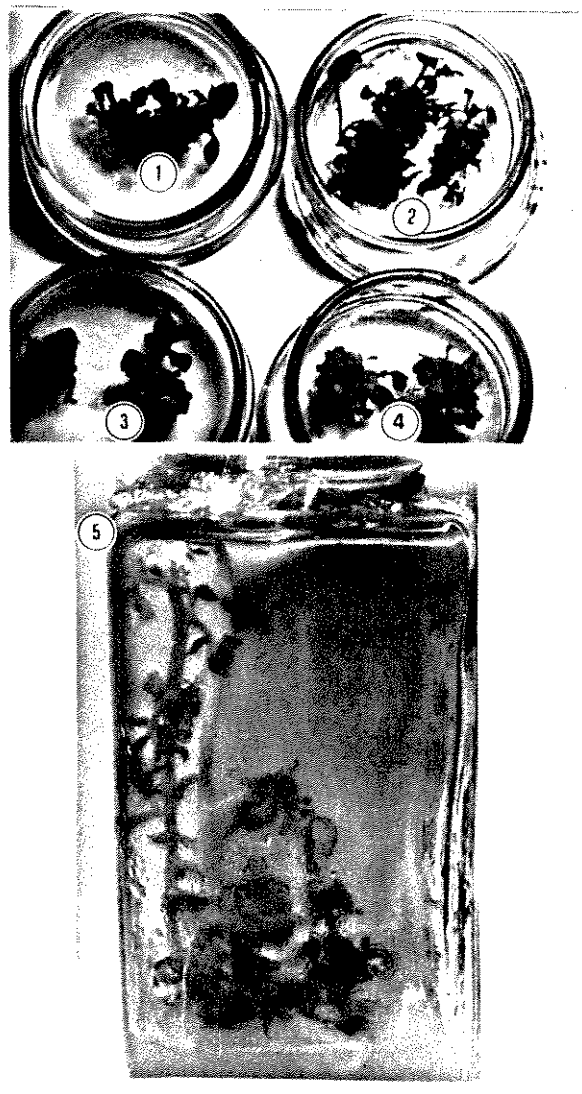


FIGURA 31 - Passagem das plantas obtidas *in vitro* a partir de submeristemas para cultivo em estufa para coleta de sementes (Fig. 31a-c). Passagem do cultivo *in vitro* ao plantio no solo (Fig. 31a-e). a) Aspecto das plantas obtidas *in vitro* a partir de submeristemas mantidos ainda em condições assépticas. Meio básico sem citocinina como AIA 0,25 µM (à esquerda) e AIA 1,0 µM (à direita). Documentação após 70 dias de cultivo. b) Início de aclimatização; a planta começa a emergir de um dos furos feitos, deixando o ambiente asséptico. Passagem para a mistura de vermiculita e areia após 46 dias em cultivo em meio básico sólido, acrescido de A I A 0,25 µM e 6-BA 0,25 µM. Cultivar sensível. Documentação após 68 dias da inoculação inicial. Esta planta foi transferida para o solo após 109 dias da inoculação inicial.

Após o plantio, em exatamente 4 meses, produziu frutos maduros (peso médio = 3,25 g; comprimento médio = 1,92 cm; largura média = 2,26 cm; média de sementes por fruto = 56,2.

c) 3 fases de aclimatação: começando a emergir, maior emergência e a planta bem desenvolvida em condições ambientais; d) d) planta completamente adaptada às condições ambientais. Meio de cultivo do submeristema: básico, acrescido somente de AIA 0,25 µM. Transferência para vermiculita após 35 dias de cultivo no meio sólido. Planta fotografada após 14 dias da abertura total da camada de filme de PVC. Coleta de frutos após 4 meses de plantio no solo, quando foram coletadas as sementes. Média de frutos por cacho = 5. Os frutos, em média, tiveram 61,20 sementes; e) Aspecto das plantas provindas de cultura *in vitro* obtidas a partir de submeristemas por ocasião da transferência para o solo.

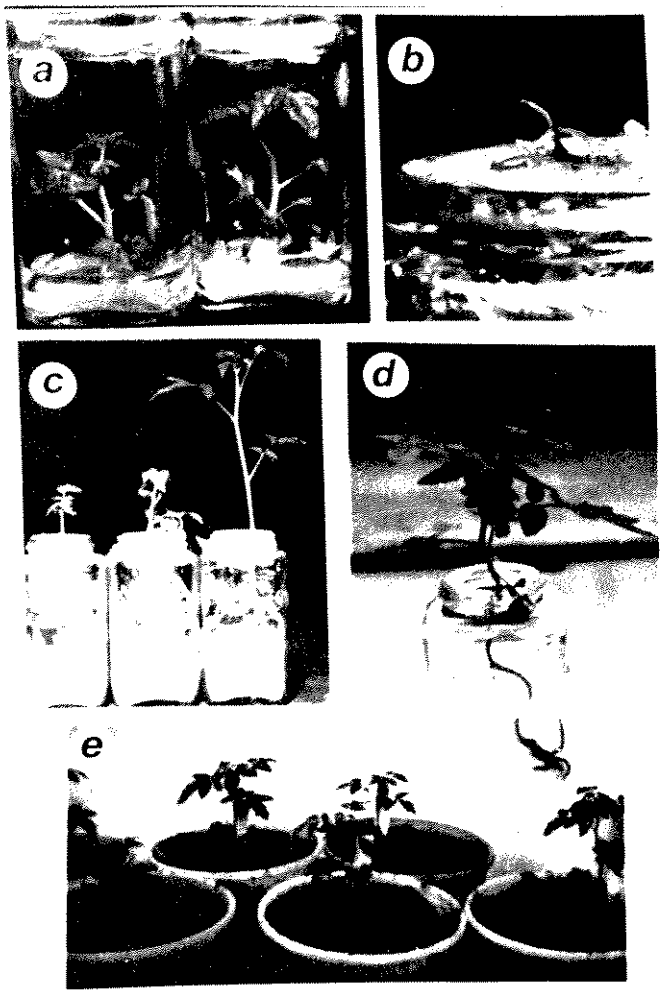


FIGURA 31 - Passagem das plantas obtidas *in vitro*, a partir de submeristemas, para cultivo em estufa com finalidade de coleta de sementes. Desenvolvimento em estufa das plantas obtidas de cultura de tecidos (Fig. 31f-i). f) Aspecto das plantas provindas de cultura de tecidos após 55 dias do plantio no solo, planta V (à esquerda) obtida no meio básico acrescido de AIA 0,50 M sem adição de citocinina; g) Aspecto de frutos em fase de "Mature green" e "Turning". Documentação após 55 dias de plantio no solo; h) Aspecto das plantas após 110 dias do plantio no solo, plantas apresentando frutos maduros; i) Frutos da planta V mostradas separadamente. Observar as manchas nestes frutos resultantes da pulverização de inseticidas e fungicidas feitas nas plantas para evitar instalação de pragas e moléstias.

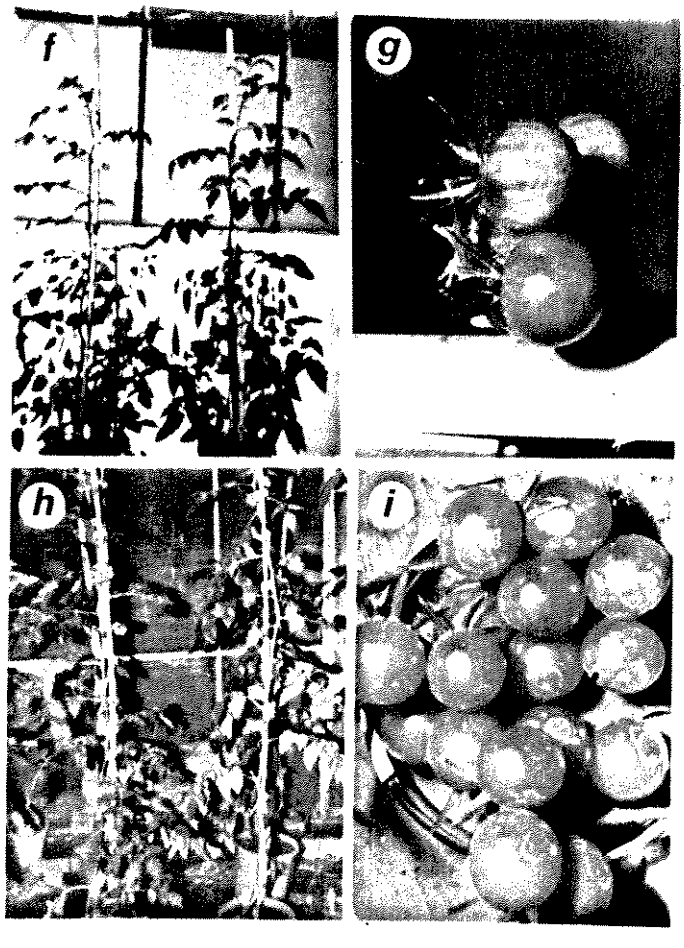


FIGURA 32 - Passagem de plantletes obtidas *in vitro* a partir de cotilétodne e hipocótilo para cultivo na estufa e campo para coleta de sementes. Passagem do cultivo *in vitro* ao plantio no solo (Fig. 32a.d.). a) Aspecto da planta obtida *in vitro* a partir de cotilédone em condições assépticas. Meio To/D (AIA 2,5 µM x 6-BA 10 µM). Documentação após 39 dias de cultivo. b) Aspecto da planta obtida *in vitro* a partir de hipocótilo em condições assépticas. Meio To/D (AIA 0,1 µM e 6-BA 10 µM). Documentação após 36 dias de cultivo; c) Os vários passos da regeneração da esquerda para a direita: indução de calo; regeneração; enraizamento de plantlete; aclimatação da plantlete enraizada. Explante inicial: cotilédone. Meio utilizado: To/D (AIA 40 µM e 6-BA 10 µM). d) Aspecto das plantletes provindas de cultura *in vitro* obtidas a partir de cotilédone e hipocótilo quando transferidas para o solo. Período de aclimatação de 21 a 38 dias.

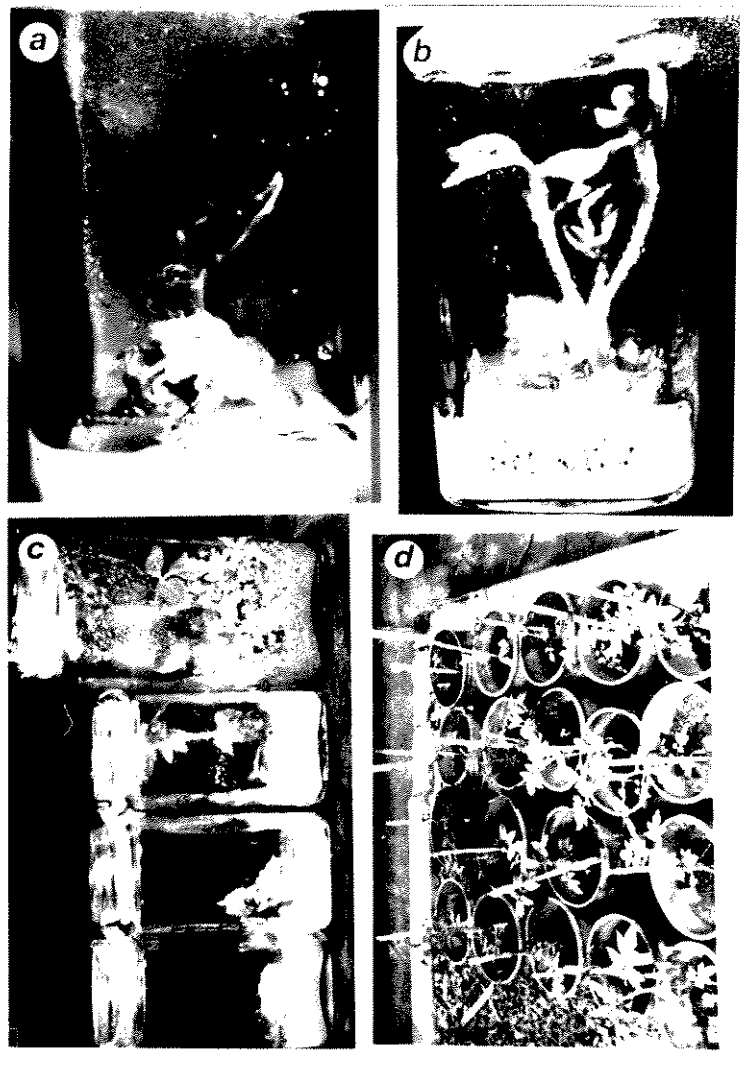
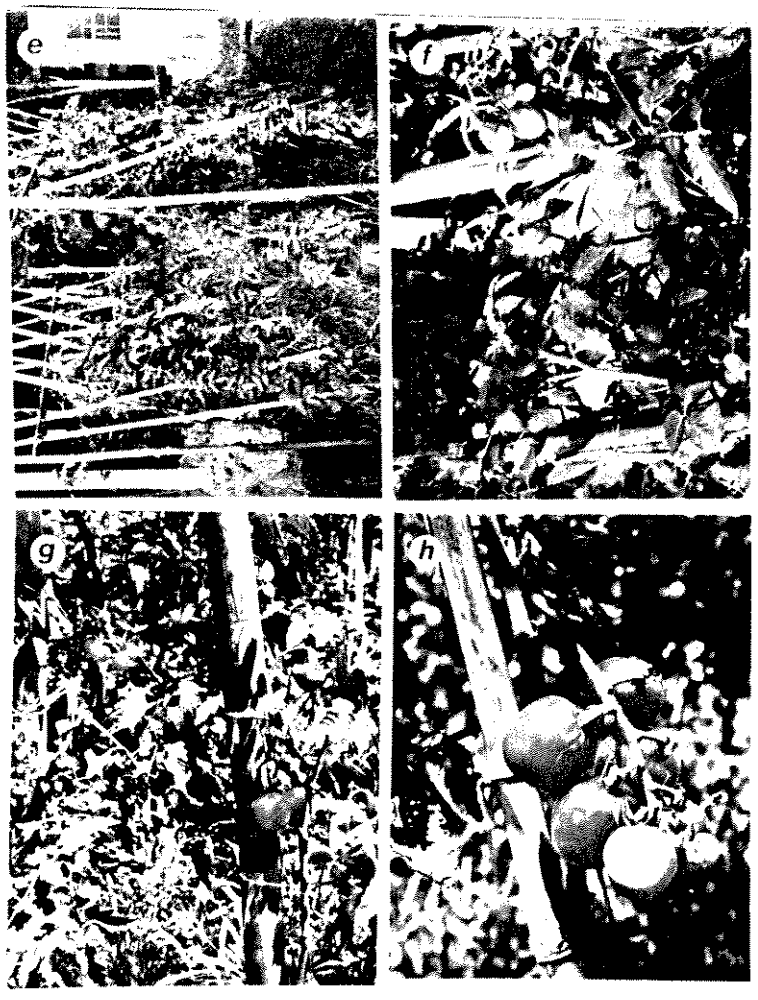


FIGURA 32 - Passagem das plantletes obtidas *in vitro* a partir de cotilédone e hipocótilo para coleta de sementes (Fig. 32e-i). Desenvolvimento no campo de plantas provindas de cultura. Documentação após 7 meses do início da inoculação em cultura. f) Frutos em maturação apresentando "ombro"; g) Aspecto geral da planta à época de coleta de sementes e h) Frutos em vários estádios de maturação, o fruto maior se encontra no estádio "red" propício à retirada d e sementes.



1.3.2. Interações de fitorreguladores em morfogênese

1.3.2.1. Interação dialélica

O processo de morfogênese, além de envolver um equilíbrio de tipo e concentração de fitorreguladores, necessita de interação específica de auxinas e citocininas. Para tanto, foram testadas no meio básico, diferentes combinações dialélicas (6-BA e C = 0,5-10,0µM) e auxinas (AIA = 10-100µM; ANA = 2,5-50,0µM ; 2,4-D = 0,25-5,00µM). Os resultados destas interações mostraram que, em relação a:

a) Cotilédone, Material 1 (Fig. 33, Tabs. 9, 11, 12 e 13).

C / AIA - Valor de F não significativo ao nível de 0,5%. O mais alto índice observado, não significativo, foi em presença de 5 µM de C e AIA 75 µM. De modo geral, em presença de 10 µM de C, obtiveram-se índices semelhantes, independente de AIA. A melhor textura de calo (ligeiramente friável) também foi encontrada nesta concentração de AIA. A concentração mais baixa de AIA utilizada, provocou maior número de raízes (mais de 10).

6-BA/ANA - Não houve efeito marcante de concentrações dos hormônios quanto ao índice de crescimento, o que foi corroborado pela análise estatística (valor de F não significativo ao nível de 10%). Calos friáveis foram obtidos com 6-BA 10 µM e ANA 2,5µM. Raízes só foram observadas nas concentrações de 0,50 e 1,0 µM de 6-BA principalmente com ANA 2,5 µM (6-10 raízes).

C / ANA - As várias concentrações testadas produziram índices de crescimento semelhantes (F não significativo ao nível de 5%). A interação de C 5,0 µM e ANA 2,50 µM produziu o maior índice de crescimento (valor de F não significativo) e calos friáveis. Neste dialélico houve pouca produção de raízes, que ocorreram principalmente com C 0,50 µM.

6-BA/2,4-D - Esta interação produziu calos com pequenos índices de crescimento, sendo que os valores mais altos (estatisticamente não significativos) foram obtidos na presença de 5,0 e 10,0µM de 6-BA. A concentração mais alta testada, de 2,4-D (5,0µM)

resultou em menor crescimento em todas as concentrações de 6-BA utilizadas. Neste dialélico, o mais alto índice de crescimento (2,4-D 0,25 µM e 6-BA µM) não correspondeu a um calo de textura adequada. Houve pequena formação de raízes, apenas nas menores concentrações testadas. O valor de F não foi significativo ao nível de 10%.

b) Cotilédone, Material 2 (Fig. 34, Tabs. 9 e 11).

6-BA/AIA - Esta interação mostrou-se estatisticamente significativa (ao nível de 0,5%). Na presença de AIA, 6-BA foi mais efetivo a partir das concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 µM, tanto no crescimento, quanto na textura. Os efeitos de AIA são mais evidentes nas concentrações de 10, 25, 50 e 75 µM. A concentração de 100 µM não foi tão efetiva. Calos bem friáveis foram observados principalmente na presença de 10 µM de 6-BA.

6-BA/ANA - Interação não significativa (ao nível de 5%), nem se observando efeito marcante de concentração nos índices obtidos. A concentração mais efetiva testada foi ANA 2,5 µM e 6-BA 10,0 µM, que produziu bom índice de crescimento e calo friável.

c) Cotilédone, Interação 6-BA/ANA, Material Vegetal 1 e 2 (Figura 35, Tabelas 10 e 11)

Os dois cultivares se comportaram de forma semelhante (teste F não significativo ao nível de 5%), não havendo uma forte interação de concentração. Os índices de crescimento foram próximos (cv.1 - ANA 0,5 e 6-BA 2,5 µM e cv.2 - ANA 5,0 e 6-BA 5,0µM). Houve semelhança, também, quanto à textura e produção de raízes. Nesta interação, para ambos os materiais, podemos dizer que o ótimo foi ANA 2,50 µM e 6-BA 10 µM.

d) Folha definitiva, Material 2 (Fig. 36, Tabs. 9 e 13)

6-BA/AIA - A interação foi semelhante à observada com cotilédone, mas no caso específico da folha, o AIA foi mais efetivo na concentração mais baixa utilizada (10 µM), a qual produziu calos friáveis, porém, não tão friáveis como os obtidos com cotilédone. Na folha definitiva, houve menos formação de raízes do que com cotilédone, o que indicaria que haveria influência do nível endógeno de hormônios do explante. Valor de F não significativo ao nível de 10%.

6-BA/2,4-D - 2,4-D produziu baixos índices de crescimento. O valor mais alto foi obtido com a menor concentração de 2,4-D empregada (0,25 µM). No caso de folha definitiva, o 2,4-D produziu calos ligeiramente friáveis, principalmente na concentração de 0,25 µM. Neste caso, também, houve pequena formação de raízes. Valor de F não significativo ao nível de 5%.

e) Cotilédone x Folha Definitiva, Interação 6-BA/AIA, Material 2 (Figura 37 e Tabela 9)

Em ambos os explantes, o efeito de AIA foi mais efetivo a partir da concentração de 2,5; 5,0 e 10,0 uM de 6-BA. Este fato foi mais marcante no cotilédone. As interações ótimas de índice de crescimento se aproximam (AIA 10 µM/6-BA 2,5 µM para cotilédone e AIA 10 µM/6-BA 10 µM para folha definitiva). Mas quanto à textura, obtém-se calos muito friáveis quando se utiliza como fonte inicial de explante cotilédone do que folha definitiva, embora ao se utilizar cotilédone obtenha-se um número maior de raízes. A interação de AIA x 6-BA mostrou-se como a única combinação de reguladores de crescimento estatisticamente significativa. Em presença de BA 10 µM obtém-se calos friáveis utilizando-se AIA. Há , no entanto, efeito da concentração de AIA utilizado, quanto ao índice de crescimento. Na presença de AIA 25 µM obtém-se o melhor resultado em cotilédone e bom resultado com folha definitiva.

Fez-se em experimento com os materiais vegetais 1 e 2 , com suprimento constante de 6-BA 10 µM e 3 níveis de AIA: 25; 50 e 75 µM, utilizando-se cotilédone como explante inicial, em relação ao índice de crescimento, textura e regeneração. Os resultados obtidos corroboram os resultados da Fig 37a, pois, melhor textura e maiores índices de crescimento, foram obtidos quando se utilizou AIA ao nível de 25 µM. Quanto à regeneração, também, a concentração de 25 µM resultou, tanto no material 1 como no material 2, maior número de gemas que as demais concentrações de AIA testadas.

1.3.2.2. Efeito de auxinas (tipo e concentração) na formação de calos e em freqüência e qualidade de regeneração em presença de 6-BA 10 µM

Os resultados obtidos neste experimento são mostrados na TABELA 16.

FIGURAS 33 A 37

REPRESENTAÇÃO DE ÍNDICES DE CRESCIMENTO DE CALOS MANTIDOS EM INTERAÇÕES DIALÉLICAS 5x5 DE AUXINAS E CITOCININAS, APÓS 50 DIAS DE CULTIVO NO ESCURO.

FIGURAS 33-35 REFEREM-SE A COTILÉDONE COMO FONTE INICIAL DE EXPLANTE. FIGURA 36 REFERE-SE À FOLHA DEFINITIVA COMO FONTE INICIAL DE EXPLANTE. FIGURA 37 COMPARA AS DUAS FONTES DE EXPLANTE.

FIGURA 33 - Comparação de interações dialélicas utilizando-se o cultivar PI 367977, sensível a alumínio:
a) dialélico II; b) dialélico III; c) dialélico IV e d) dialélico V.

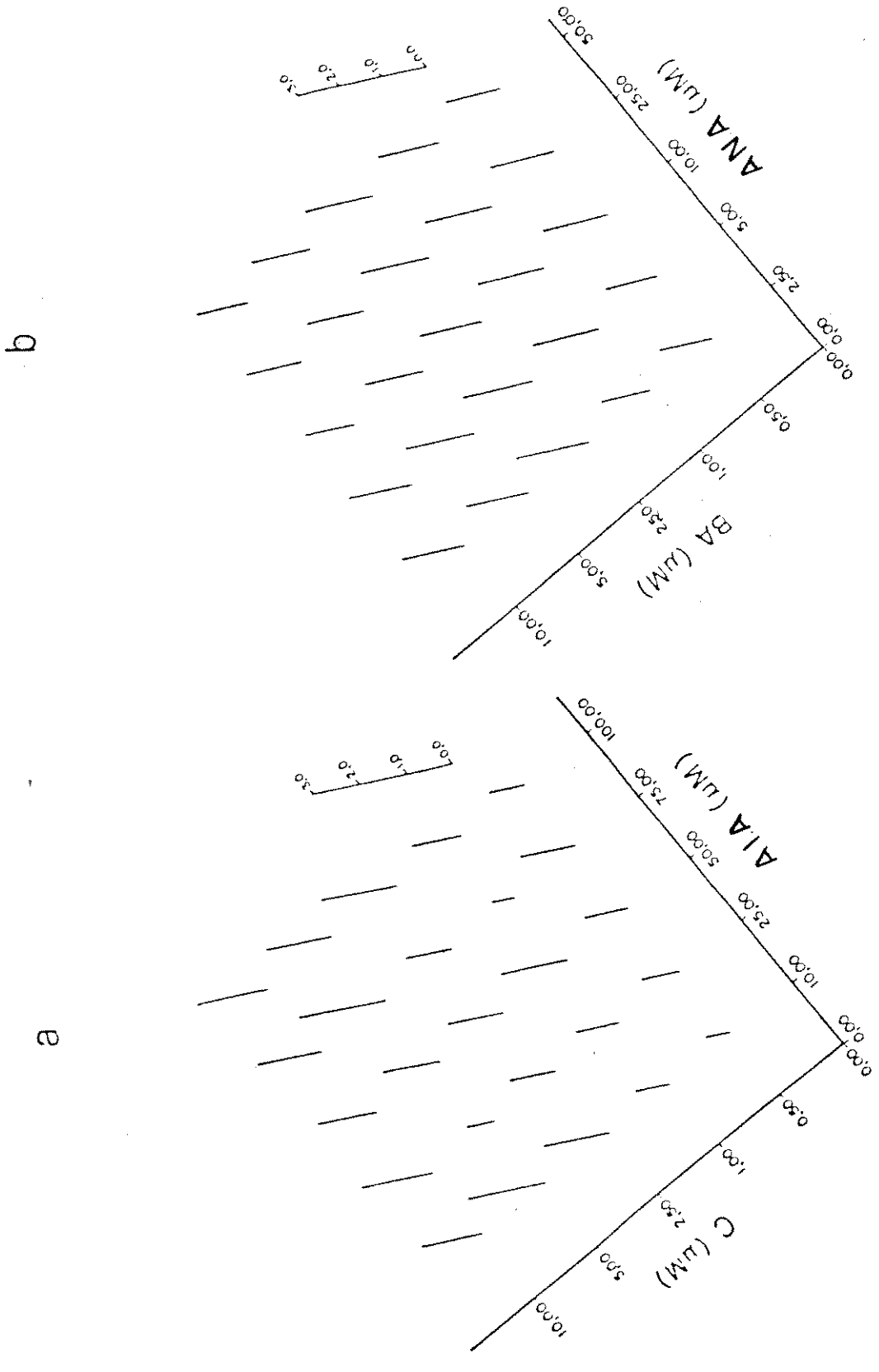

a
C (µM)
0,00
0,50
1,00
2,50
5,00
10,00
A/A (µM)
0,00
10,00
25,00
50,00
75,00
100,00
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
3,0
b
GA (µM)
0,00
0,50
1,00
2,50
5,00
10,00
ANA (µM)
0,00
0,00
2,50
5,00
10,00
25,00
50,00
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
3,0

FIGURA 33

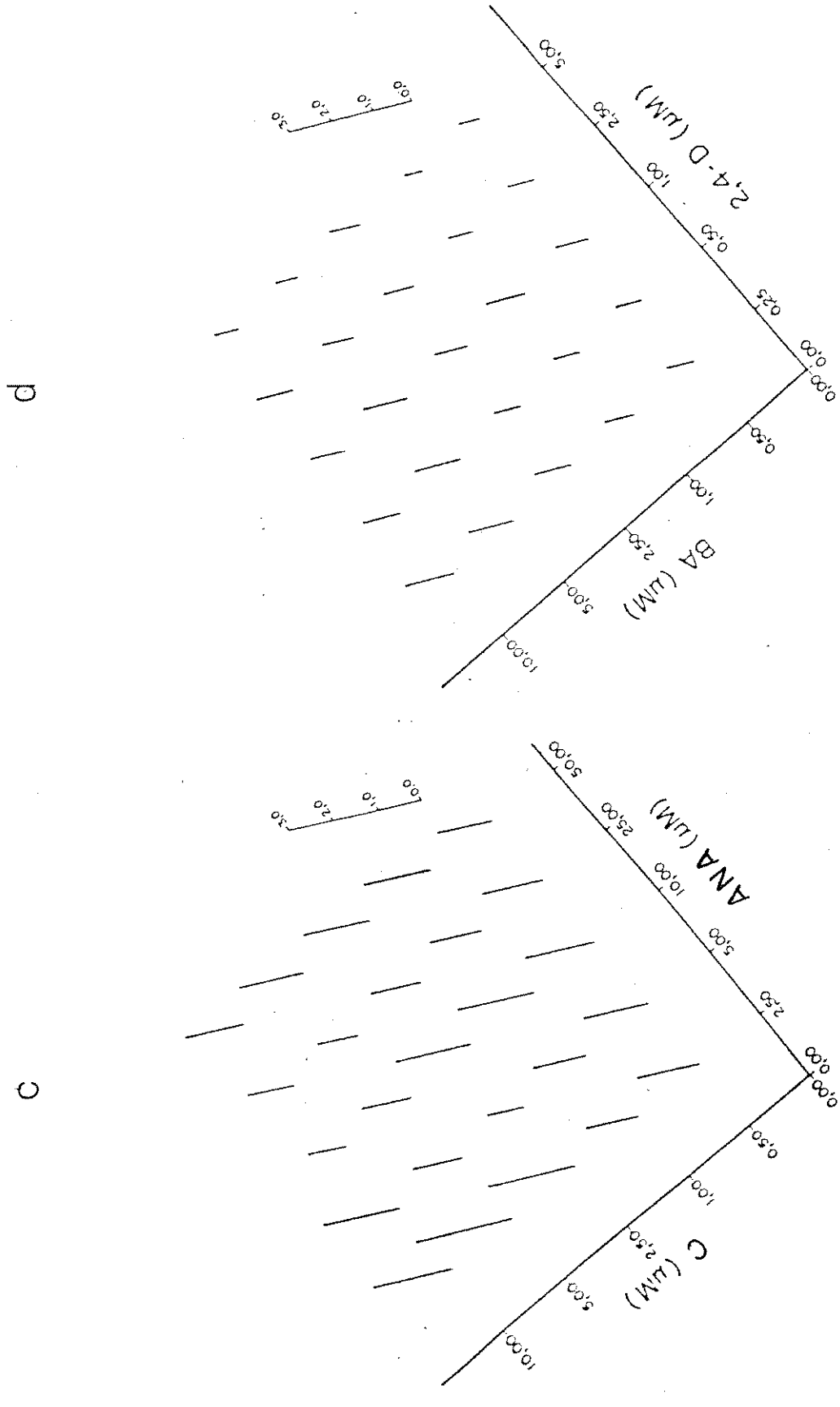

d
2,4-D (µM)
0,00
0,01
0,25
0,50
1,00
2,50
5,00
10,00
BA (µM)
0,00
0,50
1,00
2,50
5,00
10,00
0,0
1,0
2,0
3,0
c
ANA (µM)
0,00
0,01
2,50
5,00
10,00
25,00
50,00
C (µM)
0,00
0,50
1,00
2,50
5,00
10,00
0,0
1,0
2,0
3,0

FIGURA 33

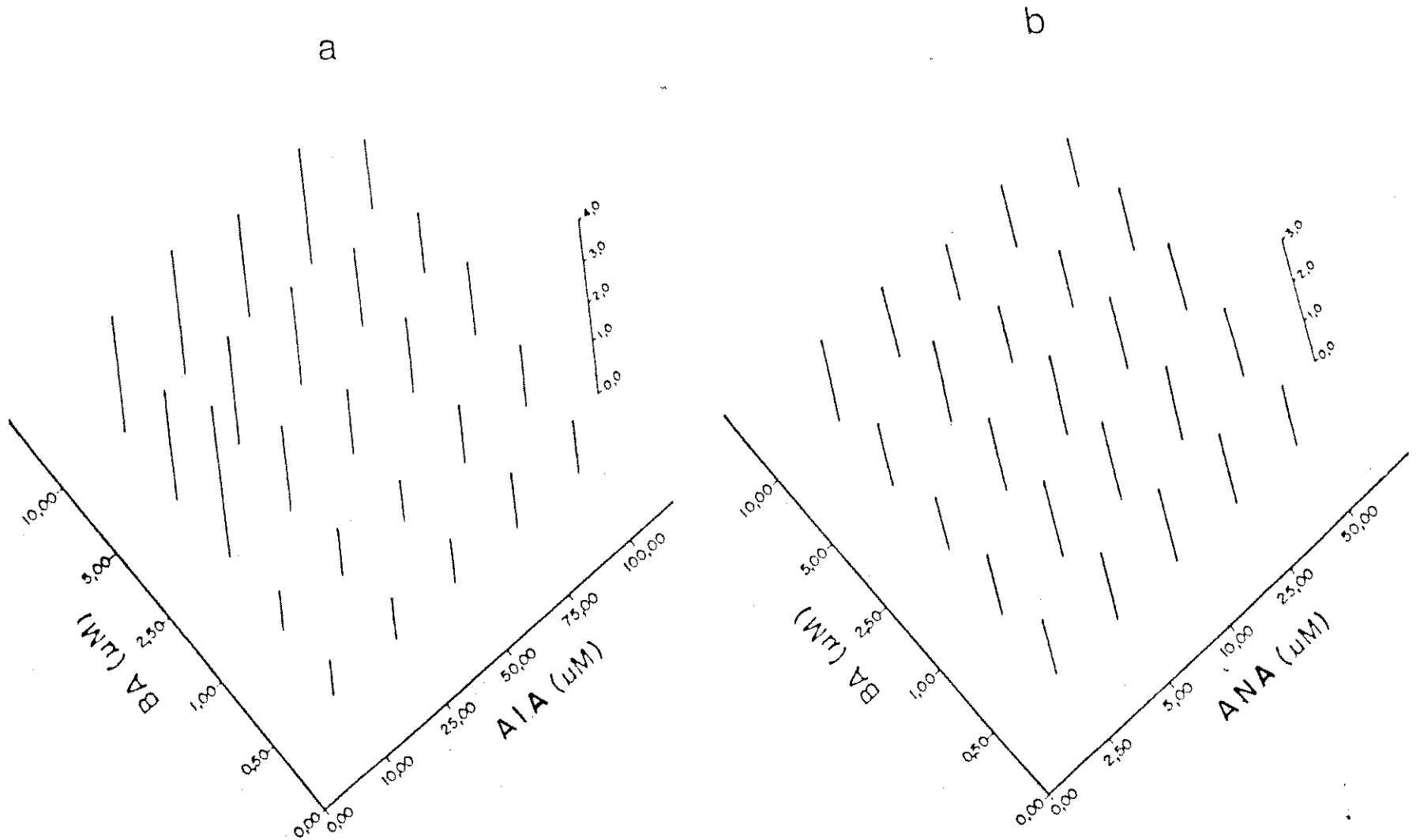


FIGURA 34 - Comparação de interações dialélicas utilizando-se o cultivar PI 367991, tolerante a alumínio a) dialélico I e b) dialélico III.

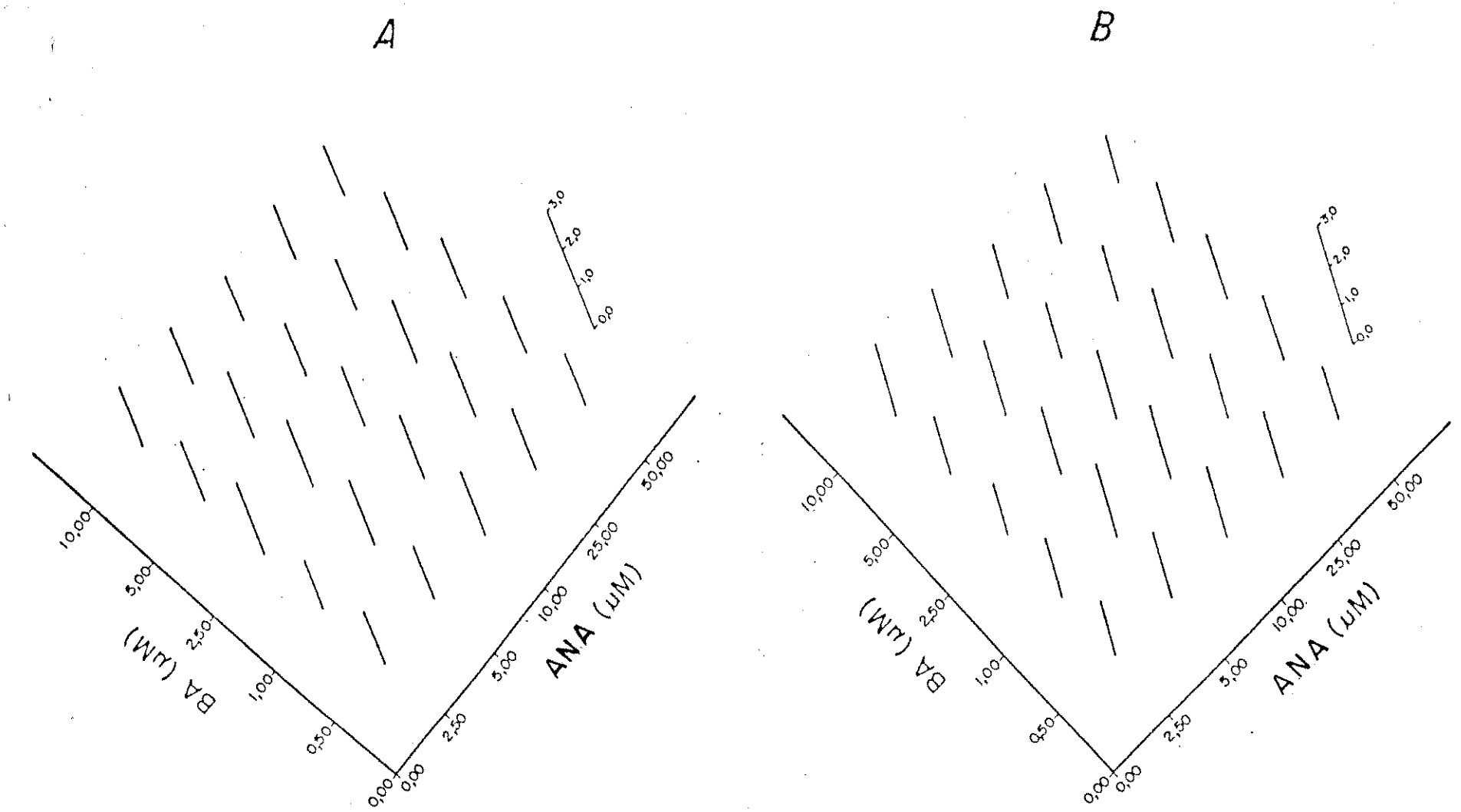


FIGURA 35 - Índices de crescimento obtidos na interação dialélica de 6-BA/ANA (dialélico III) com os cultivares PI 367977 (A) e PI 367991 (B).

UNICAMP

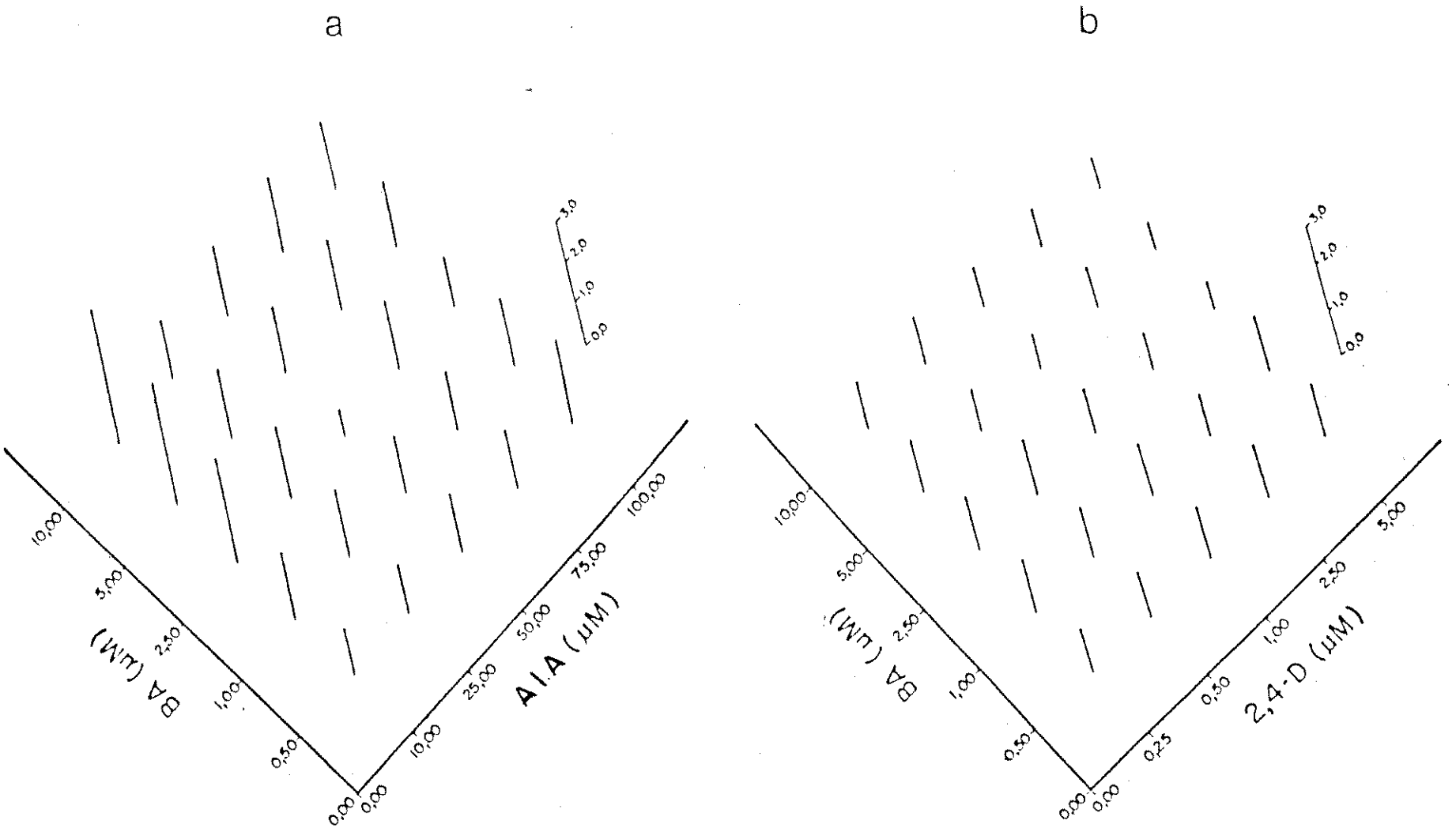


FIGURA 36 - Comparação de interações dialélicas utilizando-se o cultivar PI 367991. a) interação 6-BA/AIA (dialélica I); b) interação BA x 2,4-D (dialélico V).

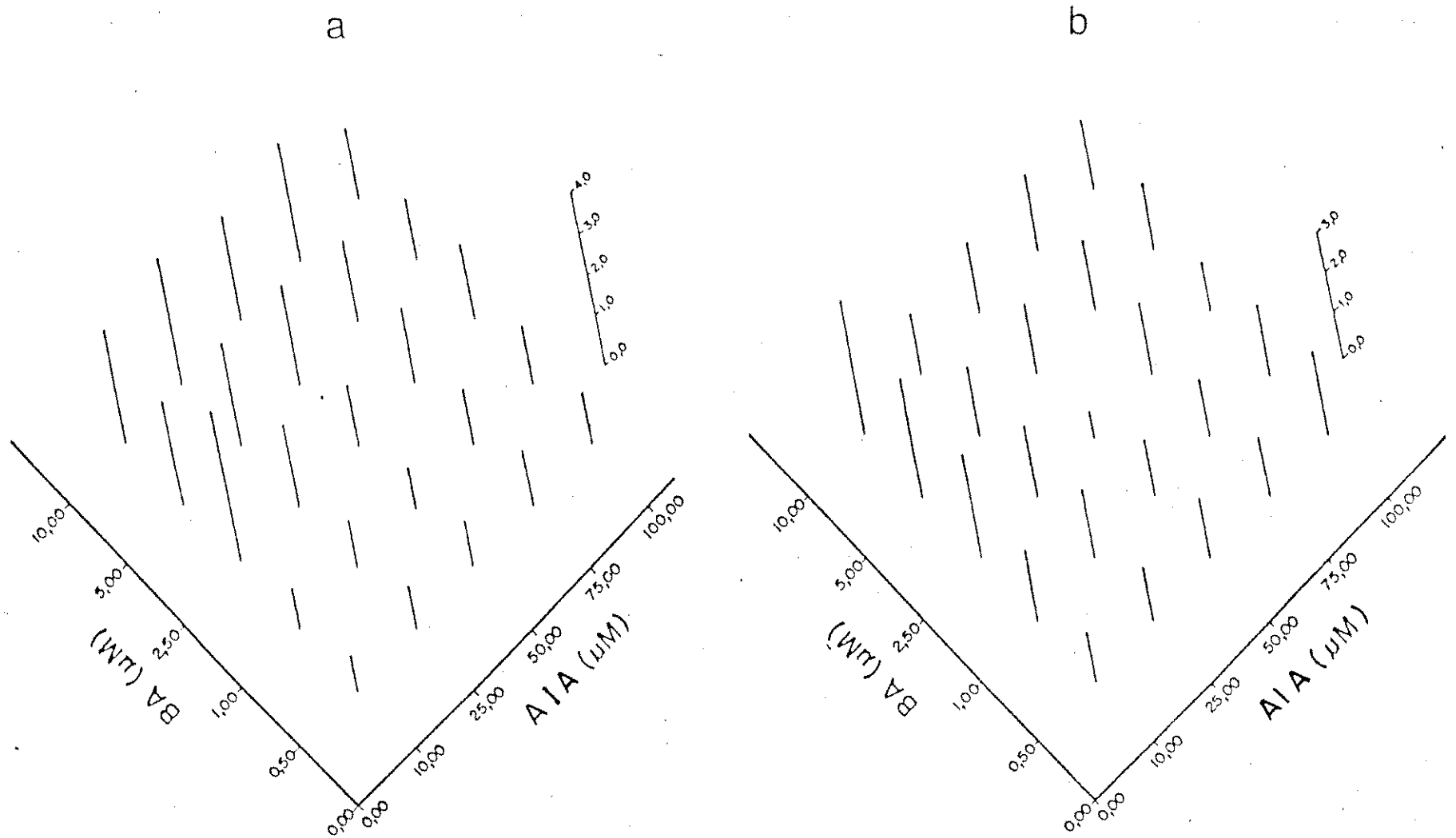


FIGURA 37 - Índices de crescimento obtidos na interação dialélica de 6-BA/AIA (dialélico I) utilizando-se o cultivar PI 36797991. a) cotilédone e b) folha definitiva.

TABELA 11

Anotação da textura dos calos e da presença de raízes ($\bar{x}$) na interação dialélica 6-BA/AIA (dialélico I), cujos índices de crescimento estão representados na figura 33. Esta anotação como as demais foi feita após 50 dias de cultivo no escuro.

Legenda: D = duro
LF = ligeiramente friável
F = friável
F^{++} = bem friável
→ - em direção a

R^{+} = < 1 raiz
R^{++} = de 1-5 raízes
R^{+++} = de 6-10 raízes
R^{++++} = + de 10 raízes

6-BA	+	AIA	Cotilédone		Folha definitiva	
0,50		10,00	D	R^{++++}	D	R^{++}
0,50		25,00	D	R^{++++}	D	
0,50		50,00	D	R^{++++}	D	
0,50		75,00	D	R^{+++}	LF→F	
0,50		100,00	D	R^{+++}	D→LF	
1,00		10,00	D	R^{++++}	D	R^{++}
1,00		25,00	D	R^{++++}	D	R^{++++}
1,00		50,00	D	R^{++++}	LF	
1,00		75,00	D	R^{+++}	D	
1,00		100,00	D	R^{++}	D→LF	
2,50		10,00	LF	R^{+++}	F	
2,50		25,00	LF	R^{+++}	F	
2,50		50,00	F	R^{+++}	D	
2,50		75,00	LF	R^{+++}	F	
2,50		100,00	F	R^{++}	F	
5,00		10,00	LF	R^{++}	F	
5,00		25,00	LF	R^{++}	LF	
5,00		50,00	F	R^{+}	D	
5,00		75,00	F		LF	
5,00		100,00	F		F	
10,00		10,00	D→LF	R^{++}	F	
10,00		25,00	F^{++}		LF→D	
10,00		50,00	F^{++}		LF→F	
10,00		75,00	F^{++}		D→LF	
10,00		100,00	F^{++}		F	

TABELA 12

Anotação de textura dos calos e presença de raízes ($\bar{x}$) na interação dialélica C/AIA (dialélico II), utilizando-se como fonte inicial de explante cotilédone de acessão sensível (PI 3679977), material 1.

C	AIA	Cotilédone	
0,50	10,00	D	R^{+}
0,50	25,00	D	R^{++++}
0,50	50,00	D	R^{++}
0,50	75,00	D→LF	R^{++}
0,50	100,00	D	R^{+}
1,00	10,00	D	R^{++}
1,00	25,00	D→LF	R^{++}
1,00	50,00	D→LF	R^{++++}
1,00	75,00	D	
1,00	100,00	LF→D	R^{++}
2,50	10,00	D	
2,50	25,00	D→LF	R^{++}
2,50	50,00	LF	R^{++++}
2,50	75,00	LF	
2,50	100,00	LF	
5,00	10,00	D	
5,00	25,00	D→LF	
5,00	50,00	LF	R^{+}
5,00	75,00	LF	
5,00	100,00	D	
10,00	10,00	D→LF	
10,00	25,00	LF	
10,00	50,00	LF	
10,00	75,00	LF	
10,00	100,00	LF→F	

TABELA 13

Anotação da textura dos calos e presença de raízes ($\bar{x}$) na interação dialélica 6-BA/ANA (dialélico III), utilizando-se como fonte inicial cotilédone dos materiais PI367997 (1) e PI367991 (2).

Concentração do Regulador (μM)			Material Vegetal			
6-BA	+	ANA	1		2	
0,50		2,50	D	R^{++}	D	R^{+++}
0,50		5,00	D	R^{+}	D	R^{++++}
0,50		10,00	D	R^{++}	LF→D	R^{+++}
0,50		25,00	LF		LF	
0,50		50,00	D→LF		D→LF	
1,00		2,50	D	R^{+++}	D	R^{++++}
1,00		5,00	D	R^{++}	D	R^{++}
1,00		10,00	D	R^{++}	D→LF	R^{++}
1,00		25,00	LF		LF	
1,00		50,00	D→LF		D→LF	
2,50		2,50	LF		LF	
2,50		5,00	LF		LF	
2,50		10,00	LF		LF	
2,50		25,00	LF		LF	
2,50		50,00	D→LF		D→LF	
5,00		2,50	LF-F		LF→F	
5,00		5,00	LF		LF	
5,00		10,00	LF		LF	
5,00		25,00	LF		LF	
5,00		50,00	LF→D		D→LF	
10,00		2,50	F		F	
10,00		5,00	LF→F		LF	
10,00		10,00	LF		LF	
10,00		25,00	LF		LF	
10,00		50,00	LF→F		LF→F	

TABELA 14

Anotação da textura dos calos e presença de raízes ($\bar{x}$) na interação dialélica C/ANA (dialélico IV) utilizando-se como fonte inicial cotilédone do material 1.

Concentração do Regulador (µM)		Cotilédone	
C	ANA		
0,50	2,50	D	R^{++}
0,50	5,00	LD→F	R^{++}
0,50	10,00	D	R^{++}
0,50	25,00	D	R^{++}
0,50	50,00	D	
1,00	2,50	D	R^{+}
1,00	5,00	D	
1,00	10,00	D	
1,00	25,00	D	
1,00	50,00	D	
2,50	2,50	LF→D	
2,50	5,00	D	
2,50	10,00	D	
2,50	25,00	D	
2,50	50,00	D	
5,00	2,50	F	
5,00	5,00	LF→D	
5,00	10,00	LF→D	
5,00	25,00	D	
5,00	50,00	D	
10,00	2,50	LF→D	
10,00	5,00	LF	
10,00	10,00	D	
10,00	25,00	D	
10,00	50,00	D	

TABELA 15

Anotação da textura dos calos e presença de raízes ($\bar{x}$) na interação dialélica 6-BA/2,4-D (dialélico V). Fontes iniciais: cotilédone do material 1 e material 2 .

Concentração do Regulador (μM)		Material Vegetal			
6-BA	2,4-D	1		2	
0,50	0,25	D	R^{++}	LF→F	R^{+}
0,50	0,50	D	R^{++}	LF→F	
0,50	1,00	D		LF→F	
0,50	2,50	D		LF	
0,50	5,00	D	R^{+}	LF	R^{+}
1,00	0,25	D	R^{++}	LF→F	
1,00	0,50	D		LF→F	
1,00	1,00	D		LF→F	
1,00	2,50	D		LF	
1,00	5,00	D		LF	
2,50	0,25	D→F		LF→F	
2,50	0,50	LF		LF→F	
2,50	1,00	LF		LF→F	
2,50	2,50	LF		LF→F	
2,50	5,00	LF		LF	
5,00	0,25	D→LF		LF→F	
5,00	0,50	D→LF		LF→F	
5,00	1,00	LF→D		LF→F	
5,00	2,50	LF		LF→F	
5,00	5,00	LF		LF	
10,00	0,25	D→F		LF→F	
10,00	0,50	D→LF		LF→F	
10,00	1,00	LF→F		LF→F	
10,00	2,50	D→F		LF→F	
10,00	5,00	LF		LF	

TABELA 16.1 - Efeito do tipo e concentração de auxinas na regeneração de *Lycopersicon esculentum*. Citocinina empregada: 6-BA 10µM. Explantes utilizados: cotilédone de plântulas crescidas assepticamente de 21 dias de idade. Condições naturais de cultivo. Avaliação após 32 dias de inoculação.

Auxina	Concentração µM	Dados obtidos					Dados analisados					
		Cor do Calo	Presença de Raízes Σ	Presença de Raízes $\bar{X}$	N	N_1	N_2	Calo I.C.	%	Regeneração nº gemas/calos	% por classe Plantas	% por classe Folhas	% por classe Gemas
AIA	10,0	creme	2	1,0	6	4	18	0,92	66,7	4,5	0,0	50,0	50,0
"	20,0	"	1	1,0	8	6	22	0,84	75,0	3,7	14,3	42,9	42,8
"	40,0	"	0	0,0	3	3	11	0,50	100,0	3,7	0,0	0,0	100,0
ANA	10,0	creme	8	2,7	7	4	14	0,93	57,1	3,5	0,0	7,1	92,9
"	20,0	"	19	4,8	8	3	12	0,21	37,5	4,0	0,0	0,0	100,0
2,4-D	1,0	esbranquiçado	0	0,0	7	0	0	0,71	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
"	5,0	"	0	0,0	7	0	0	0,53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Análise de variância F									NS	NS			

N = nº total de calos viáveis

N_1 = nº total de calos regenerados

N_2 = nº total de regenerações

$$\% \text{ de regeneração} = \frac{N_1 \cdot 100}{N}$$

I.C. = índice de crescimento

$$\text{nº gemas/calo} = \frac{N_2}{N_1}$$

$$\% \text{ de classe} = \frac{\text{nº plantas} \times 100}{N_2} ; \frac{\text{nº folhas} \times 100}{N_2} ; \frac{\text{nº gemas} \times 100}{N_2}$$

NS = Não Significativo

A análise de variância mostrou que, quantitativamente, não houve efeito do tipo e concentração de auxinas testadas (valor F não significativo, tanto para I.C. como para freqüência de gemas). Não se observou regeneração em presença de 2,4-D. Qualitativamente, porém, verifica-se que a auxina natural foi a mais propícia à regeneração do tomate, porque produziu maior porcentagem de regenerações, de qualidade superior, pois, formaram - se plantas completas, com ápice. Mas, formação de plantas completas com ápice só ocorreu na concentração de 20 µM. Esta faixa de concentração parece ser a ideal para a regeneração do material vegetal testado do tomate, pois, observou-se boa regeneração com AIA 25 µM, mesmo após período mais longo de avaliação (45 dias).

A interação de AIA 25 µM e 6-BA 10 µM foi, pois, por nós escolhida para padrão para regeneração, em nossos estudos.

1.4. Efeito da Fonte de Explante em Cultura Primária (Regeneração)

Experimentos foram realizados, variando-se a concentração de AIA. Os melhores resultados foram observados na faixa de concentração de 20-30 µM. Utilizando-se cotilédone como explante inicial (ítens 1.1.2 e 1.2.1) de material vegetal de banco de germoplasma.

GUNAY & RAO (1980), usando a variedade Karnatak (híbrida) de *L. esculentum*, obtiveram melhores resultados com explantes de hipocótilo do que com explantes de cotilédone. Embora ambos os explantes tivessem regenerado plantletes, estas apareceram com maior freqüência nos calos de hipocótilo. Estes dados contrastaram com os resultados obtidos no nosso trabalho. O explante de hipocótilo não forneceu uma boa generação de plantletes, em oposição ao explante de cotilédone. Melhor regeneração, utilizando-se como explante o cotilédone, foi também encontrada em trabalho recente com *L. esculentum* (KUT et al., 1984).

ZILKAH & GRESSEL (1977a), utilizando *L. esculentum*, cv. San Marzano, obtiveram desenvolvimento prolífico de calo em presença de 0,5 mg/l de ANA e 0,1 mg/l de cinetina, em meio básico B_5. Neste mesmo meio, todos os demais explantes testados

cotilédone, raiz, junção do hipocótilo e semente inteira só produziram pequenos calos. Estes autores não estavam interessados em regeneração, mas, sim, em calos para cultura líquida. O cultivar San Marzano de frutos cilíndricos foi o cultivar típico usado para preparação de tomate pelado. Parece quase certo que este cultivar teve origem na região de Fiamo, entre Sarno e Nacera Inferior e foi transportado posteriormente para San Marzano, onde teria encontrado condições de desenvolvimento mais propício (ANDERLINI, 1982).

Em relação à utilização de folha definitiva, avaliando-se globalmente os experimentos realizados em 1982, empregando-se cotilédone (TABELA 16.2- total de 11 experimentos) e folha definitiva (TABELA 16.3- total de 12 experimentos), observou-se que o explante de cotilédone resultou em maior número de regenerados (79,5% - 81,7%) do que folha definitiva (49,15%). Em todos estes experimentos foram utilizados materiais vegetais de origem comercial.

1.5. CONDIÇÕES DE CULTIVO

1.5.1. Condições de Cultivo de Submeristema

As condições de cultivo para submeristema foram: luz artificial (2 lâmpadas incandescentes de 200 watts cada uma), e luz natural (estufa) (ver Métodos, ítem 1.3.3.4.). O desenvolvimento das plantas é mostrado na TABELA 17.

TABELAS 16 - Cultura primária, relação entre nº de calos formados (N) e nº de calos regenerados (N_1). Porcentagem de regeneração também é mostrada. Cultivo em meio primário padrão ToM_3 (MS + 6-BA 10 μM + AIA 25 μM). Explantes iniciais: cotilédone (Tabela 16.2) e folha definitiva (Tabela 16.3).

TABELA 16.2

MATERIAL VECETAL (cultivar)	CÓDIGO DA AMOSTRA	CALOS		
		Número		Porcentagem de regeneração
		N	N_1	$(N_1 \cdot 100)/N$
E	Si-69/F	3	2	66,6
E	Si-70/F	57	36	63,1
E	Si-71/F	538	325	60,4
E	Si-74/F	153	70	45,8
Σx		751	433	57,6
$\bar{x}$		188	108	
B	Si-76/F	64	32	50,0
B	Si-77/F	48	13	27,1
B	Si-78/F	155	58	37,4
B	Si-79/F	147	58	39,4
B	Si-81/F	45	26	57,8
B	Si-83/F	69	31	44,9
B	Si-84/F	141	52	36,9
B	Si-85/F	108	48	44,4
Σx		777	318	40,9
$\bar{x}$		97	40	
Σx		1528	751	49,1
$\bar{x}$		127	62	

B = "Petomech" 5319006 original

E = "Joaquim" original

TABELA 16.3 - Explante inicial. Folha Definitiva

MATERIAL VEGETAL (cultivar)	CÓDIGO DE AMOSTRA	CALOS	
		Número	PORCENTAGEM DE REGENERAÇÃO
		N	N_1	$(N_1 \cdot 100)/N$
E	Si-69/C	44	01	2,3	
E	Si-70/C	24	21	87,5	
E	Si-71/C	182	163	89,5	
E	Si-74/C	150	143	15,3	
Σx		328	400		82,0
$\bar{x}$		100	82		
B	Si-75/C	111	108	97,3	
B	Si-70/C	5	3	60,0	
B	Si-77/C	191	161	84,3	
B	Si-78/C	243	175	72,0	
B	Si-79/C	76	53	69,7	
B	Si-81/C	69	50	72,4	
B	Si-83/C	97	83	85,5	
Σx		633	792		79,9
$\bar{x}$		113	90		
Σx total		1192	961		$80,6 \pm 1,1$
$\bar{x}$ total		108	87		

B - "Petomech" 5319006 original

E - "Joaquim" original

O estimador geral para calos utilizando cotilédone é 80,8% e o desvio (σ) = 1,1%.

TABELA 17

Condições de Cultivo para Submeristemas

Dias em luz artificial	Dias em luz natural	Dias de cultivo	nº de raízes $\bar{x}$	nº de folhas $\bar{x}$	Altura do eixo (cm) $\bar{x}$
22	0	22	2,5	2,4	0,3
28	0	28	1,9	3,0	0,6
36	0	36	2,4	2,0	0,8
12	10	22	2,7	2,9	0,6
12	16	28	2,7	5,1	1,5
12	24	36	2,5	6,0	2,0

O desenvolvimento do submeristema em planta é altamente afetado pela qualidade e quantidade de luz. Mudança para luz natural (estufa) promoveu o desenvolvimento, tendo seu efeito mais marcante na expansão foliar, pois triplicou o número de folhas expandidas em relação às plantas mantidas sob luz artificial após 36 dias de cultivo. Observa-se que, pelo mesmo período *in vitro* , obtém-se plantas 2,5 vezes mais altas em luz natural do que em luz artificial. É interessante ressaltar que, em relação à parte de raízes, o número destas não foi afetado nem por condições ambientais, nem pelo período de cultivo, situando-se sempre entre 2 - 3 raízes formadas, por planta. Já na parte aérea, logo após a transferência de luz artificial para a natural, parece ter havido uma alteração rápida do desenvolvimento, principalmente em relação à expansão de novas folhas. Outro fato foi o de que, em condições de estufa, as folhas das plantas cultivadas *in vitro* a partir de submeristemas apresentaram-se semelhantes às observadas na natureza, em relação à posição, formato e cor. As folhas apresentaram-se de coloração verde-escuro, em tom mais acentuado que as plantas cultivadas *in vitro* sob luz artificial.

1.5.2. Condições de Cultivo durante a Cultura Primária

O início de regeneração foi mais rápido (20-21 dias) em luz do que no escuro. A porcentagem de regeneração com cotilédone foi mais baixa no escuro (48%) do que no fotoperíodo de 12 horas (78% a 100%) e luz natural (93,7%). A frequência de regeneração foi de 1,98 gema/calo no escuro; 5,2 a 9,7 gema/calo em 12 horas de luz diária e 8,9 gema/calo em condições naturais. A frequência média de regeneração no tomateiro é de, no máximo, 6 gemas/calo (KUT et al., 1984), obtendo-se, pois, em condições naturais, aumento de regeneração no material vegetal testado.

Testou-se o efeito na presença de luz (incandescente e natural) e ausência de luz, na regeneração de calos obtidos tanto do cotilédone como hipocótilo. Verificou-se que, para diferenciação de gemas, o papel da luz é fundamental. No escuro, não houve formação de gemas, após 21 dias, sendo que, com a transferência para luz artificial, houve aparecimento de gemas após 2 dias de pequena diferenciação após 5 dias em luz artificial. A qualidade e quantidade de luz parecem ser muito importantes, pois 3 dias

após transferência para luz natural, ocorre diferenciação, tanto com hipocótilo como com cotilédone (AIA 2,5 µM para hipocótilo ; AIA 10,1 e 40,0 µM para cotilédone). Na luz natural houve,então, o desenvolvimento normal do plantlete.

A presença de luz foi benéfica à regeneração do tomateiro. Para se pesquisar este aspecto em maior profundidade, foi utilizado cv. Joaquim e cotilédone como explante inicial. O cultivo foi feito em duas condições:

a) sala de cultivo com fotoperíodo de 16 horas, cuja luz é fornecida por uma mistura de luzes incandescentes e fluorescentes. Foi medida a intensidade em cada prateleira de estante (ver ítem 1.3.3.4) à temperatura de 25 ± 2°C;

b) estufa com fotoperíodo natural (12,2 e 11,1 horas durante o período do experimento) e temperatura do ambiente (temperatura máxima com extremos de 27,6 a 31,9°C e mínima com extremos de 16,2 e 0 °C durante o período do experimento). Na estufa houve aumento de 3 - 10°C em relação à temperatura máxima do ambiente e de 1-3°C em relação à temperatura mínima (ver Figs. 7 e 8 - ítem 1.3.3.4).

Observando-se a freqüência de plantas em cada classe de regeneração, sob diferentes condições de cultivo, verificamos que:

1. em fotoperíodo de 16 horas e intensidade de 440-620 $\mu W.cm^{-2}$, não há presença de plantas vigorosas, mas ocorrem plantas com ápice, sendo que a maioria de regeneração apresentou-se como folha. O número de raízes foi baixo;

2. numa mesma condição de temperatura e fotoperíodo , com diminuição de intensidade luminosa (150-160 $\mu W.cm^{-2}$ e 16-85 $\mu W.cm^{-2}$, há pouquíssimas plantas com ápice, a maioria de regeneração apresenta-se principalmente como gemas. Há maior número de raízes e um aumento do número de gema/calo, embora este aumento de regeneração se refira principalmente às gemas;

3. com temperatura não controlada, fotoperíodo natural de 12,2 e 11,1 horas e intensidade luminosa de 1000-

4000 $\mu W.cm^{-2}$ há, de modo geral, predomínio de gemas. O número de raízes é praticamente o mesmo obtido com intensidade menor (150-160 $\mu W.cm^{-2}$). Nestas condições de estufa (não controladas), obteve-se maior freqüência de gema/calo que, aliada à obtenção de plantas vigorosas, torna esta condição ambiental (maior intensidade de luz somada à variação de temperatura) a condição de cultivo mais propícia à obtenção de plantas *in vitro*, no uso do tomateiro.

Os dados descritos foram analisados e estão expostos na FIGURA 38.

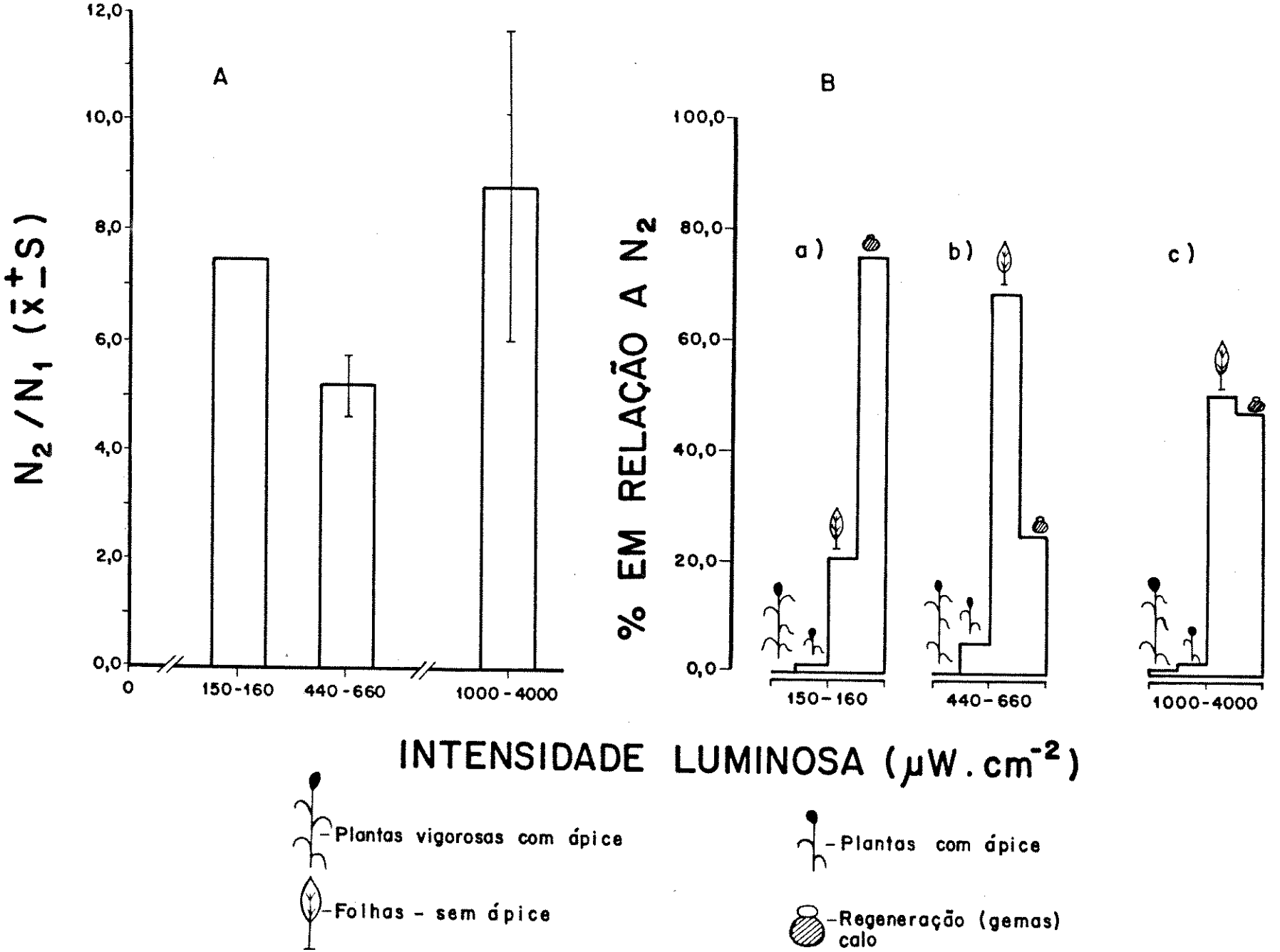
Houve boa regeneração, tanto na estufa como em foto - períodos, porém, os explantes que permaneceram na estufa apresentaram como maior freqüência de regeneração os estádios 4 e 5 (plantas com ápice), o que praticamente não ocorreu em fotope - ríodo. Em condições de estufa houve boa regeneração, utilizando-se outras regiões das plântulas estéreis como explante inicial.

FIGURA 38 - Efeito de condições ambientais na regeneração de plantas de *L. esculentum* Mill (cv. Joaquin). Explante inicial = Cotilédone recém-excisado. Avaliação após 60-80 dias de inoculação em meio primário padrão ($To-M_3$= meio de MS+AIA 25 µM + 6BA 10 µM).

A) Avaliação quantitativa em 3 condições de intensidade luminosa.

B) Avaliação qualitativa (4 classes de regeneração) em 3 condições de intensidade luminosa.

Efeito de condições ambientais na regeneração



2. Produção de plantas por variação somaclonal.

2.1. Efeito de explante inicial. Avaliação global dos experimentos realizados para variação somaclonal durante os anos de 1982 e 1983. Tomate de indústria.

Neste tópico, iremos discutir globalmente, em termos quantitativos, a regeneração em cultura primária dos experimentos realizados nos anos de 1982 e 1983, utilizando-se como fonte de explante plântulas estéreis (cotilédone, caule e folha definitiva) e folha de estufa. Os resultados serão analisados por explante inicial utilizado (TABELAS 18 a 28).

Iniciando-se com cotilédone, observou-se que empregando material vegetal proveniente de planta multiplicada (TABELA 18), a porcentagem de regeneração é extremamente variável, tanto para o material A como para o material B de "Petomech". A freqüência de regeneração (número gema/calo) foi também variável, em média 5,9. Nestes experimentos, a partir de explantes já esterilizados, a porcentagem de contaminação foi baixíssima (1,50) confirmando que este é realmente um material propício ao cultivo *in vitro*.

Com cotilédone retirado de planta regenerada R_1 (TABELA 19), para um mesmo material vegetal, por exemplo, material vegetal B, os valores da freqüência de regeneração obtida (número gema/calo) em 2 experimentos (4,0 e 3,6) apresentaram menor variação que os valores obtidos de freqüência de regeneração com cotilédone de planta multiplicada (4,7 e 9,1 - TABELA 18). Assim, parece que explante procedente de material já manipulado *in vitro*, no caso cotilédone, apresentou freqüência de regeneração mais homogênea.

Quanto à regeneração empregando caule de planta multiplicada (TABELA 20), ocorreu maior variação de regeneração quando se utilizou o material vegetal A do que o material vegetal B. Além disso, o material vegetal B apresentou *in vitro* um desempenho de regeneração inferior (% média = 2,8; freqüência = 0,5 +- 0,7) do que o material vegetal A (% média 2 13,8; frequência = 4,6 +- 1,5).

Poderia se argumentar que o pequeno número de experimentos com o material vegetal B (apenas 2) não nos pode levar a afirmações conclusivas, argumento este que realmente deve ser considerado. De qualquer modo, a melhor regeneração ocorrida com o material A é um ponto decisivo para que nos experimentos de produção de plantas, este material vegetal seja maciçamente empregado.

Um fato ainda a ser ressaltado é o desempenho do experimento Si-152/H (TABELA 20) em relação aos demais experimentos com explante inicial de caule de planta multiplicada. O experimento citado resultou em regeneração de maior freqüência e de melhor qualidade (número de razão gema/calo mais alto e estádio de regeneração mais avançado, plantas com ápice). Isto se deve, talvez, a o melhor domínio da metodologia, o que parece ser indicado pela menor porcentagem de contaminação deste experimento em relação aos demais.

Para caule, a utilização do material proveniente de plantas regeneradas (TABELA 21) melhorou o padrão de regeneração. Assim, como ocorreu para cotilédones (TABELA 20), explantes de caule provenientes do cultivar Joaquim regeneraram em maior quantidade (aumento do número gema/calo) e de melhor qualidade (aumento da ocorrência de plantas com ápice), quando comparados a " Petomech". Este fato foi particularmente mais acentuado com a utilização de caule (TABELA 21) como explante inicial.

A utilização de material de planta regenerada, n o caso de folhas de estufa, por enquanto não nos fornece ainda nenhuma conclusão (TABELAS 26 e 28). Torna-se conveniente, neste caso, um maior número de experimentos com o material de planta regenerada (R_1 e, talvez, até R_0).

Com o domínio da técnica de folha de estufa, técnica esta que resulta em regeneração, em termos numéricos, praticamente semelhante ao de caule estéril e, inclusive melhor que o obtido com folha definitiva estéril, a folha de estufa passa a se constituir em mais um manancial de explantes iniciais para exploração da variabilidade somaclonal.

Comparando-se os valores de porcentagem de contaminação,

verifica-se que as contaminações de folha de estufa na 2ª etapa e 3a. etapa se equivalem às contaminações do caule estéril e de folha definitiva asséptica. Apenas cotilédone apresentou contaminação menor.

Cotilédone, em termos quantitativos, dos explantes testados, produziu maior regeneração em cultura primária com menor contaminação, ou seja, com maior eficiência, pois com o mesmo número de explantes iniciais um número maior de calos potencialmente são capazes de regenerar e, quando efetivamente regeneram, o fazem em maior número. Disto resulta, comparativamente, uma maior produção de plantas a partir de cotilédone, em termos quantitativos. Em termos qualitativos, ou seja, quantas regenerações sobrevivem, realmente florescendo e frutificando no campo, falaremos mais tarde (ítem 2.2).

No caso da folha definitiva de planta multiplicada (TABELA 22) esta apresentou, de forma geral, regeneração baixíssima ou nula, não se constituindo, pois, na fonte de explante inicial mais propícia para produção maciça de plantas. O experimento Si-76/F nos indica, entretanto, que não devemos desprezar este tipo de explante, pois este experimento apresentou regeneração de 28,0% dos explantes, obtendo-se, inclusive, a classe de regeneração mais avançada (plantas).

Este fato parece evidenciar que haveria, talvez, variação de regeneração conforme a amostragem. Comparando-se os resultados de folha definitiva (TABELA 22) com caule (TABELA 20), que possuem 6 amostras em comum, verifica-se que para caule ocorre alguma regeneração em praticamente todos os experimentos com valores variáveis, porém, não tão discrepantes como os obtidos para folha definitiva (TABELA 22). O material vegetal também influenciou a regeneração em cultura primária: os valores mais altos obtidos para folha definitiva foram obtidos com o cultivar Joaquim.

O emprego de explante de folha definitiva a partir de planta regenerada R_1 (TABELA 23) melhorou o padrão de regeneração, principalmente do cultivar Petomech material B, aumentando tanto a porcentagem de regeneração como o número gema/calo, mas

não produzindo plantas qualitativamente melhores (plantas com ápice), como aconteceu com o emprego de caule de planta regenerada R_1 (TABELA 21).

De modo quantitativo, a porcentagem de regeneração em cultura primária de explantes obtidos de plântulas estéreis foi acentuadamente maior com cotilédone do que com folha definitiva e caule, fato que corrobora resultados anteriores (ver TABELAS 17.1 e 17.2). Esta regeneração foi influenciada pelo material vegetal que serviu como fonte de explantes: foi maior com o cultivar Joaquim nos três tipos de explante empregados e foi melhorada qualitativa e quantitativamente com material proveniente de planta regenerada R_1 em folha definitiva e principalmente caule.

Quanto aos resultados com a utilização de folha de estufa como fonte de explante inicial, estes podem ser delimitados a 3 etapas distintas: 1a. etapa - de alta contaminação (TABELA 24); 2a. etapa - diminuição da contaminação e ocorrência de regeneração (TABELAS 25 e 26) e 3a. etapa - (TABELAS 27 e 28) domínio da técnica com maior controle da contaminação, maior número de explantes iniciais inoculados por experimento e aumento do número de regeneração obtidos (% de regeneração e número gema / calo).

Na 1a. etapa a média de contaminação não nos dá uma visão real, pois 7 dos 19 experimentos tiveram contaminação total, não havendo, pois, explantes em condições de regenerar (TABELA 24). Esta contaminação total ocorreu, inclusive, em meio de placa preliminar (ver ítem 1.3.1) não tendo contato com o meio primário padrão.

A utilização da pré-incubação das folhas de estufa anterior à esterilização superficial (ver ítem 1.1.1) levou à uma diminuição de contaminação, como já foi dito anteriormente (TABELA 9) e seria a responsável, também, pela diminuição de contaminação observada (TABELA 25 - 2a. etapa). Particularmente eficientes se mostraram os experimentos Si-146/D e Si-151/D, produzindo regeneração mais avançada (plantas). O experimento Si-151/D seria, talvez, o preâmbulo do domínio da técnica que caracteriza a 3a. etapa.

Na 3a. etapa (TABELA 27) houve um aumento qualitativo da regeneração com folha de estufa, tanto em porcentagem de regeneração como em número gema/calo. Deste conjunto de experimentos, destaca-se inegavelmente o experimento Si-160/D, por sua regeneração quantitativa (% de regeneração) e qualitativa (maior ocorrência da classe de plantas com ápice).

Para obtenção das plantas, as plantas regeneradas devem passar para um meio secundário, propício ao enraizamento.

Foram testados previamente dois tipos de meio de cultura secundários: um sem sacarose, que deu como resultado 0% de enraizamento, outro com 40 g/l de sacarose, onde observou-se enraizamento profuso, com abundante ramificação. O enraizamento ocorreu em torno de 15 dias.

A passagem das plantas enraizadas para meio vermiculita pode ser seguida por etapas:

(a) apresentação do calo com plantletes regeneradas;

(b) as plantletes regeneradas do calo são separadas, podendo-se ter no mesmo calo, vários estádios de regeneração, desde o estádio 4 até o estádio 1;

(c) as diversas plantletes obtidas são catalogadas individualmente, inoculadas separadamente em meio secundário para enraizamento. O calo original é novamente cultivado no meio primário T_0-M_3. As plantletes em meio secundário, para enraizamento, são mantidas em condições naturais de luz e temperatura, em sala de laboratório.

Resumidamente, teríamos a seqüência desde o cultivo de explante inicial recém-inoculado no meio primário, início da formação do calo; início de regeneração; regeneração em meio secundário (sem hormônios, mas com sacarose), até a transferência para meio terciário (vermiculita) para aclimatação lenta e gradual, que culminará com plantas perfeitamente aclimatadas, que irão para o campo.

Das plantas R_0 foram retiradas duplicatas. Acompanhou-se o crescimento e desenvolvimento destas plantas no campo. Uma planta, por exemplo, cujo código é Si-70/F/13 apresentou crescimento vegetativo e reprodutivo superior às demais (FIGURA 39). A planta R_1 desta, cujo código passou a ser Si-158/R, também foi utilizada *in vitro* a partir de plântulas estéreis, obtendo-se regeneração a partir de cotilédone (TABELA 19); caule (TABELA 21)e folha definitiva (TABELA 23). Como já foi discutido neste ítem , a utilização deste material regenerado (R_1) melhorou quantitativa e qualitativamente o padrão de regeneração, fato este mais acentuado no caso de caule (TABELA 21).

Pelo histórico da planta Si-70/F/13 observa-se que a produção de sementes a partir de uma planta obtida *in vitro* levou 1 ano, a partir da germinação da semente original, 9 meses após inoculação em meio de cultura. Procurou-se verificar se o melhor crescimento é um caráter genético (transmitido às próximas gerações), ou se é devido às condições de cultivo *in vitro* , utilizando-se gerações R_1 e R_2, como será descrito no ítem 2.3.2.

Por esta metodologia poderá se obter plantas resistentes às toxinas de fungos, causadores de graves perdas no tomateiro. Este aspecto abre um campo vasto de pesquisas, desde o cultivo dos fungos, isolamento das toxinas, caracterização das toxinas, pressão de seleção com toxinas contidas no filtrado de cultura, regeneração de plantas em presença das toxinas e verificação da resistência, tanto nas plantas originais como em suas respectivas progênies. Os vários elos encadeados deste trabalho estão nos ítens subsequentes (nºs 3, 4, 5).

2.2. Correlação entre estádios de regeneração, enraizamento e sobrevivência no solo

Neste tópico foi feita a análise das regenerações em termos qualitativos, o que quer dizer, das regenerações obtidas em cultura primária, quantas efetivamente chegam a florescer e frutificar no solo (sobrevivência) e quais são as perdas nas fases subsequentes à regeneração: enraizamento (cultura secundária)

e aclimatação (cultura terciária).

Esta análise foi feita considerando-se:

(a) número total de plantletes por experimento, ou seja, analisando-se a regeneração como um todo;

(b) estádios de regeneração (ver ítem 1.3.3.5.2- Figuras 11 a 20), ou seja, a análise é feita separadamente por classes de regeneração, classes estas que englobam toda a gama de regeneração, desde gemas até plantas vigorosas. Esta análise mais detalhada foi feita concomitantemente com a análise total de plantletes, realizando-se, assim, uma avaliação global dos experimentos, do ponto de vista qualitativo.

Os experimentos, para ambas as análises, foram separados pelo explante utilizado: cotilédone (TABELA 29 - Número Total e Figura 30 - Estádios de Regeneração); folha definitiva (TABELA 30 - Número Total e Figura 31 - Estádios de Regeneração) e caule (TABELA 31 - Número Total e Figura 42 - Estádios de Regeneração).

TABELAS 18 a 28 - AVALIAÇÃO GERAL DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA VARIAÇÃO SOMACLONAL DURANTE OS ANOS DE 1982e1983 TOMATE DE INDÚSTRIA.

Considerou-se individualmente a data e sigla do experimento, número de explantes iniciais e a porcentagem de contaminação.A fonte de material vegetal utilizada também é mencionada. Quanto à regeneração; considerou-se a porcentagem de regeneração, nº de gemas (calos regenerados) e freqüência (porcentagem) por classe de regeneração. Utilizou-se como fonte de explante inicial plântulas estéreis e folhas de plantas crescidas em estufa, o material vegetal refere a "Petomech" (lotes 5319004 (A) e 5319006(B) e "Joaquim (E). Os valores nas tabelas se referem à média de 2 a 3 inoculações por experimento. A porcentagem de contaminação se refere à média das porcentagens de 2 a 4 avaliações por experimento. Traços significam que não houve calos viáveis e não contaminados que pudessem regenerar. Três pontos consecutivos (...) significam que não houve anotação (REY,1972). Foram calculados os desvios padrões dos valores numéricos.

TABELAS 18 - 23 - EXPLANTE INICIAL: PLÂNTULAS ESTÉREIS:

Das plântulas estéreis foram utilizados: cotilédone obtido a partir de semente de planta multiplicada (tabela 18 - total de 5 experimentos), cotilédone obtido a partir de semente de planta regenerada R_1, (tabela 19 - total de 3 experimentos); caule obtido a partir de semente de planta multiplicada (tabela 20 - total de 8 experimentos), caule obtido a partir de semente de planta regenerada R_1 (tabela 21 - (total de 3 experimentos); folha definitiva obtida a partir de semente de planta multiplicada (tabela 22 - total de 8 experimentos), folha definitiva obtida a partir da semente de planta regenerada R_1 (tabela 23 - total de 3 experimentos como explantes iniciais.

TABELAS 18 e 19. Explante inicial: cotilédone. Fonte: planta multiplicada (C) e planta regenerada R_1 (R)

Data de inoculação	Sigla do experimento	Material Vegetal	% de contaminação	Nº de explantes iniciais	REGENERAÇÃO %	nº gema/calo	Freqüência por classe (%) Gemas	Folhas	Plantas
24/11/82	Si-92/1/C	A	zero	02	100,0	10,0	...	...	...
24/11/82	Si-92/2/C	B	zero	24	35,3	4,7	...	...	...
24/11/82	Si-92/3/C	B	zero	06	100,0	9,2	...	...	...
09/12/82	Si-96/1/C	A	zero	57	zero	zero	zero	zero	zero
		Σx =	zero	89	235,3	23,8	...	...	...
		$\bar{x}$ =	zero	22,3	58,8	5,9	...	...	...
		desvio (σ-1)		25,0		4,6	...	...	...
24/05/83	Si-148/R	Pré-seleção com Alternaria A/2A/10 inicialmente B		130	31,0	3,98	0,5	83,0	16,5
21/06/83	Si-158/R	Variação somaclonal Si-170/F/13(Joaquim)	7,5	80	...	7,75	0,2	88,7	11,1
08/08/83	Si-161/R	Controle da pré-seleção com Alternaria A/2D/02(inicialmente B)	6,2	68	33,3	3,60	zero	47,2	52,8
		Σx =	32,7	278	64,6	15,3	0,7	218,9	80,3
		$\bar{x}$ =	10,9	92,7	32,7	5,1	0,2	73,0	26,8
		desvio (σ-1)		32,9	1,5	2,3			

- LEGENDA

Segundo REY (1972) : —— não ocorre regeneração por não haver sido viáveis e não contaminados que pudessem regenerar

... dado não conhecido

Tabela 20 e 21 - Explante inicial: Caule. Fonte: planta multiplicada (H) e planta regenerada R_1 (R).

Data	Sigla do experimento	Material vegetal	% de contaminação	Nº de explantes iniciais	Regeneração %	Regeneração nº gema/calo	Freqüência por classe (%) Gemas	Folhas	Plantas
24/11/82	Si-92/1/H	A	33,3	08	zero	zero	zero	zero	zero
24/11/82	Si-92/2/H	B	19,6	257	3,3	1,0	...	...	...
24/11/82	Si-92/3/H	B	45,0	55	2,5	0,02	...	...	...
24/11/82	Si-92/6/H	E	25,0	28	3,0	1,25	...	...	...
09/12/82	Si-96/1/H	A	17,0	449	5,5	0,05	...	...	...
09/12/82	Si-96/2/H	A	42,3	40	zero	zero	zero	zero	zero
13/05/83	Si-126/H	A	50,0	144	50,0	1,00	zero	100,0	zero
08/06/83	Si-152/H	A	3,5	122	13,3	3,53	25,8	67,9	6,4
		Σx =	235,8	1073	77,9	6,85	25,8	167,9	6.4
		$\bar{x}$ =	29,5	134,12	9,7	0,86	6,5	41,9	1,6
		desvio (σ-1) =		150,0		1,20			
21/05/83	Si-148/R	Pré - seleção com Alternaria A/2A/10 (inicialmente B)							
21/06/83	Si-158/R	Variação somaclonal Si-70/F/13 (E)	7,0 8,9	410 215	7,2 20,0	1,40 2,65	1,9 4,2	87,7 78,0	10,4 17,8
08/08/83	Si-161/R	Controle da pré-seleção com Alternária A/2D/02 (inicialmente B)	4,7	92	zero	zero	zero	zero	zero
		Σx =	20,2	717	27,2	4,05	6,0	165,6	28,4
		$\bar{x}$ =	6,7	239	9,1	1,35	2,0	55,2	9,5
		desvio (σ-1) =		160,3		1,33			

TABELAS 22 e 23. Explante inicial: folha definitiva. Fonte: planta multiplicada (F) e planta regenerada R_1 (R)

Data de inoculação	Sigla do experimento	Material vegetal	% de contaminação	Nº de explantes iniciais	REGENERAÇÃO %	REGENERAÇÃO nº gema/calo	Freqüência por classe (%) Plantas	Folhas	gemas
14/04/82	Si-70/F	E	7,1	14	50,0	1,3	...	...	...
07/05/82	Si-76/F	B	35,3	76	27,7	0,7	9,5	34,9	55,6
24/11/82	Si-92/1/F	A	zero	14	zero	zero	zero	zero	zero
24/11/82	Si-92/2/F	B	41,6	149	zero	zero	zero	zero	zero
24/11/82	Si-92/3/F	B	16,7	54	zero	zero	zero	zero	zero
09/12/82	Si-96/1/F	A	12,5	62	3,2	0,2	...	...	...
09/12/82	Si-96/2/F	A	65,1	132	zero	zero	zero	zero	zero
13/05/83	Si-126/F	A + B	25,2	84	zero	zero	zero	zero	zero
		Σx =	203,5	585	81,2	2,1	9,5	34,9	55,6
		$\bar{x}$ =	25,4	73,1	10,2	0,3	1,6	5,9	9,3
		desvio (σ-1)=		49,0		0,5			
21/05/83	Si-148/R	Pré-seleção com alternaria A/2A/10	25,5	134	10,9	1,0	zero	50,0	50,0
21/06/83	Si-158/R	Variação somaclonal Si-70/F/13	28,3	53	zero	zero	zero	zero	zero
08/08/83	Si-161/R	Pré-seleção em Alternaria controle	zero	06	16,7	2,0	zero	100,0	zero
		Σx =	53,8	193	27,6	3,0	zero	150,0	50,0
		$\bar{x}$ =	17,9	64,3	9,2	1,0	zero	50,0	16,7
		desvio(σ-1)=		64,8		1,0	zero		

TABELAS 24 - 28 - Avaliação geral dos experimentos realizados para variação somaclonal durante os anos de 1982 e 1983, tomate de indústria, explante = folhas de plantas de estufa.

Considerou-se individualmente a data e sigla do experimento, número de explantes iniciais e a porcentagem de contaminação. Quanto à regeneração, considerou-se a porcentagem de regeneração, freqüência (nº de gema/calo - N_2/N_1) e freqüência por classe de regeneração. Foi dada ênfase maior no ano de 1983 para este tipo de explante inicial, quer de planta multiplicada no campo (TABELA 24 refere-se a 1ª etapa, total de 19 experimentos; TABELA 25 refere-se a 2ª etapa, total de 8 experimentos; TABELA 26 refere-se a 3ª etapa, total de 5 experimentos), quer da planta regenerada na 2ª geração - R_1 (TABELA 28 refere-se a 2ª etapa, total de 4 experimentos e TABELA 28 refere-se a 3ª etapa, no qual considerou-se um experimento). O material begetal se refere a "Petomech", lotes 5319004 (A) e 5319006 (B) e "Joaquim" (E). Os valores das tabelas se referem a média de 2 a 3 inoculações por experimento. A porcentagem de contaminação se refere a média das porcentagens de 2 a 4 avaliações por experimento.

TABELA 24 . Explante inicial: folha de estufa. Fonte: planta multiplicada (D). 1a. ETAPA

Data de inoculação	Sigla do experimento	Material vegetal	% de contaminação	Nº de explantes iniciais	REGENERAÇÃO %	REGENERAÇÃO nº gema/calo	Freqüência por classe(Plantas	Folhas	gem
10/12/82	Si-97/D	A + B	77,3	302	zero	zero	zero	zero	zer
21/12/82	Si-103/D	A + B	100,0	250	-	-	-	-	-
23/12/82	Si-105/D	A + B	100,0	500	-	-	-	-	-
20/01/83	Si-110/D	A + B	100,0	473	-	-	-	-	-
21/01/83	Si-111/D	A + B	100,0	400	-	-	-	-	-
26/01/83	Si-112/D	A + B	100,0	900	-	-	-	-	-
27/01/83	Si-114/D	A + B	100,0	850	-	-	-	-	-
28/01/83	Si-115/D	A + B	100,0	800	-	-	-	-	-
02/02/83	Si-116/D	A + B	71,8	950	-	-	-	-	-
03/02/83	Si-117/D	A + B	62,0	650	10,7	...	...	...	...
03/02/83	Si-118/D	A + B	39,4	900	-	-	-	-	-
04/02/83	Si-120/D	A + B	80,5	400	-	-	-	-	-
11/02/83	Si-122/D	A + B	45,0	250	-	-	-	-	-
24/02/83	Si-125/D	A + B	58,1	800	-	-	-	-	-
25/02/83	Si-127/D	A + B	72,0	650	-	-	-	-	-
03/03/83	Si-128/D	A + B	51,8	500	-	-	-	-	-
05/03/83	Si-129/D	A + B	54,0	500	-	-	-	-	-
11/03/83	Si-134/D	A + B	50,8	750	...	...	...	...	...
12/03/83	Si-135/D	A + B	57,3	900	zero	zero	zero	zero	zero
		Σx =	1420,0	11.725	10,7	zero	zero	zero	zero
		$\bar{x}$ =	74,7	617,1	3,5	zero	zero	zero	zero
		desvio(σ-1) =		237,	...	zero	...	...	...

TABELAS 25 e 26. Explante inicial: folha de estufa. Fonte: planta multiplicada (D) e planta regenerada R_1 (R)
2a. ETAPA

Data de inoculação	Sigla do experimento	Material vegetal	% de contaminação	Nº de explantes iniciais	REGENERAÇÃO %	REGENERAÇÃO nº gema/calo	Freqüência por classe (%) Plantas	Folhas	gemas
29/03/83	Si-140/D	A + B	31,6	750	5,7	3,4	zero	80,	19,3
30/03/83	Si-141/D	A + B	32,7	550	...	...	zero	100,0	zero
08/04/83	Si-143/D	A + B	42,9	750	...	...	...	...	...
14/04/83	Si-145/D	A + B	34,2	650	14,0	4,0	zero	57,1	42,
21/04/83	Si-146/D	A + B	15,8	650	2,3	1,8	5,00	60,0	35,0
29/04/83	Si-149/D	A + B	49,9	650	...	...	...	...	...
06/05/83	Si-150/D	A + B	45,1	700	1,5	...	...	...	...
07/05/83	Si-151/D	A + B	25,3	750	6,3	2,4	13,5	64,9	21,6
		Σx =	277,2	5450	30,0	11,7	18,5	362,7	118,8
		$\bar{x}$ =	34,7	681,3	6,0	2,9	3,7	72,5	23,8
		desvio (σ-1) =		70,4	1,0				
26/03/83	Si-138/R	Variação somaclonal A + B	78,5	150	...	...	...	...	...
14/04/83	Si-144/R	idem	70,5	650	...	...	...	...	...
22/04/83	Si-147/R	Variação somaclonal Si-77/C/63 (A)	38,0	600	...	...	...	...	...
28/04/83	Si-148/R	Pré-seleção com alternaria A/2A/10 (inicialmente B)	79,4	700	...	...	...	...	...
		Σx =	266,4	2100	...	...	...	...	...
		$\bar{x}$ =	19,5	525	...	...	...	...	...
		desvio (σ-1)		253,3		...			

TABELAS 27 e 28. Explante inicial: folha de estufa. Fonte: planta multiplicada (D) e planta regenerada R_1 (R) 3a. ETAPA

Data de inoculação	Sigla do experimento	Material Vegetal	% de contaminação	Nº de explantes iniciais	REGENERAÇÃO %	REGENERAÇÃO nº gema/calo	Freqüência por classe (%) Plantas	Folhas	gemas
27/05/83	Si-157/D	A + B	13,7	276	10,7	2,3	zero	14,3	85,7
30/06/83	Si-160/D	A + B	32,7	1000	41,4	3,5	15,5	76,2	8,3
13/07/83	Si-162/D	A + B	40,9	1000	1,0	9,0	zero	66,7	33,3
18/07/83	Si-163/D	A + B	27,4	900	15,7	4,9	1,8	42,2	56,0
05/08/83	Si-166/D	A + B	15,6	1000	20,8	7,2	zero	53,2	46,8
		Σx =	130,3	4176	89,5	26,9	17,3	252,54	230,2
		$\bar{x}$ =	26,1	835,2	17,9	5,4	3,5	50,51	46,0
		desvio (σ-1) =	-	315,6	-	2,7	-	-	-
12/05/83	Si-153/R (planta B_2 do item de resistência)	Variação somaclonal de B + pré-seleção em Alternaria A/2B/07 (inicialmente B)	9,8	1000	zero	zero	zero	zero	zero

HISTÓRICO DA PLANTA R_0

Si-70/F/13

Planta original

germinação - 15/01/82

submeristema em meio sem fitor reguladores - 10/02/82

Folha definitiva em meio de regeneração (primário - 10/04/82)

Retirada de gema para enraizar.
Estádio 3 (apresenta sem ápice)
Folhas verdes grandes - 23/07/82

Passagem para vermiculita.
Estádio: 13 raízes
5 folhas inteiras
bem verdes, bordos
inteiros
Condições: sala de laboratório
(condições não controladas)

Ida para campo, embaixo de árvore - 22/10/82

Plantio no solo - 25/10/82

Início de abertura - 01/12/82
de flor

Flor aberta - 09/12/82

1º Fruto - 14/12/82

Observação: Crescimento desta planta é mais vigorosa que as demais plantadas na mesma data -(30/12/82).

Fenologia - 20/01/83
Planta incorpada, 1 fruto vermelho + 9 frutos verdes.
Fruto arredondado. Demais frutos verdes, 2-4 frutos

Duplicata

Submeristema da planta regenerada enraizada.

Retirada do submeristema de planta regenerada enraizada - 27/08/82

Passagem para vermiculita 08/10/82
Estádio: 11 raízes
6 cm de comprimento
4 folhas partidas típicas
7 cm de altura
Sala de cultivo

Início de aclimatação - 11/10/82
Retirada do zapp

Levada ao ar livre - 22/10/82

Plantio no solo - 24/11/82

Flor aberta e botões - 14/12/82

Observação: Crescimento desta planta é mais vigorosa que as demais plantadas na mesma data. (30/12/82)

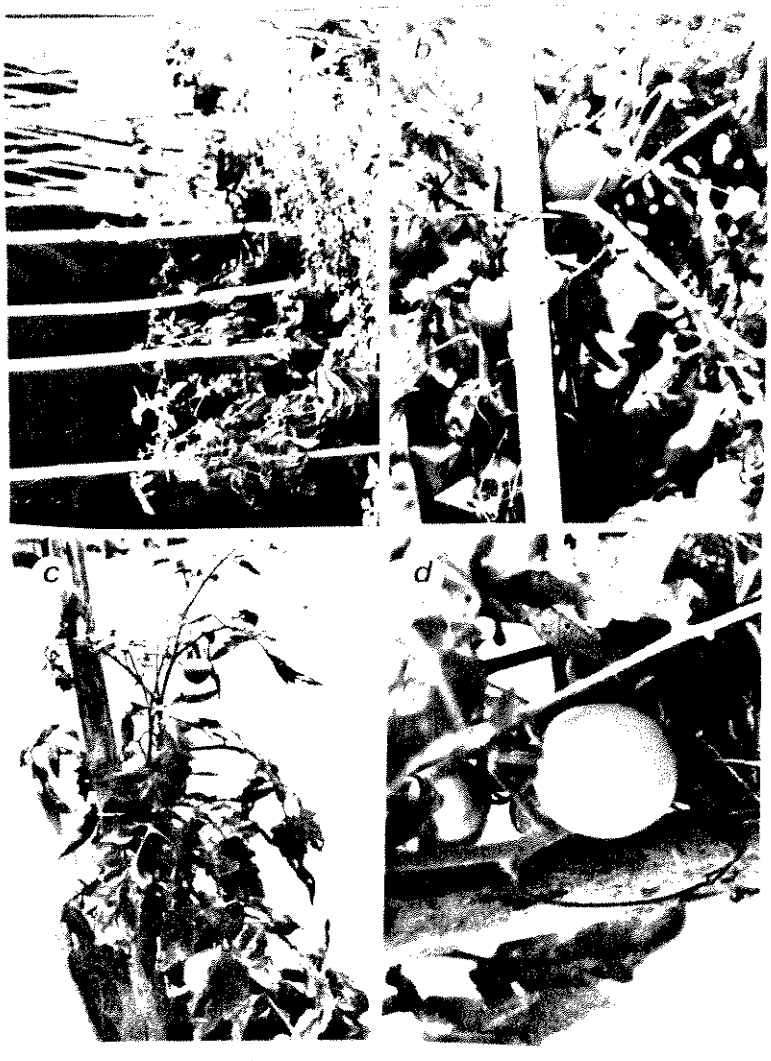
Fenologia: Planta incorporada. 1 Fruto vermelho + 8 frutos verdes. - Demais só tem frutos verdes, geralmente 12 frutos, raramente chegando a 5. Fruto arredondado tipo Santa Cruz.
(20/01/83)

FIGURA 39 - ASPECTO DA PLANTA R_0 OBTIDA DE CULTURA DE TECIDOS APRESENTANDO CRESCIMENTO VIGOROSO NO CAMPO.

Documentação após 5 meses e meio da obtenção da planta regenerada em meio primário (6-BA 10 µM e AIA 25 µM). Fonte inicial de explante = folha definitiva de plântula crescida assepticamente. Material vegetal = "Joaquim". Código da planta R_0 = Si-70/F/13. Progênie desta planta (geração R_1) foi testada tanto para cultivo *in vitro* (Si-158/R) como para teste de resistência *in vivo* (D_1).

(a) Aspecto geral de planta original, à esquerda. Apresenta crescimento mais vigoroso que as demais plantas regeneradas.

(b) Aspecto dos frutos ("Red" e "Light Red") com:
Fruto 1 - Índice de forma = 1,47;
Fruto 2 - Índice de forma = 1,20.
O Fruto 1 apresenta gretamento, consequência de desiquilíbrios fisiológicos (hídricos ou outros fatores) que provocam o desenvolvimento súbito do fruto.



(c) Aspecto geral de planta duplicata (propagação vegetativa) da planta regenerada.

(d) Aspecto do fruto da planta duplicata, sem gretamento. A presença de gretamento do fruto original se deveria, pois, a um distúrbio fisiológico sem conotação genética.

TABELAS 29 a 31 - Correlação do número total de plantletes por experimento, com o número de plantletes enraizadas, perdas destas na fase de enraizamento e aclimatação e com a sobrevivência (nº de plantas no solo). A porcentagem de plantletes, em relação ao total de plantletes, em cada situação mencionada também é citada:

Material vegetal empregado:

A = "Petomech" 5319004 original

B = "Petomech" 5319006 original

C = "Petomech" 5319004 multiplicado

E = "Joaquim"

Nº de plantletes = perdas na fase de enraizamento + perdas na fase de aclimatação + plantas no solo

Enraizados = perdas na fase de aclimatação + plantas no solo

Tabela 29 - Explante inicial: cotilédone (C)

Tabela 30 - Explante inicial: folha definitiva (F)

Tabela 31 - Explante inicial: caule (H)

TABELA 29

Explante inicial = cotilédone.

Cultivar	Código do Experimento	Número de Plantletes Obtidas N_2	Número de Plantletes Enraizadas N_3	Número de Perdas na Fase de Enraizamento	Número de Perdas na Fase de Aclimatação	Sobrevivência Plantas no solo N_5
Híbrido Joaquin	Si-70/C	5	4	1	4	0
	Si-71/C	24	12	12	12	0
	Si-74/C	187	181	6	175	6
	Σx	216	197	19	191	6
	$\bar{x} \pm S$	72,0 ± 100,0	65,7 ± 99,9	6,3 ± 5,5	63,7 ± 96,5	2,0 ± 3,4
	% em relação a N_2	100,0	91,2	8,8	88,4	2,8
Petomech 5319004 original	Si-92-1/C	8	5	3	2	3
	Si-96-1/C	1	1	0	1	0
	Σx	9	6	3	3	3
	$\bar{x} \pm S$	4,5 ± 4,9	3,0 ± 2,8	1,5 ± 2,1	1,5 ± 0,7	1,5 ± 2,1
	% em relação a N_2	100,0	66,7	33,3	33,4	33,3
5319006 original	Si-75/C	41	12	29	12	0
	Si-76/C	6	4	2	4	0
	Si-77/C	159	115	44	105	10
	Si-78/C	152	102	50	100	2
	Si-79/C	8	4	4	4	0
	Si-81/C	24	19	5	17	2
	Si-83/C	84	73	11	70	3
	Si-92-2/C	11	2	9	1	1
	Si-92-3/C	19	8	11	4	4
	Si-92-5/C	5	3	2	1	2
	Si-92-6/C	3	3	0	1	2
	Si-115/C	5	5	0	4	1
	Σx	517	350	167	323	27
	$\bar{x} \pm S$	43,1 ± 57,2	29,1 ± 42,0	15,2 ± 17,6	26,9 ± 40,1	2,3 ± 2,7
	% em relação a N_2	100,0	67,7	32,3	62,5	5,2
Σx Total		742	553	189	517	36
$\bar{x}$ Total		43,6	32,5	11,1	30,4	2,1
S Total		62,0	52,8	15,3	50,9	2,6
% em relação a N_2 total		100,0	74,5	25,5	69,7	4,8

Porcentagem geral de sobrevivência = $\frac{N_5 100}{N_2} = 4,8$

N_2 = Perdas em ambas as fases + N_5

N_3 = Perdas na fase de aclimatação + N_5

TABELA 30 - Material vegetal original

Si-69 = "Joaquim"	Si-83 = B
Si-70 = "Joaquim"	Si-84 = B
Si-71 = "Joaquim"	Si-85 = B
Si-74 = "Joaquim"	
Si-76 = B	Si-92-2 = B
Si-77 = B	Si-96-2 = B
Si-78 = B	
Si-79 = B	

Enraizamento = perdas na fase de aclimatação + plantas no solo

Nº de plantletes= Σ perdas na fase de enraizamento, perda na fase de aclimatação + plantas no solo

Tabela 30. Explante inicial = Folha definitiva.

Cultivar	Código do Experimento	Número de Plantletes		Número de Perdas na Fase de		Sobrevivência Plantas no solo
		Obtidas N_2	Enraizadas N_4	Enraizamento	Aclimatação	N_5
Híbrido Joaquin	Si-69/F	3	0	3	0	0
	Si-70/F	45	24	21	20	4
	Si-71/F	59	33	26	24	9
	Si-74/F	9	3	6	2	1
	Σ x	11,6	60	56	46	14
	$\bar{x} \pm S$	29,0 ± 27,3	15,0 ± 16,1	14,0 ± 11,2	11,5 ± 12,3	3,5 ± 4,0
	% em relação a N_2	100,0	51,7	48,3	39,6	12,1
Petomech 5319004	Si-96-2/F	4	2	2	2	0
	% em relação a N_2	100,0	50,0	50,0	50,0	0,0
5319006	Si-76/F	9	0	9	0	0
	Si-77/F	2	2	0	1	1
	Si-78/F	33	27	6	26	1
	Si-79/F	10	1	9	1	0
	Si-83/F	2	0	2	0	0
	Si-84/F	33	6	27	3	3
	Si-85/F	7	1	6	1	0
	Si-92-2/F	2	1	1	1	0
	Σ x	98	38	60	33	5
	$\bar{x} \pm S$	12,3 ± 13,2	4,8 ± 9,2	7,5 ± 8,6	4,1 ± 8,9	0,6 ± 1,1
	% em relação a N_2	100,0	38,8	61,2	61,2	5,1
	Σ x Total	218	100	118	81	19
	$\bar{x}$ Total	16,8	7,7	9,1	6,2	1,5
	S Total	19,1	11,8	9,4	9,9	2,6
	% em relação a N_2	100,0	45,9	54,1	37,2	8,7

Porcentagem geral de sobrevivência = $\frac{N_5 100}{N_2} = 8,7$

TABELA 31 - Material vegetal

Si-85 = B original
Si-92-1 = A original
Si-92-3 = B original
Si-92-5 = B original
Si-92-6 = "Joaquim"
Si-95 = A multiplicado
Si-96-1 = A original
Si-96-2 = A Original
Si-113 = B original

$$\text{Enraizamento} = \frac{\text{perdas na fase de aclimatação} + \text{plantas no solo}}{\text{Nº de plantletes}} = \frac{\Sigma \text{ perdas de fases de enraizamento e aclimatação} + \text{sobrevivência}}{}$$

Tabela 31 - Explante inicial - caule.

Cultivar	Código do Experimento	Número de Plantletes		Perdas na fase de		Sobrevivência Plantas no solo
		Obtidas N_2	Enraizadas N_3	Enraizamento	Aclimatação	N_5
Híbrido	Si-92-6/H	2	2	0	1	1
Joaquin	% em relação a N_2	100,0	100,0	0,0	50,0	50,0
Petomech						
5319004	Si-92-1/H	1	0	1	0	0
original	Si-96-1/H	15	13	2	5	8
	Si-96-2/H	2	1	1	0	1
	Σx	18	14	4	5	9
	$\bar{x} \pm S$	3,0 ± 7,8	4,7 ± 7,2	1,3 ± 0,6	1,7 ± 2,9	3,0 ± 4,3
	% em relação a N_2	100,0	77,8	22,2	27,8	50,0
5319004						
multiplicado	Si-95/H	8	5	3	2	3
5319006						
original	Si-85/H	5	4	1	4	0
	Si-92-2/H	6	0	6	0	0
	Si-92-3/H	3	1	2	1	0
	Si-92-5/H	2	1	1	1	0
	Si-113/H	14	11	3	10	1
	Σx	30	17	13	16	1
	$\bar{x} \pm S$	6,0 ± 4,7	3,4 ± 4,5	2,6 ± 2,1	3,2 ± 4,1	0,2 ± 0,4
	% em relação a N_2	100,0	56,7	43,3	53,4	3,3
	Σx Total	58	38	20	24	14
	$\bar{x}$ Total	5,8	3,8	2,0	2,4	1,4
	S Total	100,0	4,6	1,7	3,1	2,5
	% em relação a N_2	100,0	65,5	34,5	41,4	24,1

Porcentagem geral de sobrevivência = $\frac{N_5 100}{N_2}$ = 24,1

Com o cotilédone, plantletes do cultivar Joaquim enraizaram em maior número que os cultivares Petomech. Dentro de "Petomech" houve diferença de enraizamento entre os lotes, sendo que o lote B apresentou menor enraizamento. Joaquim, com este tipo de explante inicial, apresentou grande perda na fase de aclimatação. Cultivar empregado, com o mesmo tipo de explante inicial e mesmo meio de cultura e condições de cultivo determinou o destino das plantletes desde o enraizamento até o solo.

Este fato fica evidenciado quando se observa também outros tipos de explantes iniciais: folha definitiva e internós do caule, com os mesmos cultivares. Novamente, plantletes de "Joaquim" enraizaram em maior número e atravessaram as fases delicadas de enraizamento e aclimatação com menores insucessos, o que resultou em melhor sobrevivência das plantas regeneradas deste cultivar em relação às do grupo "Petomech".

Dentro dos lotes de "Petomech" as plantletes diferiram entre si. Plantletes do lote A enraizaram em maior número em relação ao lote B, independente do explante inicial empregado (folha definitiva ou caule). Com caule, observa-se que a diferença de sobrevivência de plantletes oriundas dos 2 lotes é mais marcante, lote A resultando em melhor sobrevivência.

As variações observadas dentro de cada cultivar não nos permitem fazer afirmações categóricas, mas os dados parecem indicar que além da fonte de explante inicial influir na regeneração e sobrevivência da plantlete até a fase de cultivo no solo, há influência também do cultivar, e até mesmo do lote do cultivar empregado.

O alto grau de variabilidade de regeneração entre explantes foliares individuais encontrada em L. esculentum não permitiu a CHKI et al. (1978) fazer afirmações categóricas sobre diferenças na capacidade de regeneração entre as linhas parentais e os respectivos híbridos.

BARBIER & DULIEU em 1980 (apud LARKIN & SCOWCROFT,1981), observaram a freqüência (expressa por porcentagem) de plantas regeneradas diretamente de explantes cotiledonares (em culturas por 30 dias), de cotilédones derivados de calos cultivados em estádio indiferenciado por 135, 180 ou 225 dias desde a iniciação do calo até a formação de plantlete e entre plantas regeneradas a partir de protoplastos de cotilédone, sempre com o mesmo material vegetal: tabaco. Os autores encontram que a freqüência de mutações nos 2 locos a_1 e j_g que afetam a análise de clorofila foi máxima nas plantas derivadas de protoplastos e de culturas jovens e permaneceu estável entre as plantas regeneradas de calos mais velhos. BARBIER & DULEIU concluiram que o evento mutacional pré-existiu nas células de cotilédone, tanto como uma mutação funcional ou como uma lesão no DNA das células latentes do cotilédone, as quais na diferenciação são reparadas e expressas conforme a segregação mitótica.Para LARKIN & SCOWCROFT (1981) parece ser difícil distinguir entre variação pré-existente nas células cotiledonares e a gerada durante as fases iniciais da cultura.

Por outro lado, os resultados de BARBIER & DULIEU quanto as variantes clorifílicas mutáveis e variantes de forma foliar e forma morfológica aumentaram em freqüência em culturas prolongadas. Uma análise citogenética revelou alguma poliploidização, que foi independente da classe de variante observada.

Para LARKIN & SCOWCROFT (1981), os resultados de freqüência (%) de plantas variantes obtidas em tabaco estão de acordo com o fenômeno de variação somaclonal denominado que estes autores, já que BARBIER & DULIEU (1980) textualmente afirmam que "a regeneração permite a expressão da variabilidade potencial acumulada nas células em repouso após o último ciclo celular; também se acumula variabilidade em células cultivadas".

FIGURAS 40-42 - Correlação entre estádios de regeneração, enraizamento, anômalos, aclimatação e número de plantas no solo (sobrevivência). Material vegetal mencionado anteriormente (TABELAS 29-31). A freqüência dos estádios é expressa em porcentagem (%).

a) Porcentagem de regenerados por estádios, em relação ao total de regenerados (N_2) considerado como 100% (n).

b) Porcentagem de enraizados por estádios, em relação ao total de enraizados (N_3), considerado como 100% (n).

c) Porcentagem de anômalos por estádios, em relação ao total de anômalos, considerado como 100%.

d) Porcentagem de perdas na fase de enraizamento por estádios, em relação ao total de perdas na fase de enraizamento, considerado como 100%.

e) Porcentagem de perdas na fase de aclimatação, por estádios em relação ao total de perdas na fase de aclimatação, considerado como 100 % (n).

f) Porcentagem de plantas no solo por estádios, em relação ao total de plantas no solo (N_4) considerado como 100% (n).

FIGURA 40 - Explante inicial = cotilédone.

FIGURA 40

EXPLANTE INICIAL = COTILÉDONE

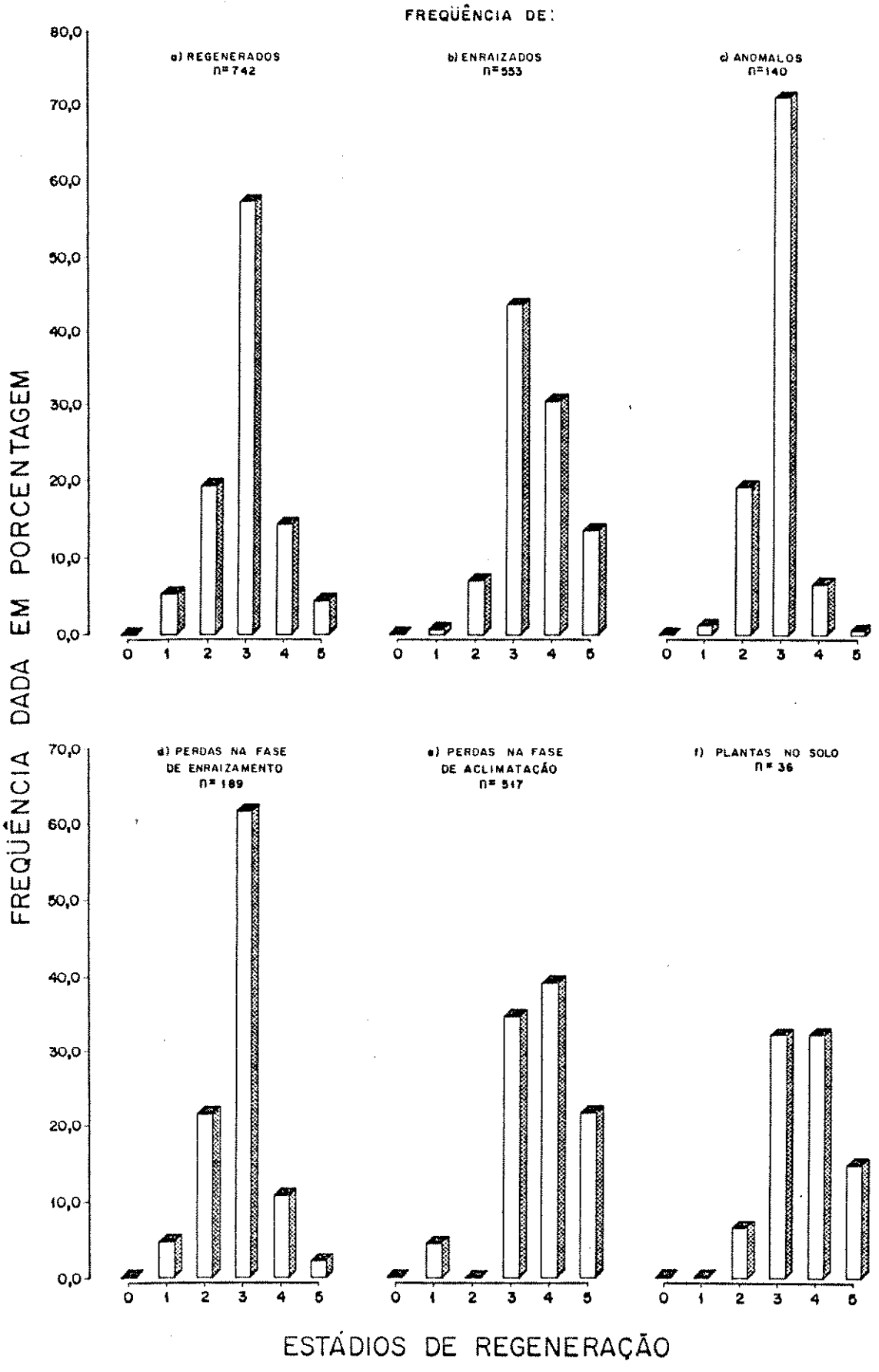


FIGURA 41

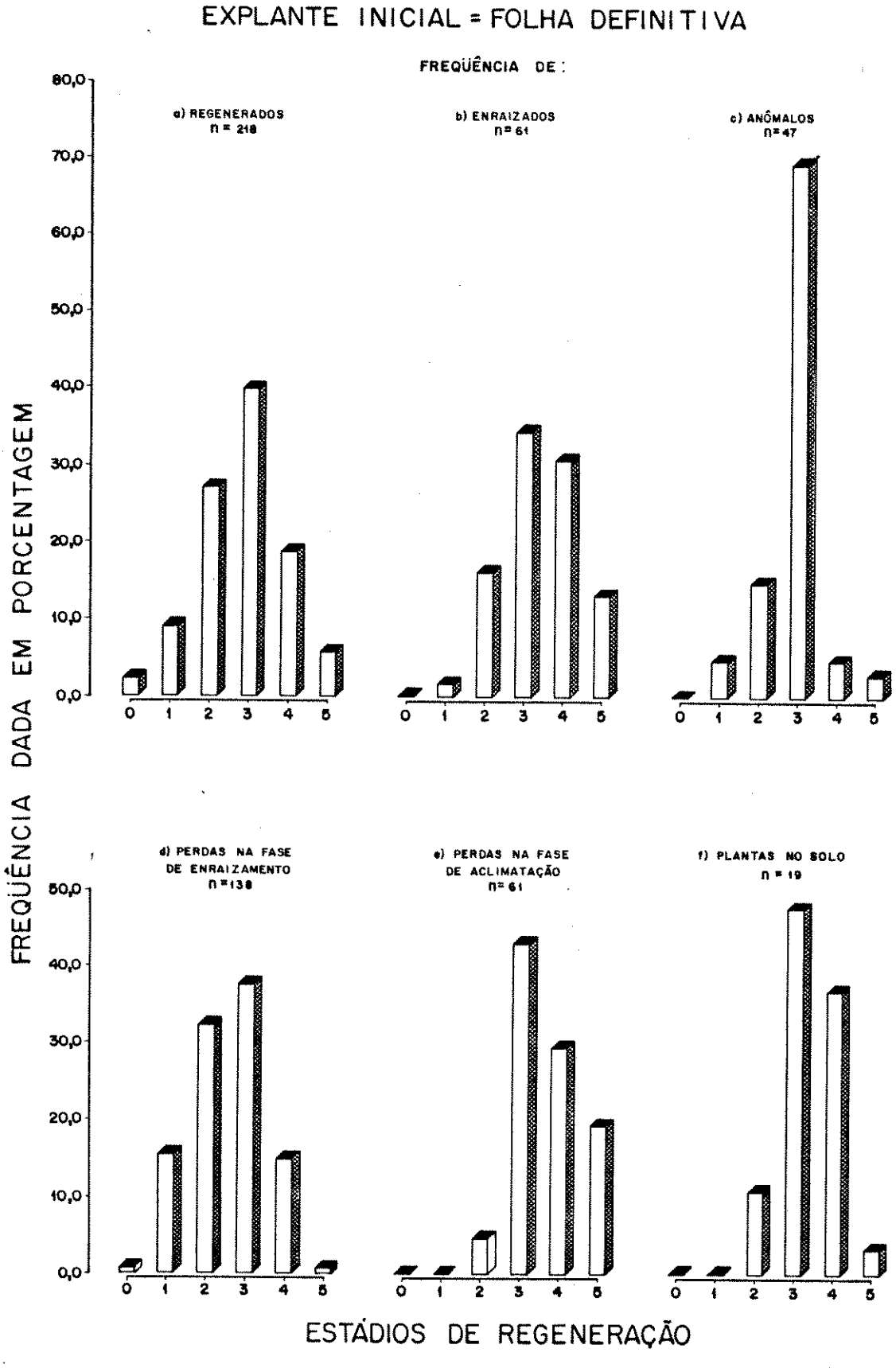


FIGURA 41 - Correlação entre estádios de regeneração, enraizamento, anômalos, aclimatação e número de plantas no solo. Explante inicial = folha definitiva.

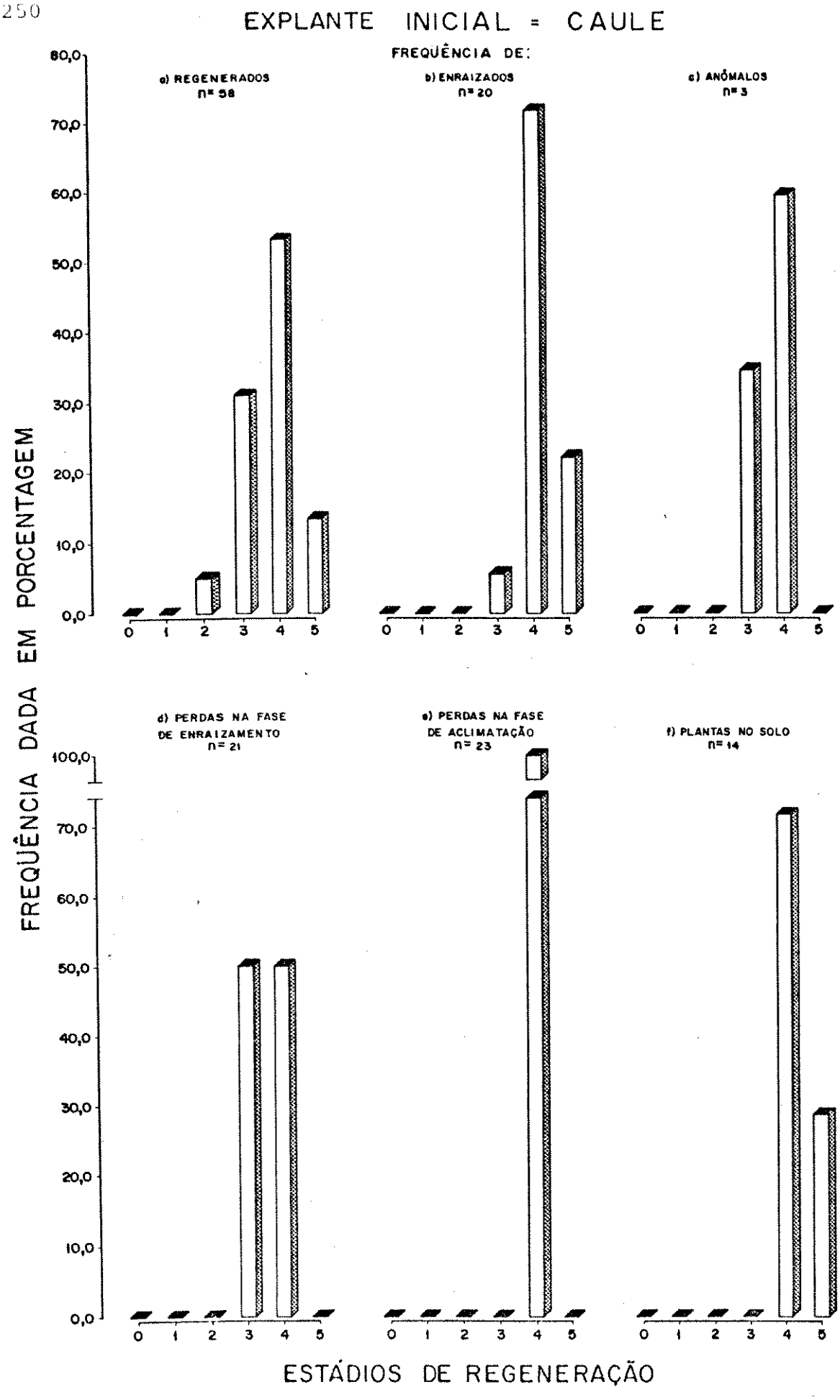


FIGURA 42 - Correlação entre estádios de regeneração, enraizamento, anômalos, aclimatação e número de plantas no solo. Explante inicial = caule.

Observando-se o conjunto dos resultados dos experimentos de correlação, verifica-se que, em relação ao número total de plantas (TABELAS 29 a 31), houve maior regeneração com cotilédone do que com folha definitiva e caule, fato esse já observado várias vezes anteriormente. Porém, houve, inversamente, um aumento do enraizamento e, principalmente, de plantas no solo, com a diminuição do número de plantletes, utilizando-se folha definitiva e, principalmente, caule (que apresentou o menor número de plantas regeneradas).

Quanto à correlação entre regeneração e sobrevivência, mais detalhadamente, através dos estádios, verificamos que:

1) com COTILÉDONE (Figura 40), só não houve regeneração no estádio zero. No estádio 1, houve pequeno enraizamento, que foi completamente perdido na fase de enraizamento e aclimatação. A sobrevivência das regenerações no estádio 3 foi baixa em relação à regeneração obtida. Os estádios 4 e 5 apresentaram melhor desempenho de enraizamento em relação à regeneração (compare Fig. 40a e Fig 40b), embora tenham sofrido perdas na fase de enraizamento e aclimatação (Figs. 40d e 40e), e apresentaram sobrevivência praticamente semelhante ao estádio 3, que correspondeu à cerca de 60% das regenerações (Fig. 40a). Este estádio, que se caracteriza por regeneração de folha, sem ápice, apresentou grande perda na fase de enraizamento (Fig.40d). É interessante ressaltar que, a regeneração classificada como estádio 2 (diferenciação somente de folha, com cerca de 1 cm e pecíolo), foi apta a passar pelas fases de enraizamento e aclimatação, sobrevivendo no campo (Fig. 40f). De modo geral, para cotilédone, regenerações dos estádios 4 e 5 (plantas com ápice) apresentaram melhor sobrevivência ;

2) com FOLHA DEFINITIVA (Figura 41), houve regeneração em todos os estádios (Fig. 41a) enquanto enraizamento só não ocorreu no está-

dio zero, aquele que corresponde a gemas de 1-2mm (fig. 41b). Como observado para cotilédone, a sobrevivência só aconteceu para os estádios 2, 3, 4 e 5 (fig. 41f). Novamente, como cotilédone, os estádios 4 e 5 apresentaram melhor enraizamento e menor perda nesta fase em relação aos demais estádios (basta comparar fig. - 41a, Fig. 41b e Fig. 41d). Parece haver uma tendência que indica, como em cotilédone, que o estádio 4 será o estádio mais propício à produção de plantas, pois, este em relação ao total, teve a porcentagem de plantas no solo duplicada em relação à porcentagem inicial de regeneração (20,0%), assim 40% das plantas - no solo, para folha definitiva), provieram do estádio 4. O mesmo não se pode dizer do estádio 5 que teve, comparativamente,uma atuação medíocre;

3) Com CAULE (Fig. 42) só houve regeneração a partir do estádio 2. Para caule houve um deslocamento do pico de regeneração, que do estádio 3 para explantes foliares, passou a ser constituído pelo estádio 4 (fig. 42c). Este estádio teve um enraizamento excelente (Fig. 42b). As perdas, nesta série de experimentos com caule, foram dos estádios 3 e 4 em enraizamento (fig. 42d) e totalmente do estádio 4 em aclimatação (fig. 42e). Mesmo assim, as plantas no solo foram predominantemente do estádio 4 (fig. 42f). Plantletes do estádio 5 enraizaram tão bem que passaram incólumes - pela fase de enraizamento e aclimatação (fig. 42 d, e) chegando ao solo, florescendo e frutificando. O mesmo destino não tiveram as plantletes regeneradas no estádio 3 que apresentaram pequeno enraizamento (Fig. 42 a,b) e sucumbiram completamente na fase de enraizamento (Fig. 42d). Nesta série de experimento com

caule é indiscutível o domínio do estádio 4 na sobrevivência das plantas. No caso de explante caulinar, regenerações do estádio 2 não sobreviveram até a fase de solo, ao contrário do ocorrido com os explantes foliares, nos quais plantletes provenientes desta classe de regeneração obtiveram êxito. De modo geral, para - caule, apenas plantletes regeneradas com ápice sobreviveram, chegando até solo, as demais classes de regeneração, sucumbiram.

Os resultados parecem indicar que o aumento de plantas no solo, não estaria diretamente ligado ao nº original de regenerações (tabelas 29 a 31) mas sim a um aumento de sobrevivência das plantletes dos estádios 4 principalmente e em menor escala 5. A sobrevivência notadamente no estádio 4 foi progressivamente maior de cotilédone, folha definitiva e caule (figuras 40 a 42), o que talvez explicasse a porcentagem de plantas no solo progressivamente mais alta em folha definitiva (cerca de 2 vezes) e em caule (cerca de 5 vezes) em relação ao cotilédone, mesmo este apresentando quantitativamente maior regeneração (maior cerca de 2,5 vezes em relação à folha definitiva e 7,5 vezes em relação ao caule).

Poderia se pensar que a maior sobrevivência de plantas provindas de caule seria devido a menor ocorrência de estruturas anômalas (5,2% do total) formadas a partir deste explante, do que as estruturas anômalas formadas a partir de cotilédone (18,9% do total) e da folha definitiva (21,5% do total).

Para verificar-se este ponto, foi feita também uma avaliação de sobrevivência, considerando-se a freqüência (expressa em porcentagem) de plantletes anômalas regeneradas nos diferentes explantes iniciais, considerando-se: enraizamento, perdas na fase de enraizamento e na fase de aclimatação, bem como, a sobrevivência (plantas no solo). Esta avaliação pode ser vista na TABELA 32.

As estruturas anômalas regeneradas a partir de cotilédone e folha definitiva, embora sofressem perdas na fase de enraizamento e aclimatação, alcançaram a fase de solo, sobrevivendo, florescendo e frutificando. Considerando-se, também, o estádio de regeneração da plantlete anômala, verifica-se que, tanto para cotilédone como para folha definitiva, a maior freqüência de estruturas anômalas ocorrem no estádio 3 (Figs. 40 e 41), estádio este que não foi o mais favorável à sobrevivência. Dado mais intrigante é o de que as estruturas anômalas oriundas de caule, que foram predominantes de estádio 4 (Fig. 42), embora enraizadas, sucumbiram na fase de enraizamento, não chegando ao solo. Freqüência maior no estádio 4 parece favorecer a sobrevivência (compare Figs. 40, 41 e 42), fato mais evidenciado quando se utiliza caule, mas que não foi verdade para estruturas anômalas também obtidas de caule.

Não se pode dizer, de modo geral, que a anomalidade seja uma das principais causas de perdas de plantas regeneradas, pois, algumas destas estruturas sobrepujam as delicadas fases de enraizamento e aclimatação, chegando ao solo.

Tabela 32. - Avaliação da freqüência (expressa em porcentagem) de estruturas anômalas, a partir de diferentes explantes iniciais, considerando-se: enraizamento, perdas na fase de enraizamento e na fase de aclimatação e sobrevivência (plantas no solo).

Explante inicial	Enraizamento	Porcentagem de Perdas nas fases de		Sobrevivência
		Enraizamento	Aclimatação	
Cotilédone	12,7	50,0	2,8	2,1
Folha definitiva	23,8	64,3	9,5	2,4
Caule	20,0	20,0	0,0	0,0

Houve várias formações de anomalias nas regenerações . Uma delas foi o aparecimento de folhas trifoliolada (Fig. 43). ZIV et al. (1982) usaram, no tomateiro, o marcador morfológico que, no estado recessivo forma folhas trifolioladas, em estudos de regeneração a partir de antera.

Os autores observaram que na progênie de plantas heterozigotas para esta característica, 10% das plantas diplóides obtidas eram trifolioladas. ZIV et al. (1982), concluiram que os mutantes regenerados trifoliares eram de origem esporogênica, sendo desta forma, plantas homozigotas dihaplóides, ao contrário do que fora observado anteriormente na literatura.

No nosso estudo, fato interessante foi de que a formação de folha trifoliolada foi um caso raríssimo, tendo ocorrido apenas na primeira folha regenerada e não nas demais. Devemos chamar a atenção para o fato de que se obteve, também, quando se utilizou meio seletivo (filtrado de cultura de fungo), as primeiras folhas regeneradas com morfologia diferente das demais. Neste último caso, as folhas tinham o formato loboso e se apresentaram mais avermelhadas (provavelmente devido a um aumento de síntese de antocianinas). Em ambos os casos de modificação morfológica das folhas trifolioladas ou lobosas, este fenômeno se restringiu às primeiras folhas regeneradas; as demais apresentaram a morfologia externa típica da folha de tomateiro. Não se considerou, pois, estes casos como plantas anômalas. Plantas anômalas foram consideradas aquelas que apresentaram aspecto permanentemente anômalo, desde a regeneração (Fig. 17 - ver Estádios de Regeneração) até o desenvolvimento (Fig. 46 - Precocidade de frutificação de planta provinda de 2a. geração R_1 obtida de cultura de tecidos).

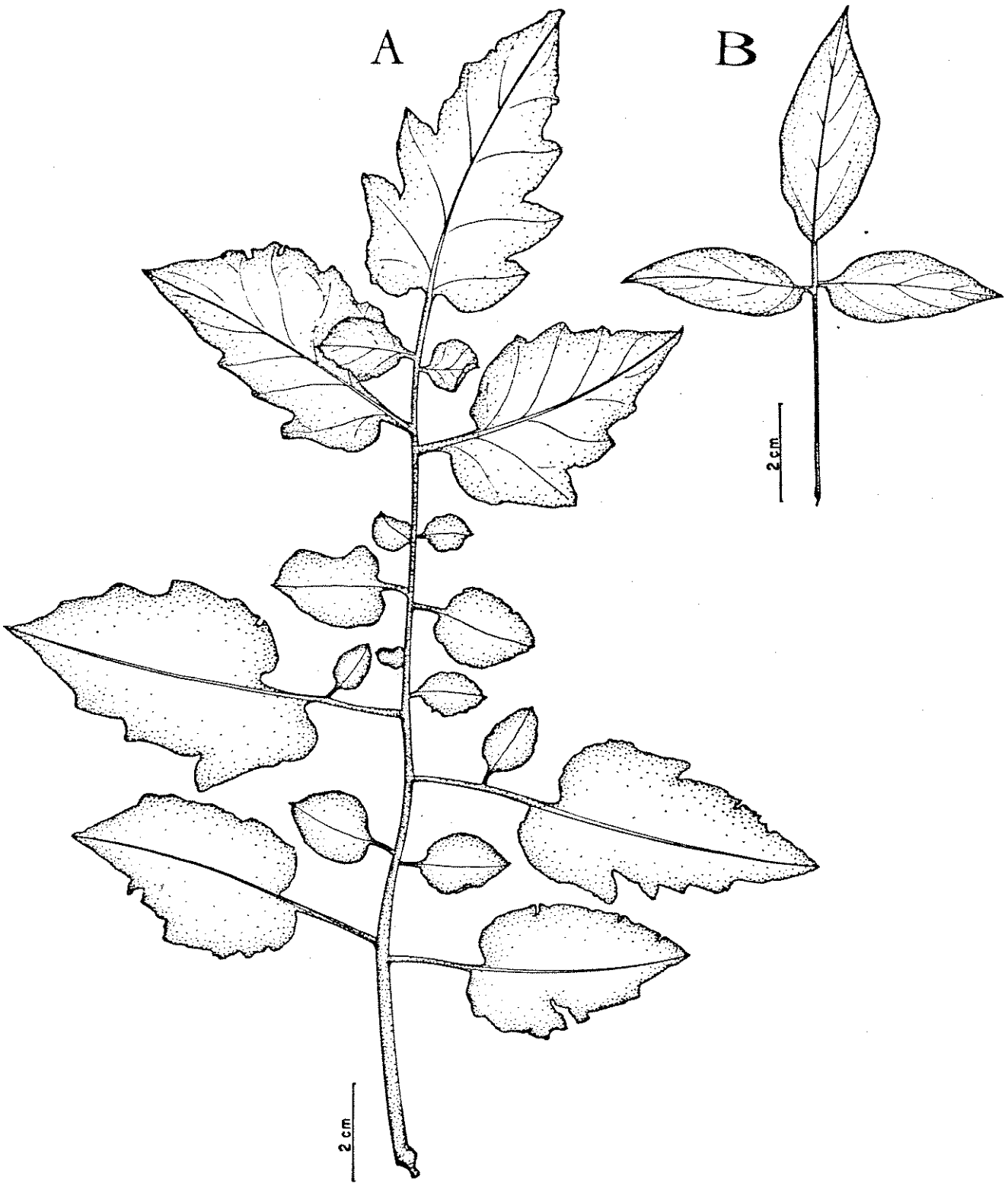


FIGURA 43 - Aparecimento de anomalia foliar em plantas regeneradas de tomate.

A = Folha composta normal de tomateiro, apresentando de 7 a 11 folíolos.

B = Folha trifoliolada de planta regenerada de tomateiro. Esta característica, citada na literatura como marcador morfológico do estado recessivo , foi raríssima e localizada apenas na primeira folha regenerada, e não nas demais.

2.3. Acompanhamento de plantas regeneradas no campo

As plantas de "Petomech" regeneradas, matém a característica de crescimento determinado, isto é, são plantas compactas, com crescimento restrito, com brotos laterais que se multiplicam e se desenvolvem em volta do caule à distância mais ou menos constante. O caule determinado desenvolve progressivamente , menos nós por segmento e termina em uma inflorescência (Figura 44).

A conseqüência agronômica do crescimento determinado é uma forma de planta mais adequada ao cultivo, ao manuseio, à colheita mecânica, e com uma maior frutificação, todos estes aspectos ocorrendo concomitantemente. O gene que confere crescimento determinado apareceu como uma mutação espontânea e tem sido extensivamente usado nos programas de melhoramento do tomate (RICK, 1978).

As folhas apresentam inserção alterna. São compostas , isto é, formadas por 7, 9 e, por vezes, 11 folíolos. Como toda a parte verde da planta, as folhas são providas de pêlos. Um fato observado nas plantas regeneradas é que a maioria delas apresentava folhas com folíolos grandes, duros e pouco recortados na borda, não chegando a ser inteiros e de bordos lisos. Esse tipo de folha aparece sempre na parte mais basal da planta, sendo os folíolos apicais menores, mais aveludados e mais recortados nos bordos, como os folíolos típicos de tomate.

O número de flores é variável e a floração não ocorre simultaneamente no mesmo cacho. A regeneração não alterou a característica de ausência de "ombro" nos frutos verdes do tomate comercial "Petomech" (Figura 44). O amadurecimento uniforme é controlado por um gene que elimina o "ombro", impedindo assim, a re

tenção indesejável de clorofila na parte superior do fruto maduro (RICK, 1978). Outro fato observado é que poucos frutos tinham articulações no pecíolo. A falta desta articulação permite que a baga seja destacada da planta sem que leve o cálice agarrado a si. Em alguns frutos havia a presença de bico. Para o transporte de frutos em caixas, essa característica não é interessante, pois um fruto com bico pode danificar a polpa de um outro. A forma dos frutos foi variável, desde a redonda até frutos ovais. O número de sementes também variou bastante (TABELAS 33 a 36).

A produção de frutos das plantas regeneradas é dependente da origem genética do material vegetal. O cultivar A apresentou, em média, menor produção de frutos/plantas do que os demais materiais. Material B apresentou um aumento de 73,5% em relação ao material A, enquanto o híbrido "Joaquim" apresentou um aumento menor (32,4%), nas plantas regeneradas testadas. É interessante observar que a produção do material C (obtido por multiplicação no campo do material A) também apresentou aumento de produção, em relação ao material original. O aumento, neste caso, foi de 54,4% (TABELA 37.1).

A produção de frutos das plantas regeneradas foi também dependente de condição fisiológica (balanço hormonal) do explante utilizado para iniciar o cultivo *in vitro*. A menor foi observada quando quando se utilizou caule como fonte de explante inicial, exatamente o explante que resultou em maior sobrevivência no campo. Maior capacidade de sobrevivência das plantas obtidas de caule não resultou, pois, em melhor produtividade. Explantes de origem foliar resultaram em maior produtividade, sendo que a natureza fisiológica do explante afetou o resultado, pois, o aumento foi maior quando se utilizou folha definitiva (67,2%) do que a folha cotiledonar (37,7%), como mostra a TABELA 37.2.

FIGURA 44 - Manutenção da característica de ausência de "ombro" em frutos de plantas regeneradas (R_o) de tomate comercial.

a) Planta obtida por variação somaclonal a partir de cv. Joaquim. Código da planta = Si-71/F/39b . Utilizou-se como explante inicial folha definitiva e trata-se de uma duplicata de uma planta regenerada original. As características fenotípicas e de produção da planta citada são mostradas na Tab. 34.

b) Aspecto, no campo, de uma planta típica de tomate do grupo "Petomech" obtida a partir de semente vegetal.

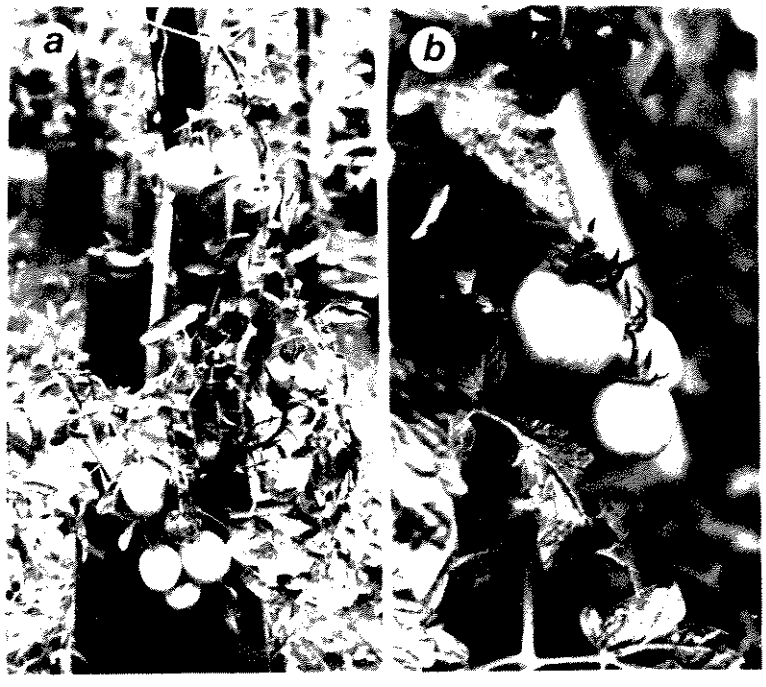


TABELA 33 - Plantas regeneradas a partir de cotilédone

MATERIAL VEGETAL	EXPLANTE INICIAL	CÓDIGO DA PLANTA	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	PRODUÇÃO					
				nº de frutos/ cacho	nº total de frutos produzidos	forma do fruto	presença de bico	nº de sementes	Retirada de sementes
A	COTILÉDONE	1-Si-92/1C/05-a	ft;bt	3	8	oval	-	39	+
		2-SI-92/1C/08-a	ft;bt	2	5	redonda	+	70	+
		3-Si-119/2C/01-a	ft;bt	3	6	oval	-	42	+
		4-Si-119/2C/16-b	ft;bt	3	5	redonda	-	71	-
		5-Si-119/2C/16-c	fi;bi	3	7	...	...	...	+
		6-Si-119/2C/47-c	fi;bi	4	9	...	...	...	-
		7-Si-119/2C/48-a	ft;bt	6	9	redonda	-	30	-
		8-Si-119/2C/48-b	fi;bi	5	11	redonda	-	15	+
		9-Si-119/2C/49-a	ft;bt	6	14	oval	-	76	-
		10-Si-119/2C/49-b	ft;bt	3	3	oval	-	59	+
		11-Si-119/2C/53-c	ft;bt	3	7	oval	+	49	+
		12-Si-119/2C/58-a	ft;bt	3	3	...	...	...	+
		13-Si-119/2C/62-a	ft;bt	3	12	redonda	+	69	+
		14-Si-119/2C/64-a	ft;bt	4	8	redonda	-	85	+
		15-Si-119/2C/64-c	ft;bt	3	9	...	...	...	-
		16-Si-119/2C/68-a	ft;bt	1	1	oval	+	37	+
		17-Si-119/2C/68-c	fi;bi	4	8	redonda	-	69	-
		18-Si-119/2C/74-c	ft;bt	6	9	...	...	...	-
		Σ x	4 fi bi14 ft bt	65	134	oval redonda 6 7	4+ 9-	711	11+ 7-
		$\bar{X} \pm S$		$3,6 \pm 1,4$	$7,4 \pm 3,3$			$54,7 \pm 20,9$	
		%	%22,2 77,8			%53,9 46,1	%30,8 69,2		%61,11 38,9

.../.

Tab. 33 - Plantas regeneradas a partir de cotilédone (continuação)

MATERIAL VEGETAL	EXPLANTE INICIAL	CÓDIGO DA PLANTA	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	PRODUÇÃO					
				nº de frutos/ cacho	nº total de frutos produzidos	forma do fruto	presença de bico	nº de sementes	Retirada de sementes
B	COTILÉDONE	1-Si-92/3C/08-d	ft;bt	4	11	redonda	-	40	-
		2-Si-92/3C/18-a	ft;b	5	12	...	...	...	+
		3-Si-92/5C/05-c	ft;bt	4	15	oval	-	11	-
		ΣX	1fi,bi 2bt,ft	13	38	oval redonda	0+ 2-	51	1+ 2-
		$\overline{X} \pm S$		4,3±0,6	12,7±2,1			25,5±20,5	
		%	%33,3 66,7			%50,0 30,0	%0,0 100,0		%33,3 66,7
C	COTILÉDONE	1-Si-126/C/39-a	ft;bt	4	12	oval	+	34	+
		2-Si-126/C/3b-b	ft;bt	3	9	redonda	-	53	-
		ΣX	2ft,bt	7	21	oval redonda	1+ 1-	87	1+ 1-
		$\overline{X} \pm S$		3,5±0,7	10,5±2,1			43,5±13,4	
		%	%100,0			%50,0 50,0	%50,0 50,0		%50,0 50,0

TABELAS 33-36. Avaliação das características vegetativas e reprodutivas das plantas regeneradas no campo. Avaliação individual por explante inicial (TABELAS 33-35) e avaliação global das plantas analisadas (TABELA 36).

+ = resposta positiva
- = resposta negativa
... = dado desconhecido

ft = folíolo com limbo típico de tomateiro (partido)
fi = folíolos grandes, coriáceos, quase inteiros
bt = bordo serreado, típico de tomateiro
bi = bordos praticamente inteiros, quase sem recortes

TABELA 34 - Plantas regeneradas a partir de folha definitiva

MATERIAL VEGETAL	EXPLANTE INICIAL	CÓDIGO DA PLANTA	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	PRODUÇÃO							
				nº de frutos/ cacho	nº total de frutos produzidos	forma do fruto		presença de bico		nº de sementes	Retirada de sementes
B	Folha definitiva	1-Si-77/F/08-a	ft;bt	4	12	...		-		...	-
		2-Si-84/F/01-b	ft;bt	3	11	redonda		-		35	+
		3-Si-84/F/18-b	ft;bt	3	3	...		-		...	+
		4-Si-84/F/18-d	ft;bt	4	17	oval		-		20	+
		ΣX	4 0	14	43	1	1	0+	4-	55	3+ 1-
		$\bar{X} \pm S$		3,5 ± 0,6	10,8 ± 5,8					27,5±10,6	
		%	100,0 0,0fi;bi			50,0	50,0	0,0	100,0		75,0 25,0
E	Folha definitiva	1-Si-71/F/39-b	ft;bt	4	14	redonda		-		110	+
		2-A-2/IIa/05-a (50% de filtrado de 21 dias de idade) isolado Mococa	ft;bt	3	4	redonda		-		74	+
			ft;bt fi;bi								
		ΣX	2 0	7	18	2	0	0+	2-	184	2+ 0 -
		$\bar{X} \pm S$		3,5 ± 0,7	9,0 ± 7,1					92,0 ± 25,5	
		%	100,0 0,0			100,0	0,0	0,0	100,0		100,0 0,0 -

TABELA 35 - Plantas regeneradas a partir do caule

MATERIAL VEGETAL	EXPLANTE INICIAL	CÓDIGO DA PLANTA	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	PRODUÇÃO					
				nº de frutos/ cacho	nº total de frutos produzidos	forma do fruto	presença de bico	nº de sementes	Retirada de sementes
A	CAULE	1-Si-96/1H/12-a	fi;bi	4	8	...	-	...	+
		2-Si-96/1H/12-b	ft;bt	4	8	...	-	...	-
		3-Si-96/1H/12-c	ft;bt	3	5	redonda	-	70	+
		4-Si-119/2H/01-a	fi;bi	3	4	...	-	...	+
		5-Si-119/2H/01-b	ft;bt	3	9	...	-	...	+
		6-Si-119/2H/04-b	ft;bt	1	2	...	...	...	-
		7-Si-119/2H/05-b	fi;bi	3	7	oval	-	41	-
			ft;bt fi;bi			redonda oval			
	ΣX		4 3	21	43	1 1	0+ 6-	111	4+ 3-
	$\overline{X} \pm S$			3,0 ± 1,0	6,1 ± 2,5			55,5 ± 20,5	
	%		57,1 42,9			50,0 50,0	0,0 100,0		57,1 42,9

TABELA 36- Avaliação das características vegetativas e reprodutivas de plantas regeneradas

EXPLANTE INICIAL	PARTE VEGETATIVA CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS		FRUTOS							
			PRODUÇÃO			CARACTERÍSTICAS				
			nº frutos/ cacho	nº total de frutos produzidos nº	produzidos %	nº de* sementes	Forma* oval	redonda	Presença de bico* +	−
	$f_t ; b_t$	$f_i ; b_i$								
COTILÉDONE										
total de plantas = 23										
ΣX =	18	5	85	193	8,4	849	8	9	6	11
$\overline{X} \pm S$			3,7 ± 1,2	8,4 ± 3,5		49,9±21,5				
% =	78,3	21,7					47,1	52,9	35,3	64,7
FOLHA DEFINITIVA										
total de plantas = 6										
ΣX =	6	0	21	61	10,2	239	1	3	0	6**
$\overline{X} \pm S$			3,5 ± 0,5	10,2 ± 5,6		59,8±40,5				
% =	100,0	0,0					25,0	75,0	0,0	100,0
CAULE										
total de plantas = 7										
ΣX =	4	3	21	43	6,1	111	1	1	0	6**
$\overline{X} \pm S$			3,0 ± 1,0	6,1 ± 2,5		55,5±20,5				
% =	57,1	42,9					50,0	50,0	0,0	100,0
TOTAL										
ΣX total	28	8	127	297	8,3	1199	10	13	6	23
$\overline{X}_{total} \pm S_{total}$			3,5 ± 1,1	8,3 ± 3,9		52,1±24,4				
% total	77,8	22,2					43,5	56,5	20,7	79,3

CARACTERÍSTICAS			
Armazenamento de Sementes (R_1)			
+	−		
13	10		
56,5	43,5		
5	1		
83,4	16,6		
4	3		
57,1	42,9		
22	14		
61,1	38,9		

* total de plantas analisadas

Cotilédone = 17

Folha definitiva = 04

Caule = 02

** total de plantas analisadas = 06

TABELA 37

PROPORÇÃO DE FRUTOS OBTIDOS EM RELAÇÃO ÃS PLANTAS REGENERADAS

TABELA 37.1

Em relação ao material vegetal

Material Vegetal	Explante Inicial	Nº frutos/ Nº plantas	Produção por Material Vegetal
A	Cotilédone	7,4	6,8
	Caule	6,1	
B	Cotilédone	12,7	11,8
	Folha definitiva	10,8	
C	Cotilédone	10,5	10,5
E	Folha definitiva	9,0	9,0

TABELA 37.2

Em relação a explante inicial

Explante Inicial	Nº Frutos/ Nº Plantas
Cotilédone	8,4
Folha definitiva	10,2
Caule	6,1
$\bar{X}$ TOTAL	8,3

Foram obtidas, também, plantas que passaram por 3 ciclos de geração que resultaram na geração R_o, R_1 e R_2. O esquema de como estas plantas foram obtidas, em cada geração, é mostrado na FIGURA 44. Cada planta, em cada ciclo de regeneração, recebeu uma sigla individual. Isto foi feito para cada planta regenerada, independente do explante inicial utilizado (TABELA 38). As plantas de geração R_1 foram obtidas a partir de material vegetal A (plantas R_o = Si- 119-2/62a e Si- 119-2/64a) e materiais vegetais C + D (planta R_0 = Si- 126/39a).

Na TABELA 38 são mostradas as características no campo das plantas após 3 ciclos de regeneração (plantas R_2) onde se observa que, estas plantas apresentaram; de modo geral, vigor, manutenção de dominância apical (não tendo havido, pois, segregação para a característica de crescimento determinado), acentuação da síntese de antocianinas, principalmente nos bordos foliares e precocidade de floração.

A característica de precocidade de floração foi uma característica marcante nas plantas regeneradas do grupo "Petomech", pois, houve o aparecimento de precocidade extremamente acentuada já na 2ª geração (R_1) como pode ser visto na FIGURA 45, para o cultivar Joaquim, a partir de uma planta da geração R_0 com aspecto fonotípico normal (ver FIGURA 39).

A precocidade de floração foi observada nas plantas da geração R_2 (SK 254 e SK 352) provenientes, ambas, de plantas originalmente do material vegetal A, da planta R_0, Si- 119-2/62a. Em ambos os casos, o explante inicial utilizado foi cotilédone, mesmo tipo de explante que resultou no cultivar Joaquim (E) precocidade de floração já na 2ª geração (R_1) extremamente pronunciada, *in vitro*, como pode ser visto na FIGURA 45.

TABELA 38

Plantas no campo obtidas após ciclos in vitro

CICLOS DE REGENERAÇÃO						CARACTERÍSTICAS DAS PLANTAS R_2 NO CAMPO
1º) R_0 (1983)		2º) R_1 (1984)		3º) R_2 (1985)		
explante inicial	Sigla	explante inicial	Sigla	Sigla		
cotilédone	Si-126/39a	cotilédone	Si-185-1/10	Sk273		dominância apical
		cotilédone	Si-185-1/09	Sk338		bordos das folhas arroxeados e dominância apical
cotilédone	Si-119-2/62a	cotilédone	Si-185-3/23	Sk254		precocidade acentuada
		cotilédone	Si-185-3/70	Sk301		vigor acentuado - folhas com formato típico de tomateiro
		cotilédone	Si-185-3/57	Sk307		sem dominância apical
		cotilédone	Si-185-3/55	Sk321		planta extremamente vigorosa, com dominância apical
		cotilédone	Si-185-3/21	Sk333		folhas pouco arroxeadas, planta com dominância apical
		folha definitiva	Si-185-3/29	Sk334		planta com folhas e bordos arroxeados
		cotilédone	Si-185-3/69b	Sk336		com dominância apical
		folha definitiva	Si-185-3/27	Sk337		planta com folhas de bordos arroxeados
		folha definitiva	Si-185-3/19	Sk339		dominância apical
		folha definitiva	Si-185-3/22	Sk343		sem características especiais
		cotilédone	Si-185-3/39	Sk352		precocidade de floração
		cotilédone	Si-185-3	Sk359		dominância apical
		cotilédone	Si-185-3/51	Sk361		planta vigorosa, cujos bordos das folhas são arroxeados
		cotilédone	Si-185-3/57	Sk372		problemas na fase de aclimatação
cotilédone	Si-119-2/64a	cotilédone	Si-185-4/08	Sk300		vigor acentuado
		folha definitiva	Si-185-4/21	Sk335		planta sem características acentuadas
		folha definitiva	Si-185-4/02	Sk340		folhas com bordos arroxeados, planta com dominância apical
		hipocótilo	Si-185-4/03	Sk342		folhas com bordos arroxeados, planta extremamente vigorosa
		cotilédone	Si-185-4/25	Sk347		folhas arroxeadas, planta com semi-dominância
		folha definitiva	Si-185-4/14	Sk363		planta vigorosa

TABELA 38. Plantas no campo obtidas após ciclos *in vitro*. Relação, para cada planta individualizada, por sigla, entre os ciclos de regeneração, o explante inicial e as características qualitativas das plantas R_2 no campo, após 3 ciclos de regeneração *in vitro*.
Material vegetal: "Petomech".

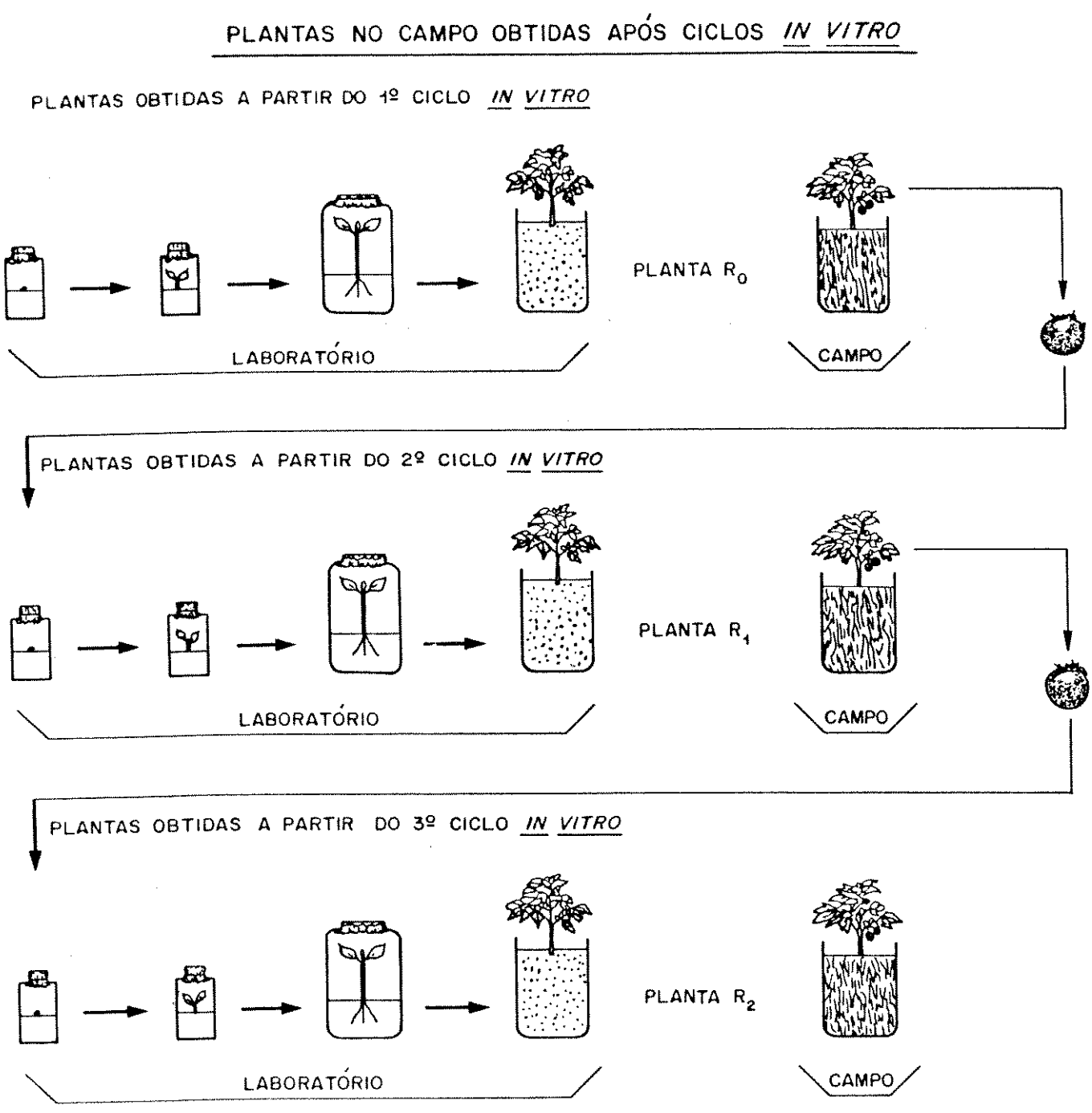


FIGURA 45. Apresentação esquemática da obtenção de plantas após 3 ciclos de regeneração *in vitro*. O 1º ciclo foi realizado no ano de 1983; o 2º ciclo, no ano de 1984 e o 3º ciclo, no ano de 1985. Regeneração ocorrida em meio padrão To-M_3 (MS+AIA 25 µM e 6-BA 10 µM).

FIGURA 46 - PRECOCIDADE DE FRUTIFICAÇÃO EM PLANTA PROVINDA DA 2a. GERAÇÃO (R_1) DE CULTURA DE TECIDOS

Frutificação no próprio frasco de cultivo <u>in vitro</u> de explante obtido da progênie de planta regenerada (R_0= Si-70/F/13 - <u>ver</u> Fig. 39). Regeneração obtida em meio com 6-BA 10 µM e AIA 25 µM a partir de cotilédone como explante inicial.

Observar o aspecto anômalo da planta regenerada (R_1 = Si-158/C/31).



3. CULTURA DO FUNGO E OBTENÇÃO DE FILTRADOS TÓXICOS

3.1. Crescimento do fungo em meio sólido (FIGURA 47)

As espécies de fungo cuja esporulação guarda sensibilidade à luz, exibem, quer na placa de Petri, quer na superfície da área lesada do hospedeiro, suas frutificações dispostas em círculos concêntricos - efeito de zonação - delimitados os períodos diurno e noturno (PONTE, 1980).

Sob menores intensidades luminosas, as colônias apresentaram-se altas e cotonosas (FIGURA 47a), não se distinguindo os círculos concêntricos de crescimento, típicos de regimes intensos e alternados de luz (FIGURA 47b).

É interessante lembrar, neste ponto, que o fungo *B.bassiana* (Bals) Virill, cultivado na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e no Instituto do Açucar e do Álcool(IAA), com vistas ao emprego como contrôle biológico por fungos, tem o aspecto de crescimento dependente de condições luminosas. No escuro contínuo, a colônia apresentou crescimento de aspecto homogêneno; já, em fotoperíodo de 12 horas, a colônia cresceu em faixas em círculos concêntricos (BATISTA ALVES, 1984).

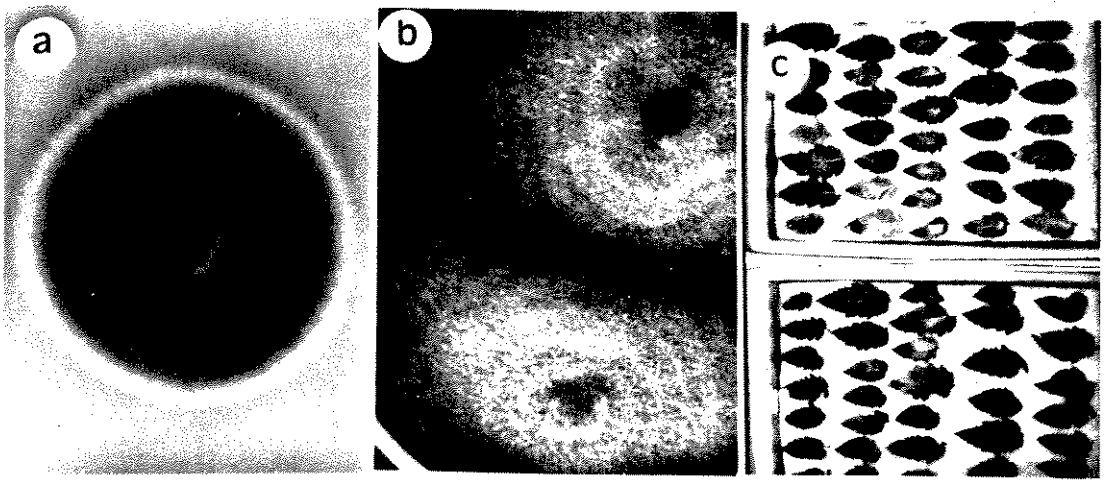
Não ocorreu esporulação nas condições mencionadas. Filtrados foram, pois, obtidos a partir do micélio do fungo, como foi feito tanto no trabalho pioneiro de BRIAN et al. (1951;1952) como em trabalhos mais recentes (STOESSL, 1982) para *A. solani*. É interessante lembrar que a produção maciça de conídios de *A. macrospora* para contrôle biológico de erva daninha também foi iniciada com micélio de fungo (WALKER, 1980). A produção da toxina victorina a partir de *Helminthosporium victoriae*, espécie pertencente a um gênero relacionado à *Alternaria* foi obtida a partir de culturas também iniciadas de áreas miceliais (LUKE & WHEELER, 1955).

FIGURA 47 - MANUTENÇÃO DE *Alternaria solani* ISOLADO SANTA ELIZA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO.

(a) Crescimento micelial sob baixas intensidades luminosas (50 a 160 $\mu w.cm^{-2}$). As colônias apresentam-se altas e cotonosas. Note-se uma alteração na coloração da colônia, relacionada às variações ambientais e não associada à patogenicidade.

(b) Crescimento micelial em regimes intensos (1300 $\mu w.cm^{-2}$) alternados de luz. Pode-se distinguir os círculos concêntricos de crescimento, efeito de "zonação". como ocorre à superfície da área lesada do hospedeiro.

(c) Teste de patogenicidade. Reinfecção de folíolos destacados de tomateiro para confirmação da patogenidade e posterior isolamento. Documentação após 10 dias de inoculação. Estes testes foram realizados mensalmente sempre antes da inoculação em meio líquido.



Estudos de interação de radiação ultravioleta próxima e temperatura em fotoesporogênesis em colônias de *A. solani* e *A. tomato*, realizados por LEACH (1971), revelaram duas fases distintas da fotoesporogênesis:

> 1a. Fase - "fase indutiva", a qual é induzida por luz e procedida por temperaturas relativamente altas. O término desta fase resulta na formação de conidióforos;
>
> 2a. fase - "fase terminal", é a que leva à formação de conídios. É a fase fortemente inibida pela luz ultravioleta e azul, geralmente realizada mais efetivamente à baixa temperatura. O comprimento de onde necessário para a complementação da "fase terminal" é também dependente da temperatura.

LEACH (1971) recomenda, a partir destes estudos, a utilização de regimes alternados de luz (12 horas luz/12 horas escuro) para induzir esporulação em "esporuladores diurnos". Fotoperíodo de 12 horas foi empregado no presente trabalho, tanto para cultura sólida como cultura líquida do fungo, não tendo ocorrido, mesmo assim, esporulação.

A dificuldade de esporulação da espécie *A. solani* é tão reconhecida na literatura que, em 1953, NEWTON, ao tentar verificar a presença do ácido alternárico e de outros compostos antifúngicos em várias espécies do gênero *Alternaria*, sugeriu como característica de diagnóstico de espécie *A. solani* a produção de cristais em cultura, uma característica de diagnóstico, segundo este autor, extremamente útil na identificação de *A. solani* devido à tendência desta espécie de não produzir esporos quando crescida em meio de cultura.

NEWTON (1953) verificou que, dentro das 5 espécies do gênero *Alternaria* estudadas, apenas *A. solani* e *A. radicinina* produziram cristais em cultura. Enquanto *A. radicinina* produziu agrupados de cristais do tipo árvore, *A. solani* produzem cristais do tipo estrela.

3.2. Ensaios de patogenicidade do fungo crescendo em meio sólido

Os ensais de patogenicidade do agente causal crescendo em meio semisintético, após o isolamento, foram realizados mensalmente, sempre antes da inoculação de áreas da colônia do patógeno em meio líquido sintético.

Os ensaios de patogenicidade do fungo foram positivos por um período de 6 meses, ou seja, após o isolamento, o fungo continuou patogênico em condições de laboratório, cultivado em meio de cultura semisintético (FIGURA 47c). Não se fez ensaios com períodos mais longos de manutenção das colônias dos isolados do fungo em laboratório, pois, após o período de cultura de 6 meses, preferiu-se fazer reciclagem das colônias de isolados, desprezando-se as antigas e fazendo-se novos isolamentos.

3.3. Características Cromogênicas

Algumas colônias de *A. solani* apresentaram características cromogênicas em meio de cultura (FIGURA 47a), mostrando uma coloração amarelada e, em alguns casos, avermelhada. Essa alteração de pigmentação não está associada com patogenicidade, como mostra o trabalho de BONDE (1929) e, sim, com variações ambientais (principalmente temperatura), variação do próprio isolado e principalmente com valores de pH. BONDE (1929) verificou que,nas raças fisiológicas cromogênicas de *A. solani* o pigmento é um indicador que, em solução aquosa ou alcoólica varia de amarelo (cor ácia) a vermelho intenso ou carmim (cor alcalina), em valores de pH de cerca de 7,8. Todas as raças cromogênicas estudadas por este autor, aumentaram o valor de pH no meio batata-dextose-ágar , para cerca de 6,6 a 8,3. BRIAN et al., cultivando *A. solani* em meio líquido de Czapek-Dox, em presença de sacarose (10%), verificaram, também, aumento do valor de pH durante o período de incubação, sendo que, no 15º dia o valor de pH observado por BRIAN et al., nas condições descritas, foi 7,9, correspondente, pois , à coloração vermelho-vinho, fato este também observado no presente trabalho, ao redor do 15º dia de cultivo, em meio Czapek-Dox, em certas colônias. Assim, nem todos os meios de *A. solani* culti

vados em cultura fluída de Czapek-Dox mostraram-se cromogênicas, fato este também observado enteriormente por BRIAN et al. (1951). Na pesquisa de resistência ao patógeno com isolados efetivamente fitopatogênicos, a ocorrência da característica cromogênica que, se não está associada à patogenicidade, não foi discriminada, embora tenha origem genética (BONDE, 1929). Assim, para a preparação dos filtrados de cultura utilizados em pré-seleção, empregou-se mistura de meios cromogênicos ou não, desde que fossem comprovadamente fitotóxicos, obtidos de isolados fitopatogênicos. Todos os isolados testados foram efetivos como agentes fitopatogênicos (FIGURA 48), independente do local de coleta do fungo.

De modo geral, os isolados coletados fora do município de Campinas, foram menos patogênicos nas plantas-teste de tomate (cv. Ângela) cultivadas em Campinas, que os isolados do patógeno coletados no referido município. Os valores de fitopatogenicidade foram menores no isolado AJ (do município de Jaguariúna), o isolado menos patogênico dos isolados testados, revelando pequeno grau de virulência deste isolado (MANNERS, 1982).

Mesmo no município de Campinas, isolados coletados na Fazenda do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), revelaram um grau de fitotoxicidade maior que o outro isolado de Campinas, se compararmos os dados obtidos no 5º dia após inoculação do fungo. Neste período, após inoculação do fungo, o mais alto valor de fitotoxicidade foi obtido pelo isolado Santa Eliza (da Secção de Genética da Fazenda do IAC). A partir do 5º dia após a inoculação do fungo, não houve diferença de agressividade entre os isolados Santa Eliza e o IAC, ambos coletados na referida fazenda.

Embora no 9º dia após inoculação do fungo (período de visualização dos esporos) todos os isolados mostrassem praticamente o grau máximo de fitotoxicidade, os valores foram mais altos com os isolados coletados em Campinas e, dentro destes, o isolado Santa Eliza apresentou um grau de fitotoxicidade ligeiramente mais alo. Este isolado foi o escolhido para se iniciar a cultura líquida em larga escala, para posterior utilização do filtrado de cultura em pré-seleção.

Na FIGURA 48, um dado merece maiores considerações. Trata-se dos grandes desvios nas notas desintomatológicas ocorridas no controle (manutenção de folhas sadias, em câmara úmida, sem inoculação do patógeno), em contra-partida os pequenos desvios ob-

FIGURA 48 - Teste de patogenicidade dos isolados de *A. solani* . As folhas e hastes com lesões típicas foram coletadas de 5 localidades:

LOCALIDADE	SIGLA
1. Secção de Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Município de Campinas, SP.	A.F.
2. Fazenda Santa Eliza, Secção de Genética, Município de Campinas, SP.	Sta.Eliza
3. Município de Jaguariúna, SP.	AJ
4. Município de Mococa, SP.	Mococa
5. Fazenda do Instituto Agronômico de Campinas, Município de Campinas, SP.	IAC

Os conídios foram inoculados em folhas de tomateiro . Cada isolado separadamente foi inoculado em uma câmara única. As folhas permaneceram em câmara úmida por 5 dias em ambiente de temperatura ($19 \pm 2^{o}C$). Após este tempo de incubação, os testes foram avaliados através do aspecto dos sintomas, agrupados em 5 classes de notas, conforme pode ser visualizado na FIGURA 21 (ver Métodos) . Atribuiu-se nota ao sintoma apresentado por cada folíolo.

Das notas atribuídas aos sintomas apresentados por todos os folíolos de um determinado teste, foram calculadas as médias e os respectivos desvios-padrões.

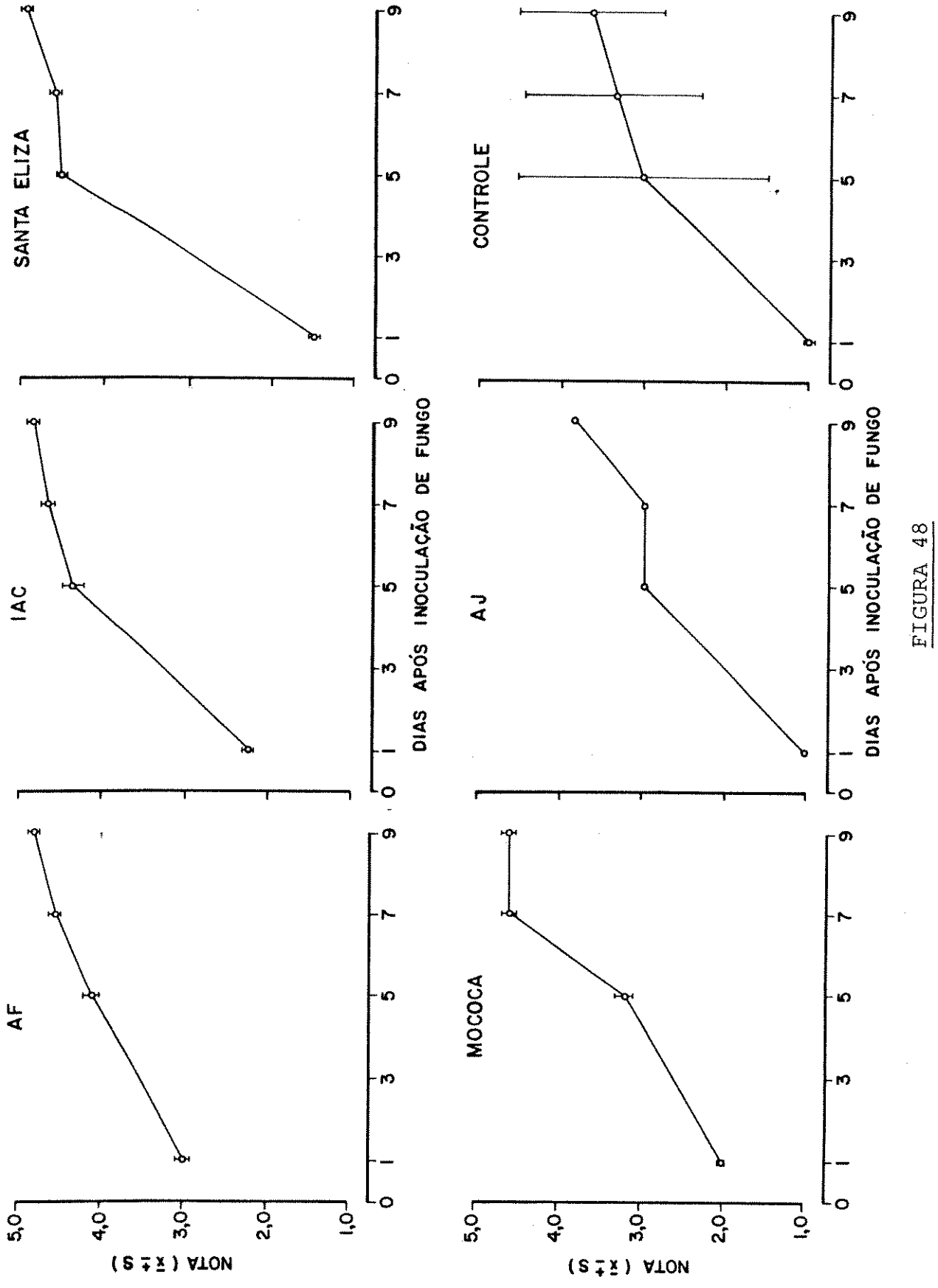

AF
IAC
SANTA ELIZA
MOCOCA
AJ
CONTROLE
NOTA ($\bar{x} \pm S$)
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0
1
3
5
7
9
DIAS APÓS INOCULAÇÃO DE FUNGO

FIGURA 48

servados nas folhas inoculadas com os isolados testados. Este fato poderá ser devido, talvez, a que em condições ótimas de germinação dos conídios, conídios não visualizados germinaram nas folhas do controle. Mas, a causa mais provável dos síntomas encontrados no controle (com grande dispersão) deve ser creditada a ácaros acompanhantes, que em incursões, devem ter transportado os conídios. Para evitar-se problemas de contaminação pelos ácaros, que foram encontrados se alimentando, inclusive, das colônias do fungo em meio sólido, foi feita uma limpeza geral e descontaminação de tal forma que, não se cultivou o fungo por um período de 2-3 meses.

Pigmentos encontrados em colônias de fungos podem ter várias identidades químicas e relações com aspecto de ação de luz, como citado por LEACH (1971): 1) colônias iluminadas de *Phyronema confluens* - causado por um complexo de carotenóides ; 2) a variação de cor de colônias iluminadas de *Fusarium oxysporum* é devida a caratenóides e naftoquinonas, sendo que os carotenoides e naftoquinonas, sendo que os carotenóides são produzidos somente em resposta à luz e as naftoquinonas são reguladas principalmente pela razão C/N; 3) a coloração rosa do micélio de *Cochliobolus sativus* na luz, a partir de linhagens de esporos brancos é devida ao pigmento rosa, a sativina, que é produzido em colônias expostas aos comprimentos de onda de 390-513 nm, mas não em ausência de oxigênio; 4) *Neurospora crassa*, que se apresenta com coloração laranja brilhante somente quando iluminada , deve esta cor à presença de um complexo de carotenóides, cujo espectro de ação mostra que os comprimentos de onda de 430-480 nm são os mais estimuladores; 5) a síntese de melanina é inibida por UV em *Verticillium albo-atrum* e 6) melanogênesis em *Neurospora crassa* é diminuída pelos comprimentos de onda azul-violeta (LEACH, 1971).

Conclui que os comprimentos de radiação no ultravioleta próximo e regiões de azul no espectro são efetivos na indução da formação de pigmento em alguns fungos mas, não se sabe se este fato é verdadeiro para todos os fungos.

Quanto à identidade química dos pigmentos encontrados em *A. solani*, STOESSL et al. (1983) verificaram que este patógeno produz, em micélio e filtrados de cultura, os seguintes pigmentos amarelos e laranjas (FIGURA 49a): (1) eter 2-metil xanto

purpurina; (2) 7-metoxi-2-metil 3,4,5-tritridroxantraquinona ; (3) macrosporina; (4) altersolanol A e (5) altersolanol B. Os dois primeiros pigmentos foram denominados anteriormente p o r STOESSL (1969) como:

(1) antraquinona A, ponto de fusão (pf = 184-185°C) e espectro no u.v.; max 409,279, 261 e 226 nm;

(2) antraquinona B, ponto de fusão (PF = 267-268°C) e espectro no u.v.; max 425, 312, 280 e 229 nm.

O outro pigmento, de origem antraquinônica, a macrosporina (3) conhecida de outras espécies de *Alternaria (A. porri* e *A. cucumerina*) foi considerada por STOESSL em 1969, nesta data , um metabólito de provável significado taxonômico, já que não fora encontrado em outros gêneros de fungos e plantas. Porém, posteriormente, macrosporina foi também isolada dos fungos não relacionados *Phomopsis jumperivora* e *Dactylaria lutea* (STOESSL et al., 1983). STOESSL (1969) chama a atenção de que esta antraquinona (3) não é um produto completamente estável, pois, apresenta p.f.= 300-302°C e ponto de decomposição de 308-316°C. Macrosporina (3) também foi denominada de antraquinona C por STOESSL (1969) e apresenta espectro no uv max 379, 305, 284, 251 (inf) e 225 nm e corresponde a 3,5-dihidroxi-7-metoxi-2-metilantraquinona.

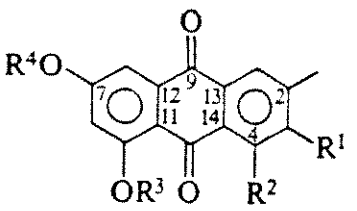
Os compostos (4) e (5) da FIGURA 49a são raros, do ponto de vista químico, fazendo parte dos pouquissimos exemplos de tetrahidroantraquinonas normalmente ocorrentes. São de interesse por serem antibióticos e como metabólitos dos fungos patogênicos *A. solani* e *A. porri*, tendo sido isolados também de *P. juniperivora* e *D. lutea* (STOESSL et al., 1979).

HOLENSTEIN & STOESSL (1983) verificaram que o altersolanol A (7-metoxi-2-metil-1,2,3,4,5-pentahidroxi-1,2,3,4,-tetrahidroantraquinona) exibiu atividade fitotóxica não específica em batata, tomate, ervilha, causando necrose em folhas e inibindo crescimento de raízes. Este metabólito, que tem atividade óptica, é estável, tem ponto de fusão de 218-218,5°C e absorção no u.v. (max = 422,268,240 e 219 nm), segundo STOESSL (1967 e 1969).

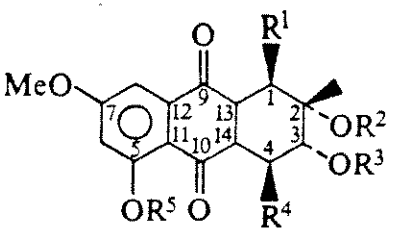
O composto (5) altersolanol B (7-metoxi-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-2,3,5,-trihidroxiantraquinona) também é estável, com ponto de fusão de 209-212°C e absorção no u.v. (max = 421,285, 265 e 217 nm). Segundo GORDON et al. (1972), o altersolanol B é um derivado de isopropilideno e tricetato.

FIGURA 49

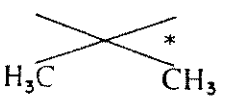
A



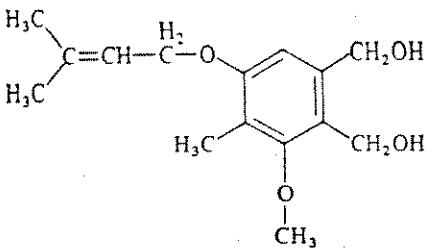
1–3



4–6

	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
1	H	H	H	Me	
1*a*	H	H	Ac	Ac	
2	OH	OH	OH	Me	
2*a*	OAc	OAc	Ac	Me	
3	OH	H	H	Me	
3*a*	OAc	H	Ac	Me	
4	OH	H	H	OH	H
4*a*	OAc	Ac	Ac	OAc	Ac
4*b*	OAc	H	Ac	OAc	Ac
4*c*	OAc			OAc	Ac
5	H	H	H	H	H
5*a*	H	Ac	Ac	H	Ac
6	OH	H	H	H	H

B



7

Estruturas químicas de pigmentos encontrados em micélio e filtrados de cultura de *A. solani*.

A) Pigmentos, segundo STOESSL et al, 1983

1 = eter 2-metil xantopurpurina

2 = 7-metoxi-2-metil 3,4,5-trihidroxantraquinona

3 = macrosporina

4 = altersolanol A

5 = altersolanol B

6 = dactilariol

* Grupo Isopropilideno

B) Fitotoxina, segundo TEMPLETON, 1972.

7 = ziniol

STOESSL et al 1983 isolaram de *A.solani*, outro pigmento, o dactilariol (6, Fig.49A), que se verificou estes relacionado com o altersolanol A e B no fungo *D.lutea*. STOESSL & STOTHERS (1983) denominaram o dactilariol de altersolanol C e o isolaram de filtrados de cultura de 21 dias de idade. O altersolanol C ou dactilariol (6) apresentou ponto de fusão de 256-257ºC e absorção no u.v. (λmax = 420nm segundo STOESSL et al 1979.

Através do uso de espectroscopia de ressonância nuclear magnética ^{13}C, STOESSL et al (1983) verificaram que as culturas de *A.solani* incorporam contatos ($1,2^{13}C_2$) e, macrosporina (3), em altersolanol A (4) e em dactilariol (6) de uma cadeia octocetídea . Segundo estes autores, há evidências que sugerem que altersolanol A (4) pode ser o precursor do altersolanol B, assim como a macrosporina é biogeneticamente derivada do mesmo altersolanol A.

Os resultados de STOESSL et al 1979 estabeleceram que altersolanol A(4) é rapidamente metabolizado por *A.solani* para altersolanol B(5) e macrosporina (3), possivelmente por caminhos ramificados. Parece provável que dactilariol(6) é também formado a partir do altersolanol A(4) através de mediação enzimática e pode originar macrosporina (3) por dehidratação que não necessita ser catalizada enzimaticamente. Os resultados da conversão metabólica do altersolanol A por *A.solani* em outros pigmentos são consistentes com o conceito que a falta comparativa de formação de pigmentos na linhagem ATCC 11078 de *A.solani* observada por STOESSL et al - 1979 foi conseqüência da grande redução da taxa de biossíntese de altersolanol A.

Os pigmentos de *A.solani* mostrados na Fig.49A foram extraídos após 18 dias de incubação do fungo em meio líquido e STOESSL (1969) isolou ao seguintes quantidades de pigmentos, após o período de incubação mencionado: 0,10g de macrosporina (3); 3,46g de altersolanol A(4) e 0,15g de altersolanol B(5).

Estudos químicos dos pigmentos feitos posteriormente pelo mesmo autor (STOESSL, 1982) revelaram que a produção destes pigmentos foi dependente do período de incubação do fungo, a partir de suspensões miceliais em tubercúlos de batata. Por exemplo, a macrosporina (3) esteve presente apenas como traços após incubação - do fungo nos tubercúlos por 2 dias, enquanto, após 7 e 21 dias de incubação do fungo foram isoladas quantidades consideráveis de macrosporina.

Outro pigmento, o altersolanol (A) teve, nas condições mencionadas, produção máxima no 2º e 5º dia de incubação do fungo; produção esta avaliada através de revelação da mancha em cromatografia de camada delgada e absorbâneia do extrato em λ max 420nm (STOESSL, 1982).

O outro metabólito isolado por STOESSL et al (1983) de *A. solani* que não é pigmento, é o metabólito fitotóxico isolado inicialmente do fungo patogênico *A. zinniae* por WHITE & STARRAT em 1967 (apud TEMPLETON, 1972) que o denominaram ziniol (C_{15} H_{22} O_4). Esta toxina (7. Fig.49B) causa um severo enrugamento dos caules das plantas, amarronzamento das nervuras folhares e clorose do tecido foliar codjacente. O ziniol é afetivo na inibição de germinação de sementes, mas, não na germinação de bactérias e fungos (TEMPLETON,1972) Segundo este autor, o ziniol é um benzeno penta substituído, relacionado intimamente a quadrilineatina, um inibidor fúngico isolado do fungo *A. quadrilineatus* Thom & Raper.

Em fungos, os pigmentos parecem atuar como fotoreceptores para vários fenômenos fotobiológicos e teriam em possível papel protetor por prevenir danos a partir da radiação ultravioleta deletéria (LEACH, 1971). Há um acordo geral, segundo LEACH (1971) que as substâncias pigmentadas estão relacionadas, de alguma maneira esporulação, atuando como fotoreceptores.

A esporulação em *A. solani* é um fenômeno fisiológico complexo. A esporulação é estimulada por comprimentos de onda menores que 320nm, mas, o fungo é um "esporulador diúrno", ou seja, necessita de um período de escuro para a formação do conídio(LEACH 1971). Verificou-se, além, que no caso específico de *A. solani* e *A. tomato* há fotoinibição da "fase terminal" de formação do comídio confirmada principalmente aos comprimentos de onda 360-530nm, com a radiação de 450nm particularmente efetiva. Em *A. solani* a inibição de formação de comídio pela luz azul pode ser revertida por um exposição subsequente a luz vermelha (LUKENS, 1963).

Há uma dependência de temperatura na inibição pela luz azul na fornação de conídio em *A. solani* como em vários"esporuladores diurnos".A formação de conídios em colônias de *A. tomato* e *A. solani* é inibida pela luz em temperatura relativamente altas, mas, não em temperaturas baixas.

3.4. Crescimento do fungo em meio líquido (Figura 50 a-f)

A. solani cresceu adequadamente em meio líquido natural (Figura 50 a,b,c,d), mas este meio V 8 contém grande quantidade de resíduos que prejudicam a filtragem. Houve necessidade, pois, de centrifugação para precipitação destes resíduos (FIGURA 50e).

A cultura do fungo no meio sintético de Czapek-Dox, de natureza química conhecida, apresentou ainda uma outra característica - desejável - é límpido, facilitando, assim, a filtração e conseqüentemente a obtenção do filtrado.

Em meio líquido de cultura também houve o aparecimento de características cromogênicas em algumas colônias (Figura 50c). Nos experimentos de pré-seleção não foram utilizados somente os filtrados com características cromogênicas. Era feita uma mistura dos filtrados mais escuros e mais claros (Fig.50f).

Em relação a fisiologia de crescimento do fungo, tanto em meio sólido como em meio líquido, algumas considerações devem ser feitas:

1º)- efeito do valor de pH do meio de cultura - embora tenha se verificado que valores de pH baixos (3,0-3,5) fossem necessários para que *Helminthosporium victoriae* produza a toxina victorina (LUKE & GRACEN, JR.1972b), verificou-se a maioria dos fungos patogênicos, entre eles *Colletotrichum conchorum* Ikata & Tana a faixa dos valores de pH de 5,5 - 6,0, foi a melhor concentração de íons de hidrogênio para esporulação (DUARTE et al 1982).

2º)- período e intensidade de luz - sob condições de luz diária alternante e escuro a temperaturas constantes, ocorre freqüentemente zonação pronunciada em colônias crescendo em meio de ágar .

A zonação pode ser devida ao estímulo ou retardamento de crescimento causado pela luz, assim: como os efeitos na pigmentação produção das estruturas de frutificação e esclerócios (LEACH, 1971) Sobre o efeito da intensidade luminosa na esporulação (LEACH,1971), observou-se que uma certa dosagem mínima de energia radiante (dosagem limiar) é necessária para induzir esporulação e esta quantia é

dependente do comprimento de onda. Se o fungo é exposto a comprimentos de ondas estimuladores em baixas dosagens, não ocorre esporulação. Aumento da dosagem causa uma esporulação mais abundante até um ponto no qual o sistema fotoquímico presumivelmente torna-se saturado e nenhum aumento posterior terá efeito na esporulação.

No presente trabalho, o efeito de intensidade luminosa foi sobre o crescimento do micélio, pois, não ocorreu esporulação em condições de cultura de *A. solani*, fato já conhecido da literatura. Como os fisiologistas e melhoristas vegetais usam os conídios como inóculo para discriminar plantas para resistência ao fungo, várias técnicas tem sido relatadas na literatura para aumento de esporulação - in vitro: irradiação de luz ultravioleta; luz fluorescente; iluminação solar; injuriá do micelio; desidratação do meio ou uso de aditivos químicos.

Estes tratamentos, contudo, resultam, ainda, em baixa produção de conídios e SHAHIN & SHEPARD (1979) publicaram uma metalogia específica para esporulação profusa de *A. solani*. A técnica descrita por estes autores se baseia na transferência para a superfície de um meio secundário (meio de esporulação), após a manutenção em meio primário, cuja composição, não afeta o resultado. O fungo,neste meio secundário de água-ágar acrescido de $CaCO_3$, é incubado no escuro 18°C. Esta técnica foi seguida em nossos experimentos, resultando como as demais descritas na literatura, em produção baixíssima ou mesmo nula de esporos. Trabalhos de resistência para *A. solani* tem utilizado suspensões miceliais (WELLMAN, 1943; LOCKE,1948 ; BROCK, 1950; HENNING & ALEXANDER, 1959).

É interessante lembrar aqui, que as condições de luz não influem apenas na fisiologia dos patogênos, mas, também, na expressão dos sintomas causados por estes patógenos nas plantas hospedeiras. Um exemplo que podemos citar é o de plantas de tomate indicadoras (cv.Rutgers)inoculadas com linhagens suaves e severas de vírus e que foram mantidas sob condições de regimes de luz para se determinar as condições ótimas para expressão dos síntomas e multiplicação viroidal. Observou-se que em plantas mantidas sob luz de vapor de sódio de alta intensidade (650 $\mu E/m^2s$), quando foram indexadas por eletroforese de poliacrilamida gel, a detecção das linhagens foi aumentada de 1.000 vezes quando comparada com as plantas indicadoras crescendo sob luz fluorescente de intensidade luminosa menor , 130 $\mu E/m^2s$ (GRASMICK & SLACK, 1985).

STOESSL et al 1983 isolaram de *A.solani*, outro pigmento, o dactilariol (6, Fig.49A), que se verificou estes relacionado com o altersolanol A e B no fungo *D.lutea*. STOESSL & STOTHERS (1983) denominaram o dactilariol de altersolanol C e o isolaram de filtrados de cultura de 21 dias de idade. O altersolanol C ou dactilariol (6) apresentou ponto de fusão de 256-257ºC e absorção no u.v. (λmax = 420nm segundo STOESSL et al 1979.

Através do uso de espectroscopia de ressonância nuclear magnética ^{13}C, STOESSL et al (1983) verificaram que as culturas de *A.solani* incorporam contatos ($1,2^{13}C_2$) e, macrosporina (3), em altersolanol A (4) e em dactilariol (6) de uma cadeia octocetídea . Segundo estes autores, há evidências que sugerem que altersolanol A (4) pode ser o precursor do altersolanol B, assim como a macrosporina é biogeneticamente derivada do mesmo altersolanol A.

Os resultados de STOESSL et al 1979 estabeleceram que altersolanol A(4) é rapidamente metabolizado por *A.solani* para altersolanol B(5) e macrosporina (3), possivelmente por caminhos ramificados. Parece provável que dactilariol(6) é também formado a partir do altersolanol A(4) através de mediação enzimática e pode originar macrosporina (3) por dehidratação que não necessita ser catalizada enzimaticamente. Os resultados da conversão metabólica do altersolanol A por *A.solani* em outros pigmentos são consistentes com o conceito que a falta comparativa de formação de pigmentos na linhagem ATCC 11078 de *A.solani* observada por STOESSL et al - 1979 foi conseqüência da grande redução da taxa de biossíntese de altersolanol A.

Os pigmentos de *A.solani* mostrados na Fig.49A foram extraídos após 18 dias de incubação do fungo em meio líquido e STOESSL (1969) isolou ao seguintes quantidades de pigmentos, após o período de incubação mencionado: 0,10g de macrosporina (3); 3,46g de altersolanol A(4) e 0,15g de altersolanol B(5).

Estudos químicos dos pigmentos feitos posteriormente pelo mesmo autor (STOESSL, 1982) revelaram que a produção destes pigmentos foi dependente do período de incubação do fungo, a partir de suspensões miceliais em tubercúlos de batata. Por exemplo, a macrosporina (3) esteve presente apenas como traços após incubação - do fungo nos tubercúlos por 2 dias, enquanto, após 7 e 21 dias de incubação do fungo foram isoladas quantidades consideráveis de macrosporina.

Outro pigmento, o altersolanol (A) teve, nas condições mencionadas, produção máxima no 2º e 5º dia de incubação do fungo; produção esta avaliada através de revelação da mancha em cromatografia de camada delgada e absorbâneia do extrato em λ max 420nm (STOESSL, 1982).

O outro metabólito isolado por STOESSL et al (1983) de *A. solani* que não é pigmento, é o metabólito fitotóxico isolado inicialmente do fungo patogênico *A. zinniae* por WHITE & STARRAT em 1967 (apud TEMPLETON, 1972) que o denominaram ziniol (C_{15} H_{22} O_4). Esta toxina (7. Fig.49B) causa um severo enrugamento dos caules das plantas, amarronzamento das nervuras folhares e clorose do tecido foliar codjacente. O ziniol é afetivo na inibição de germinação de sementes, mas, não na germinação de bactérias e fungos (TEMPLETON,1972) Segundo este autor, o ziniol é um benzeno penta substituído, relacionado intimamente a quadrilineatina, um inibidor fúngico isolado do fungo *A. quadrilineatus* Thom & Raper.

Em fungos, os pigmentos parecem atuar como fotoreceptores para vários fenômenos fotobiológicos e teriam em possível papel protetor por prevenir danos a partir da radiação ultravioleta deletéria (LEACH, 1971). Há um acordo geral, segundo LEACH (1971) que as substâncias pigmentadas estão relacionadas, de alguma maneira esporulação, atuando como fotoreceptores.

A esporulação em *A. solani* é um fenômeno fisiológico complexo. A esporulação é estimulada por comprimentos de onda menores que 320nm, mas, o fungo é um "esporulador diúrno", ou seja, necessita de um período de escuro para a formação do conídio(LEACH 1971). Verificou-se, além, que no caso específico de *A. solani* e *A. tomato* há fotoinibição da "fase terminal" de formação do comídio confirmada principalmente aos comprimentos de onda 360-530nm, com a radiação de 450nm particularmente efetiva. Em *A. solani* a inibição de formação de comídio pela luz azul pode ser revertida por um exposição subsequente a luz vermelha (LUKENS, 1963).

Há uma dependência de temperatura na inibição pela luz azul na fornação de conídio em *A. solani* como em vários"esporuladores diurnos".A formação de conídios em colônias de *A. tomato* e *A. solani* é inibida pela luz em temperatura relativamente altas, mas, não em temperaturas baixas.

3.4. Crescimento do fungo em meio líquido (Figura 50 a-f)

A. solani cresceu adequadamente em meio líquido natural (Figura 50 a,b,c,d), mas este meio V 8 contém grande quantidade de resíduos que prejudicam a filtragem. Houve necessidade, pois, de centrifugação para precipitação destes resíduos (FIGURA 50e).

A cultura do fungo no meio sintético de Czapek-Dox, de natureza química conhecida, apresentou ainda uma outra característica - desejável - é límpido, facilitando, assim, a filtração e conseqüentemente a obtenção do filtrado.

Em meio líquido de cultura também houve o aparecimento de características cromogênicas em algumas colônias (Figura 50c). Nos experimentos de pré-seleção não foram utilizados somente os filtrados com características cromogênicas. Era feita uma mistura dos filtrados mais escuros e mais claros (Fig.50f).

Em relação a fisiologia de crescimento do fungo, tanto em meio sólido como em meio líquido, algumas considerações devem ser feitas:

1º)- efeito do valor de pH do meio de cultura - embora tenha se verificado que valores de pH baixos (3,0-3,5) fossem necessários para que *Helminthosporium victoriae* produza a toxina victorina (LUKE & GRACEN, JR.1972b), verificou-se a maioria dos fungos patogênicos, entre eles *Colletotrichum conchorum* Ikata & Tana a faixa dos valores de pH de 5,5 - 6,0, foi a melhor concentração de íons de hidrogênio para esporulação (DUARTE et al 1982).

2º)- período e intensidade de luz - sob condições de luz diária alternante e escuro a temperaturas constantes, ocorre freqüentemente zonação pronunciada em colônias crescendo em meio de ágar .

A zonação pode ser devida ao estímulo ou retardamento de crescimento causado pela luz, assim: como os efeitos na pigmentação produção das estruturas de frutificação e esclerócios (LEACH, 1971) Sobre o efeito da intensidade luminosa na esporulação (LEACH,1971), observou-se que uma certa dosagem mínima de energia radiante (dosagem limiar) é necessária para induzir esporulação e esta quantia é

dependente do comprimento de onda. Se o fungo é exposto a comprimentos de ondas estimuladores em baixas dosagens, não ocorre esporulação. Aumento da dosagem causa uma esporulação mais abundante até um ponto no qual o sistema fotoquímico presumivelmente torna-se saturado e nenhum aumento posterior terá efeito na esporulação.

No presente trabalho, o efeito de intensidade luminosa foi sobre o crescimento do micélio, pois, não ocorreu esporulação em condições de cultura de *A. solani*, fato já conhecido da literatura. Como os fisiologistas e melhoristas vegetais usam os conídios como inóculo para discriminar plantas para resistência ao fungo, várias técnicas tem sido relatadas na literatura para aumento de esporulação - in vitro: irradiação de luz ultravioleta; luz fluorescente; iluminação solar; injuriá do micelio; desidratação do meio ou uso de aditivos químicos.

Estes tratamentos, contudo, resultam, ainda, em baixa produção de conídios e SHAHIN & SHEPARD (1979) publicaram uma metalogia específica para esporulação profusa de *A. solani*. A técnica descrita por estes autores se baseia na transferência para a superfície de um meio secundário (meio de esporulação), após a manutenção em meio primário, cuja composição, não afeta o resultado. O fungo,neste meio secundário de água-ágar acrescido de $CaCO_3$, é incubado no escuro 18°C. Esta técnica foi seguida em nossos experimentos, resultando como as demais descritas na literatura, em produção baixíssima ou mesmo nula de esporos. Trabalhos de resistência para *A. solani* tem utilizado suspensões miceliais (WELLMAN, 1943; LOCKE,1948 ; BROCK, 1950; HENNING & ALEXANDER, 1959).

É interessante lembrar aqui, que as condições de luz não influem apenas na fisiologia dos patogênos, mas, também, na expressão dos sintomas causados por estes patógenos nas plantas hospedeiras. Um exemplo que podemos citar é o de plantas de tomate indicadoras (cv.Rutgers)inoculadas com linhagens suaves e severas de vírus e que foram mantidas sob condições de regimes de luz para se determinar as condições ótimas para expressão dos síntomas e multiplicação viroidal. Observou-se que em plantas mantidas sob luz de vapor de sódio de alta intensidade (650 $\mu E/m^2s$), quando foram indexadas por eletroforese de poliacrilamida gel, a detecção das linhagens foi aumentada de 1.000 vezes quando comparada com as plantas indicadoras crescendo sob luz fluorescente de intensidade luminosa menor , 130 $\mu E/m^2s$ (GRASMICK & SLACK, 1985).

3) Composição do meio de cultura:

A composição salina do meio de cultura de fungo é um fator importante na produção de metabólitos tóxicos, pois, MATERN et al. (1978) verificaram que, embora o pico de crescimento de *A. solani* em meio de Lukens & Sister tenha ocorrido em tempo menor (35 dias) concomitante com a produção de toxina, esta produção foi menor do que a obtida com o meio de Czapek-Dox modificado (0,25% de acetato de amônio). Foi estudado, no presente trabalho, o efeito de variação da concentração de fonte de nitrogênio (no caso, $NaNO_3$, no meio de Czapek-Dox. Testou-se 3 níveis de $NaNO_3$: 2,0g; 1,5 g e 0,5 g. Acompanhou-se: 1a. etapa, crescimento do fungo; 2a. etapa, fitotoxicidade dos filtrados de cultura obtidos e 3a. etapa, efeito dos filtrados de cultura *in vitro*. Observou-se que nas três etapas estudadas não houve diferença significativa entre os 3 níveis de Na NO_3 empregados. Por padronização, em todos os experimentos para pré-seleção *in vitro*, a concentração de $NaNO_3$ empregada no meio de Czapek-Dox foi sempre 2,0 g.

4) Aeração do meio:

Embora várias culturas de fungo sejam mantidas sob agitação constante, vários trabalhos com agentes fitopatogênicos produtores de toxina utilizaram-se de cultura estacionária, como, por exemplo, toxinas específicas de *A. solani* (MATERN et al., 1978) ; tentotoxina de *A. tenuis* (TEMPLETON, 1972); ziniol de *A. zinniae* (TEMPLETON, 1972); toxina específica AL de *A. alternata* (GILCHRIST & GROGAN, 1976); helmentosporosideo, a toxina específica de *Helminthosporium sacchari* (STROBEL, 1975) e a toxina específica victorina, de *H. victoriae* (WHEELER, 1981). Um parêntese para falarmos sobre o helmentosporisídeo. Há um caso na literatura em que todas as definições da doença vegetal podem ser descritas em uma base bioquímica precisa. É o caso da doença da cana-de-açucar, causada por *Drechesiera (Helminthosporium sacchari)*, onde todos os sintomas podem ser atribuídos aos efeitos de uma toxina (o helmintosporosídeo) atuando num sítio celular específico, a membrana celular (STROBEL, 1975).

O meio estacionário para cultura de fungo pode ser igualmente bom para produção de metabólitos tóxicos como o meio submetido à agitação constante. O importante é que o fungo produza metabólitos fitotóxicos nas condições de cultura estacionária, como ocorreu no presente trabalho, com a cultura de *A. solani*, tanto em meio de cultura natural, como em meio de cultura sintética (Czapek-Dox).

FIGURA 50 - CRESCIMENTO DE *Alternaria solani* EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDA PARA POSTERIOR OBTENÇÃO DO FILTRADO.

CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO (a - d)

(a) Cultivo do fungo em meio líquido, em condições controladas de temperatura e luz (1000-1300$\mu w.cm^{-2}$)

(b) Pormenor do crescimento do fungo em meio líquido de natureza química conhecida (Czapeck-Dox modificado).

(c) Alteração de coloração de algumas colônias. A característica cromogênica se manifesta ao redor do 15º dia de cultivo em cultura líquida.

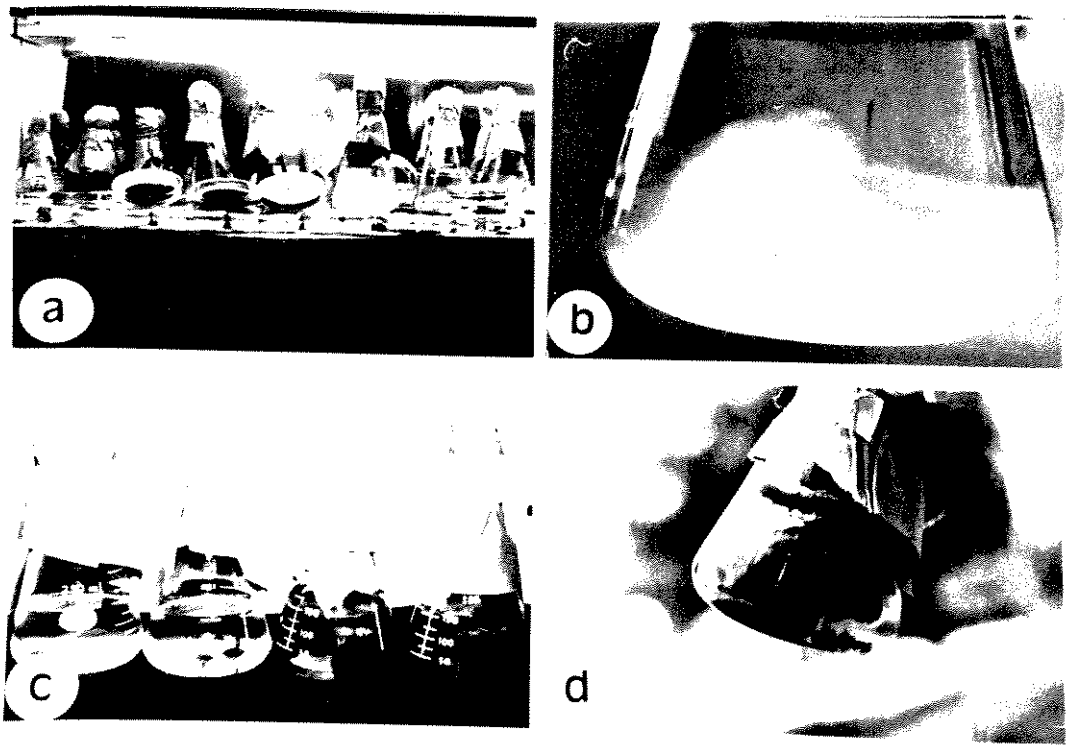
(d) Vista, com aproximação, de uma colônia com características cromogênicas.

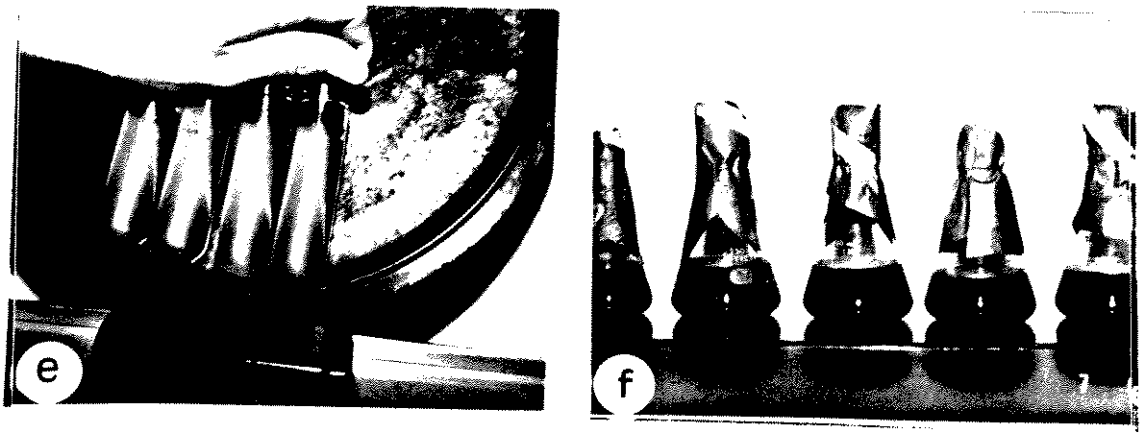
OBTENÇÃO DO FILTRADO (e - f)

(e) Frascos contendo o exsudato do fungo após centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga, marca Fanem Ltda, quando se utiliza meio de cultura natural; suco de legumes comercial V-8 (Campbell Soup Company).

(f) Filtrado estéril obtido pela esterilização em série de membranas de Millipore (8 a 0,44 micra) sob condições assépticas. Esterilização por autoclavagem não altera o aspecto dos filtrados.

FIGURA 50





3.5. Teste de fitotoxicidade do filtrado de cultura (Figura-50 g-j).

Os testes de patogenicidade dos filtrados brutos foram realizados pelo fluxo de transpiração das estacas de tomateiro - baseou-se em POUND & STAHMANN (1951).

Através do método de estacas verificou-se que, o filtrado do fungo, obtido através de cultura em meio líquido, permanece tóxico mesmo na ausência do fungo (Tabela 39).

As estacas, após um período de contato com o filtrado, apresentaram sintomas da doença causada pelo fungo; murchidão, epinastia e manchas necróticas (Figs. 50g, 50h, 50i, 50j). Portanto, a utilização do filtrado de cultura pode ser feita com segurança, visto que o resultado da patogenicidade é positivo.

Foi feito o ensaio de fitopatogenicidade do meio líquido sintético (Czapek-Dox modificado) não metabolizado (sem inoculação do fungo) e não fermentado, também pelo método de fluxo de transpiração, em estacas de tomateiro. O resultado do teste foi negativo, ou seja, os componentes utilizados no meio de cultura líquida, por si, não causam sintomatologia no teste de fitotoxicidade mencionado. Resultado semelhante (não observação do efeito tóxico do meio Czapek-Dox) usando o método de fluxo de transpiração para testar o filtrado do fungo *Didymella applenata* (Niessl) Sacc em estacas de framboesa (SCHURING & SALEMINK, 1972).

Nos testes de estacas de tomateiro, a sintomatologia observada deveu-se realmente à presença de metabólitos liberados pela colônia do agente causal, pois o meio em si não foi tóxico. Este fato foi observado em todos os resultados obtidos, quer da relação entre o período de crescimento do fungo e a produção de metabólitos (item 3.7) quer dos efeitos de condições ambientais na atividade fitotóxica dos filtrados obtidos (item 3.8)

FIGURA 50

TESTE DE FITOTOXICIDADE DO FILTRADO NÃO DILUÍDO EM ESTACAS DE TOMATEIRO cv. ÂNGELA (g - j)

(g) O sintoma inicial da fitotoxicidade é a murcha, como pode ser visto à esquerda (filtrado autoclavado). À direita, apenas o meio de cultivo do fungo (Czapeck-Dox), igualmente autoclavado, não apresenta este sintoma. Documentação após 24 horas de permanência nos filtrados.

(h) O sintoma de progressão da fitotoxicidade é o aparecimento de manchas necróticas, como pode ser visto em estádio inicial à direita (filtrado do fungo).
O filtrado do fungo pode causar também uma murcha bem acentuada. No controle (somente o meio de cultivo do fungo, Czapek - Dox) não aparecem nem manchas necróticas, nem murcha (à esquerda). Documentação após 24 horas.

(i) Mancha necrótica vista com maior aproximação (à direita). Documentação após 24 horas.

(j) Folíolo mostrando um alto grau de fitotoxicidade em presença do filtrado. Observa-se que as nervuras foram danificadas, assim como o mesófilo, pois, pode-se observar a incidência de luz através do folíolo. Documentação após 48 horas.

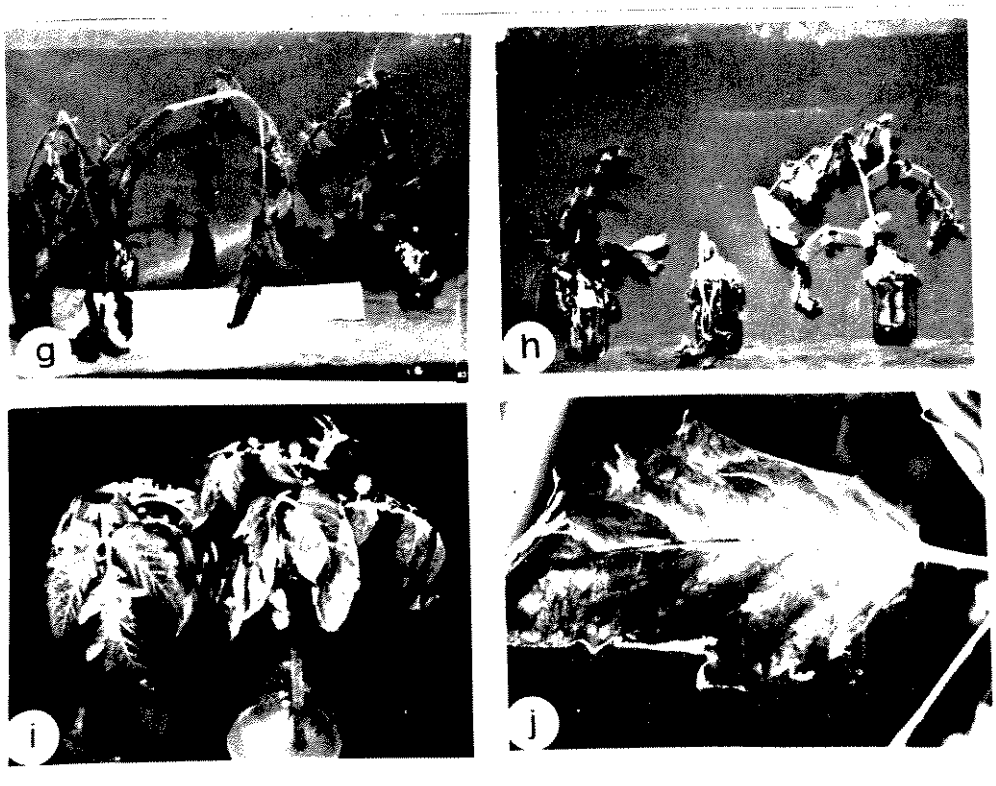


TABELA 39 - Obtenção de filtrados estéreis de cultura de *A. solani* isolado Santa Eliza.

* = filtrados utilizados para verificação da manutenção de fitotoxicidade após congelamento

** = filtrados utilizados nas 2 amostragens (curvas- padrões) de relação entre o período de crescimento do fungo e produção de metabólitos tóxicos.

*** = filtrados ensaiados para verificar efeito de condições ambientais na fitotoxicidade.

**** = filtrado utilizado nº 4 experimento de pré-seleção.

\+ = resposta positiva no teste de fitotoxicidade

\- = teste não realizado.

TABELA 39 - Obtenção de filtrados estéreis de cultura de A. *solani* isolado Santa Eliza

nº do filtrado	Dias de incubação	Volume total de filtrado (ml)	Teste de patogenicidade fungo	Teste de patogenicidade filtrado
1****	33/60	780	+	+
2**	27/30/40	1000	+	+
3	42	1500	+	+
4*	42	1500	+	+
5	45	600	+	-
6	43	150	+	-
7	35	1200	+	-
8	32	150	+	-
9**	10/15/20/25/30/35/40/45/50/55/60	2400	+	+
10	60	150	+	+
11*	30	300	+	+
12	32	2400	+	-
13	30	450	+	-
14	30	1200	+	-
15	29	800	+	-
16* ***	25	2050	+	+
17	60	240	+	+
18*	26	1050	+	+
19*	26	100	+	+
20* ***	26	1325	+	+
21* ***	61	210	+	+
22	25	900	+	+
23	60	1800	+	+
24	27	1280	+	+
25	45	1500	+	+
26	45	1200	+	-
27	45	690	+	+
28	45	1200	+	+
29	45	600	+	-
30***	45	2400	+	+

Volume total de filtrado obtido nas 30 operações = 32,625 litros.

3.6. Conservação do efeito fitotóxico do filtrado após esterilização por autoclavagem (FIGURA 50 1-m).

O filtrado de cultura mantêm-se efetivo após autoclavagem a 120ºC por 20 minutos. (Figura 501, 50m). Observa-se por este fato, que a (s) substância (s) da toxina do fungo não deve(m) ter características protéicas, visto que, sob a ação do calor, o filtrado não perde seu efeito fitotóxico. É interessante ressaltar que BRIAN et al. (1951) verificaram que autoclavagem do ácido alternárico na faixa do pH 4,0 - 7,6 não causava perda da atividade. Esta perda de atividade por autoclavagem só ocorria no pH 3,0. Mas, por outro lado, o metabólito tóxico de *Phytophthora drechesleri* Tucker é sensível ao calor (STRANGE et al. , 1982). Assim como a 1ª toxina especifica so hospedeiro isolada, que foi a toxina isolada de *Alternaria kikuchiana*, em 1933 (apud Yoder, 1980), assim como a toxina de A.*alternata* f.sp. *lycopersici*, cujo filtrado de cultura foi esterilizado por sistemas de membranas (GILCHRIST & GROGAN , 1976).

A victorina a primeira toxina produzida por um fitopatógeno que se mostrou conclusivamente ser agente produtor de doença teve a fitotoxicidade revelada inicialmente por lotes do filtrado de cultura autoclavados a 17 libras de pressão por períodos superior a 2 horas. Os filtrados brutos testados imediatamente após a autoclavagem mostraram não terem perdido a atividade tóxica (LUKE & WHEELER, 1955). Desta maneira, neste trabalho pioneiro todos os filtrados de cultura foram rotineiramente autoclavadas a 17 libras de pressão por 15 minutos para destruir quaisquer fragmentos de micélio que possam ainda estar presentes.

No presente trabalho com metabólitos tóxicos de *A. Solani* utilizou-se, também,rotineiramente para estudos de pré-seleção em larga escala esterilização dos filtrados de cultura por meio de autoclavagem (120^{o}C por 20 minutos).

No caso específico de victorina, verificou-se posteriormente a fitotoxicidade de filtrados diluídos a 1:45 e esterilizados por filtragem de membranas (LUKE & GRACEN JR. 1972b).Segundo estes autores parece haver 2 ou mais espécies de moléculas de toxinas e as mais ativas parecem ser lábeis, embora, como os próprios autores fri-

esterilização do filtrado na fitotoxicidade tanto in vivo como para pré-seleção in vitro.

FIGURA 50

CONSERVAÇÃO DO EFEITO FITOTÓXICO DO FILTRADO APÓS AUTOCLAVAGEM POR 20 MINUTOS A 120°C. DOCUMENTAÇÃO APÓS 24 HORAS DO INÍCIO DO TESTE (1 - m).

(1) Em presença do filtrado autoclavado, (correspondente a 27 dias após inoculação do patógeno) observa-se sintomas de patogenicidade (principalmente murcha e epinastia, além de manchas necróticas). Assim, a ação de *A. solani* ao contrário dos patógenos que causam murchas, não seria devida à produção de enzimas pectolíticas, mas sim à(s) toxina(s).

(m) Em presença de meio de cultivo do fungo Czapek-Dox autoclavado (controle) não há sinais de fitotoxicidade.



3.7. Relação entre o período de crescimento do fungo em cultura líquida e a produção de metabólitos tóxicos.

A relação entre o período de crescimento do fungo e a produção de metabólitos fitotóxicos nos filtrados não diluídos foi avaliada através do método de fluxo de transpiração (estacas).

3.7.1. Relação entre o período de incubação do fungo e a sintomatologia observada

Os danos causados pelos filtrados de cultura do patógeno incubado foi diferentes períodos não afetaram as plantas ensaiadas quanto ao tipo de síntoma apresentado (murcha, necrose e clorose) mas, também, na velocidade de visualização destes sintomas. A relação entre o tipo e o tempo de visualização da expressão do síntoma, após o início do contacto das estacas com os filtrados, foi correlacionado com o período em dias de incubação do fungo. A cada correlação foi atribuida um índice de respostas fitotóxicas em uma escala de índices de notas que variou de 0 (sem síntomas) a 7 (sintomatologia máxima). Estes índices de respostas e respectivas correlações entre os síntomas e o período de incubação do fungo são mostrados na Tabela 40.

É relatado que no campo, a doença Pinta Preta, de ocorrência praticamente universal (só não ocorre nas Índias Ocidentais) as lesões, as vezes, são limitadas pelas nervuras (MILLER & POLLARO, 1976), estádio que convencionamos como índice de resposta fitotóxica igual a 6 em nossos ensaios de laboratório.Já o estádio correspondente ao índice de resposta fitotóxica igual a 7 traduz o tipo e total em nossos ensaios (ver Figuras 23 e 24 - Métodos) que é denominado na língua inglesa de "blight", que é o têrmo pelo qual é conhecida esta doença na língua mencionada, "early blight".

A indução de todos os síntomas típicos da doença Pinta Preta pelo filtrado de cultura de *A. solani* (Tabela 40) encaixa- se num dos critérios utilizados para definir as toxinas como fatôres de patogenicidade. Portanto, toxinas contidas no filtrado de cultura de *A. solani* são consideradas como determinantes primários da doença, são fatores qualitativos, em natureza e são essenciais para que a doença ocorra (YODER, 1980; DURBIN, 1983). O filtrado parece conter, também toxinas como fatores de virulência (medida da

severidade da doença).

Os fatores responsáveis pela virulência ou determinantes secundários da doença, como parece ser as toxinas causadoras de clorose para a Mancha de Alternaria são, então, características quantitativas que contribuem para a severidade de doença e por si não são essenciais à produção de doença. Para DURBIN (1983) a maioria das toxinas são fatores responsáveis pela virulência (determinantes secundários de doença).

3.7.2. Atividade fitotóxica de filtrados de cultura submetidos a tratamentos de temperatura.

Primeiramente, se estudou o efeito de temperaturas baixas (cerca de -10°C) na atividade fitotóxica dos filtrados obtidos. Os filtrados obtidos nºs 4,11,18,20 e 21 (ver Tabela 39) foram armazenados por cerca de 3 meses a cerca de -10°C, no congelador.

Após este período, as atividades fitotóxicas dos filtrados, assim como d'água estéril, controle (meio de cultivo do fungo, não metabolizado, sem inoculação do fungo) e To-M_3 (meio de cultivo de calo, sem inoculação do calo) foram verificadas através do método de fluxo de transpiração em estéreis de tomateiro , utilizando-se 2 estacas por ponto.

Verificou-se que não houve perda da atividade fitotóxica dos filtrados armazenados no frio, tendo sido mantida, inclusive, estatisticamente, a maior atividade fitotóxica de filtrados obtidos após maior período de incubação do fungo.Tanto as estacas mantidas n'água destilada, como no controle e To-M_3, não apresentaram sintomatologia de toxicidade. Temperatura baixa, portanto,não retira o efeito fitotóxico dos filtrados.

A atividade fitotóxica de amostras independentes de colônias do fungo retiradas duranto o período de crescimento do fungo foi avaliada através dos filtrados que foram submetidos a:
- alta temperatura (autoclavagem = 20 minutos a 120°C)
- baixa temperatura (cerca de 5°C).

Foram feitas 2 amostragens (curvas-padrões) não simultâneas e fitotóxicidade foi observadas através da expressão dos sintomas, após 24 horas de permanência nos filtrados. A dinâmica de expressão de cada síntoma foi anotada e foi atribuída em índice de nota (ver tabela 40). Foram atribuídos índices de notas para:

a) filtrados de cultura do fungo submetidos a 1) alta temperatura e 2) baixa temperatura.

b) controle (autoclavado) meio de cultura do fungo, não metabolizado, sem inoculação do fungo.

c) água destilada (autoclavada)

Os índices de notas atribuidas em cada tratamento, para amostras independentes durante o período de crescimento de fungo estão visualizados na Figura 51, tanto para a 1ª curva-padrão (Figura 51A) como para a 2ª curva-padrão (Figura 51B).

Os índices de notas atribuídos aos 4 tratamentos, nas de amostragens (curvas-padrões) foram analisados estatisticamente pela análise de variância.

Pela análise estatística realizada, verifica-se que não houve diferença significativa entre as 2 curvas-padrões realizadas. Este fato foi observado tanto nas curvas-padrões feitas com o filtrado submetido ao calor (autoclavado) como para o filtrado submetido à baixa temperatura (filtrado não autoclavado). E o mesmo foi verdade para o controle, pois não houve diferença significativa no controle entre as 2 curvas-padrões.

Nas curvas-padrões em que se utilizou filtrado autoclavado Verificou-se que o período de incubação do fungo em meio líquido de Czapek-Dox afetou significativamente a produção de metabólitos fitotóxicos. Esta relação foi, inclusive, altamente significativa($p \leq 0,005$), pelo teste de comparação das médias, independentemente do processo físico ao qual foi submetido o filtrado (alta ou baixa temperatura).

Pela análise estatística, a visualização dos danos causados pelos filtrados devem-se realmente à produção de metabólitos fitotóxicos produzidos pelo fungo, pois, não houve efeito tóxico esta

tisticamente significativo quando as estacas foram mergulhadas em meio líquido do cultivo do fungo, correspondente aos períodos de tempo das curvas-padrões (controle). Este fato ocorreu em ambas as curvas-padrões.

Quanto aos danos verificados nas estacas mergulhadas em água estéril, estes não foram estatisticamente diferentes entre a 1º e 2º curva-padrão. Em relação ao período de permanência em água estéril, verificou-se que os danos para a 1ª curva não foram estatisticamente significativos para os dias considerados já para a 2ª curva-padrão houve diferença significativa, não tendo alcançado , porém, alto nível de significância ($p \leq 0,020$). Este resultado, porém, se deveu provavelmente aos dados discrepantes do 40º dia, e biologicamente podemos considerar que a água estéril per si não causa danos estatisticamente significativos, pois, quando se compara os dados das 2 curvas-padrões realizadas em presença de água estéril, a probabilidade de diferença de danos causados pelos periodos de permanência em água estéril diminui ($p \leq 0,035$).

A observação da produção de metabólitos fitotóxicos pelos filtrados submetidos a tratamentos de calor e frio, em relação ao período de crescimento do fungo em meio líquido (Figura 51)mostrou que:

1) os filtrados, tanto mantidos em baixa temperatura como expostos ao calor, não perderam o efeito tóxico, em todo o período de crescimento do fungo considerado. Tratamentos de temperatura - testados não retiraram o efeito tóxico dos filtrados;

2) ambas as curvas de ação dos filtrados tratados foram semelhantes. Houve uma produção de metabólitos fitotóxicos, produção esta que resultou em curva sigmoíde de ação tóxica, cuja fase inicial não foi estatisticamente significativa. A curva só foi estatisticamente significativa ao redor do 20º dia de permanência de colônia do fungo em meio líquido em diante. Esta curva se estabilizou ao redor do 40º dia de incubação. A partir do 45º dia de incubação da colônia do fungo em meio líquido de Czapek-Dox ocorreu um aumento do efeito fitotóxico do filtrado obtido. O aumento da fitotoxicidade após 45 dias de incubação do agente causal em meio liquido de Czapek-Dox deve-se provavelmente a várias causas: aumento e ou inversão do metabolismo em geral; uso de vias alternativas

do metabolismo de açucares, devido ao fato da fonte de energia (no caso, sacarose), encontrar-se exaurida ou, então, à produção de metabólitos de deterioração da própria cultura do fungo; e

3) quanto à relação entre o tratamento térmico do filtrado de cultura e o período de crescimento da colônia do fungo em meio líquido de Czapek-Dox; apenas em 2 períodos definidos pode-se observar efeitos distintos, devido ao tratamento dos filtrados: no 25º dia de permanência em meio líquido, quando o filtrado, após o congelamento, foi mais tóxico que o filtrado submetido ao calor e, inversamente, ao 60º dia de permanência em meio líquido, quando o filtrado submetido ao calor teve ação tóxica mais acentuada que o filtrado submetido à baixa temperatura.

3.7.3. Relação entre fases de crescimento do fungo *in vitro* e produção de metabólitos fitotóxicos

O passo seguinte foi verificar se a produção de metabólitos estava correlacionada às fases de crescimento do fungo em cultura líquida de Czapek-Dox. Para tanto, o crescimento do fungo foi acompanhado e atribuiram-se notas conforme a etapa de crescimento (ver MÉTODOS - Fig. 22). Após a obtenção de curva sigmóide, esta foi dividida em fases de crescimento (Figura 52A), conforme descrito por DURBIN (1983). As fases de crescimento do patógeno estão alinhadas aos dados de resposta fitotóxica, descrito na TABELA 40, que foram, então, representados graficamente (Figura 52B).

Nos testes de fitotoxicidade do filtrado de cultura (não diluído) pelo método de transpiração (estacas), realizados em relação ao período de crescimento do fungo, observou-se que:

a) o efeito fitopatogênico do filtrado só foi significativo a partir do 20º dia de incubação do fungo. A partir deste período de crescimento do fungo, o efeito fitopatogênico do filtrado de cultura foi altamente significativo ($p = 0,005$). O início do efeito fitopatogênico não se inicia rigidamente ao redor do 20º dia, pois, no 15º dia, o efeito poderia ser significativo se usássemos um nível de significância diferente (5%), em vez do usado (0,5%), para discriminar as respostas (Figura 51);

b) em relação ao período de crescimento em meio líquido de Czapek-Dox, o período de visualização do sintom necrose provocado pelos filtrados de culturas de fungos incubados por tempos crescentes, passou a ser progressivamente menor, além de ter lesado áreas maiores do limbo foliar (TABELA 40);

c) o sintoma de clorose (Tabela 40 e Figura 52B) se restringiu ao período de crescimento final (IV) do fungo (Figura 52 A):

Portanto, o síntoma de clorose não deve estar relacionado com a indução da patogenicidade, por isto, nos testes de resistência *in vivo* das plantas regeneradas e respectivas progênies (gerações R_o e R_1) se considerou apenas o síntoma de necrose, que está relacionado, pelos testes de estacas, a culturas mais jovens do fungo (Tabela 40).

É interessante ressaltar que o teste de fitopatogenicidade empregado, (fluxo de transpiração em estacas de tomateiro) desenvolvido por POUND & STAHMANN (1951) para a doença Pinta-preta - mostra *in vivo* o síndrome da doença de murcha vascular: epinasta, murchidão, clorose e necrose (DICKINSON & LUCAS, 1982).

A principal causa do síntoma de murcha nas doenças de murcha vascular, para determinados autores é o bloqueio mecânico dos elementos condutores do xilema (DIMOND, 1970). Trabalhos realizados mostram que tanto a hipótese de que este bloqueio se deva a presença física das hifas do patógeno, como a hipótese que as tiloses produzidas pelas plantas hospedeiras seriam a causa do bloqueio - não são convincentes (*apud* DICKINSON & LUCAS, 1982).

Em 1970, DIMOND formulou a hipótese de que a principal causa do bloqueio dos elementos condutores seria o produto de degradação da parede celular, as enzimas pectolíticas, sintetizadas pelo patógeno. Já para DICKINSON & LUCAS (1982) haveria vários fatores:

1) enzimas pectolíticas mencionadas
2) fatôres hormonais (auxinas)
3) toxinas

A estabilidade do efeito tóxico do filtrado bruto de *A. solani* após autoclavagem indica que o efeito do filtrado, no teste - de fitopatogenicidade não se deve à presença de enzimas pectolíticas.

TABELA 40 - Escala por índice de respostas fitotóxicas de A.solani em relação ao período de permanência do fungo em meio líquido. Resposta avaliada através do teste de estacas do tomateiro. Filtrados de culturas obtidos de amostras retiradas durante o período de crescimento do fungo em meio de Czapek-Dox. Padrão obtido de respostas fitotóxica foi semelhante tanto para o filtrado esterilizado por autoclavagem como para o filtrado não autoclavado, armazenado a baixas temperaturas. Conceito dado está relacionado com o tipo e progressão das manchas necróticas (Ver Métodos - Figuras 23 e 24).

TABELA 40

ÍNDICE	CONCEITO	PERÍODO DE INCUBAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO (DIAS)
0	Sem sintomatologia	10
1	Murchidão após 24 horas, sem aparecimento de manchas necróticas	15
2	Murchidão após 5 horas, manchas necróticas após 72 horas (predominantemente tipo a)	20
3	Murchidão após 2 horas, manchas necróticas após cerca de 24 horas (predominantemente tipos a,b)	30
4	Murchidão não é o sintoma inicial, manchas necróticas (tipos a , b) após 3 horas, sem progressão das manchas. Ocorre após murcha total	40
5	Leve murchidão. Manchas necróticas após 24 horas (predominantemente tipo c) com progressão até colapso total	50
6	Sem murchidão. Manchas necróticas iniciam-se na região das nervuras (tipo c) após 5 horas até atingir áreas contínuas (tipo e). Predomínio da mancha necrótica tipo c após 5 horas	55
7	Sem murchidão.Manchas necróticas iniciam-se como tipo c após 3 horas. Forma-se clorótico ao redor das manchas necróticas após 5 horas. Predomínio das manchas necróticas tipo e após 5 horas	60

FIGURA 51 - Atividade fitotóxica de filtrados de cultura submetidos a tratamentos de temperatura.

Fitotoxicidade avaliada através do teste de fluxo de transpiração (método de estacas). Estacas testadas de tomateiro cv. Ângela. Isolado do fungo testado: Santa Eliza. Fungo cultivado em meio líquido de Czapek-Dox, estacionário, à temperatura controlada ($19 \pm 2^{o}C$) e intensidade luminosa $1.300\mu w.cm^{-2}$. Foram retiradas amostras independentes após inoculação de áreas miceliais padronizadas de cultura do isolado do fungo em meio líquido. Foram feitas 2 amostragens (curvas-padrões), não simultâneas.

A) amostras retiradas após 10,15,20,25,30,35,40,45,50,55 e 60 dias de inoculação em meio líquido, e

B) amostras retiradas após 27, 30 e 40 dias de inoculação em meio líquido.

Fitotoxicidade observada através de sintomas macroscópicos. Estes sintomas foram agrupados em índice de nota, variando de 1 (sem sintoma) até nota máxima (7). A anotação dos sintomas foi feita após 24 horas de permanência em:

—●— filtrado autoclavado (submetido a alta temperatura)
—■— filtrado não asséptico, mantido a baixa temperatura
--○-- controle sem inoculação do fungo, só meio sintético (autoclavado)
--□-- H_2O destilada (autoclavada)

Os índices de notas atribuídas foram analisados estatisticamente (análise de variância) e a significância dos valores de F obtidos foi:

NS = não significativo em relação aos valores dos controles (controle e H_2O estéril)

** = altamente significativo ($P \leq 0,0050$).

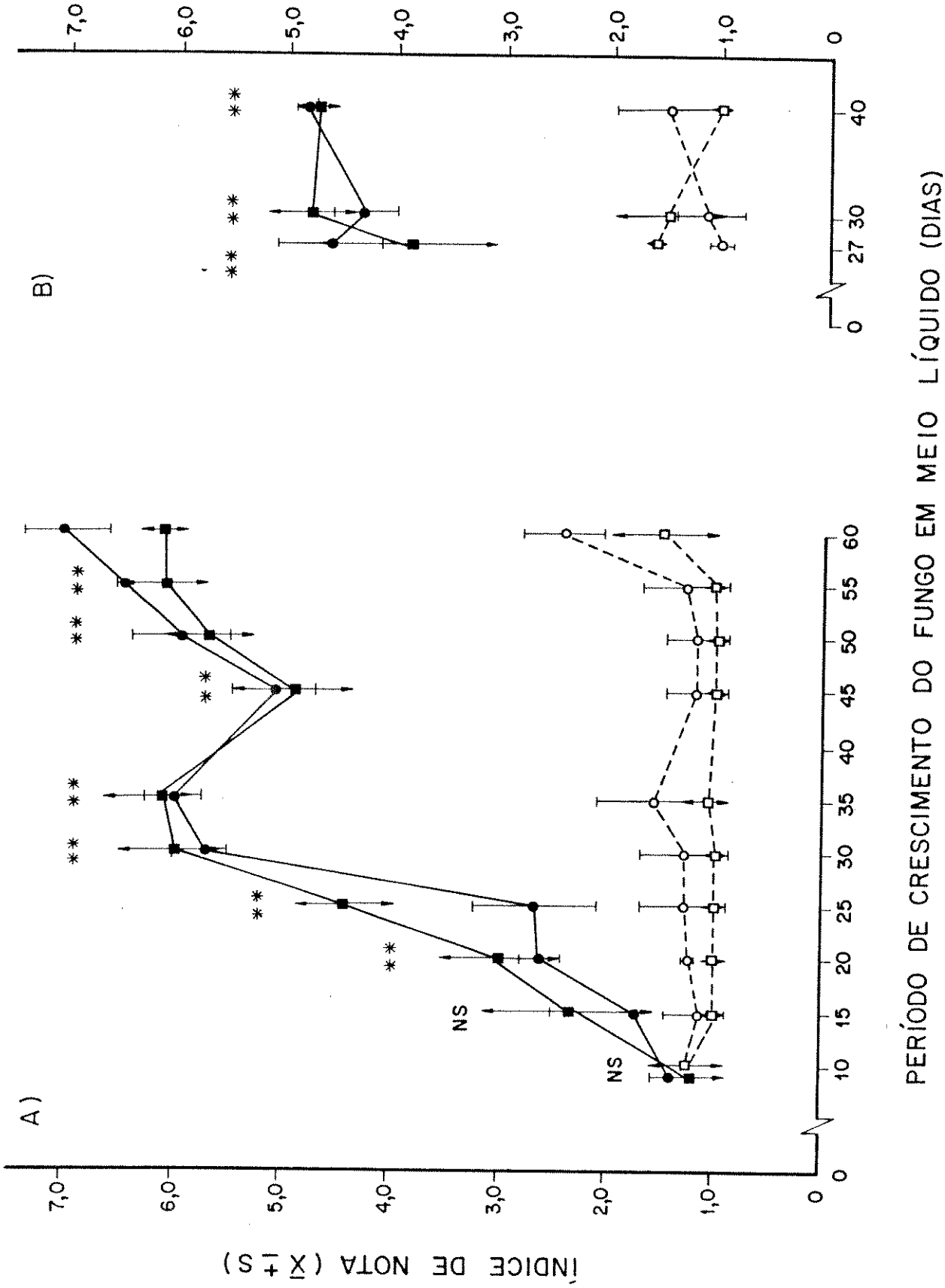

ÍNDICE DE NOTA ($\bar{X} \pm S$)
PERÍODO DE CRESCIMENTO DO FUNGO EM MEIO LÍQUIDO (DIAS)
A)
B)
NS
NS

FIGURA 51

FIGURA 52 - RELAÇÃO ENTRE FASES DE CRESCIMENTO DO FUNGO *in vitro* E PRODUÇÃO DE METABOLITOS FITOTÓXICOS.

A - Curva de crescimento de A.solani em meio sintético de Czapek-Dox (2,0 g de $NaNO_3$). Crescimento avaliado visualmente por nota (5 replicatas por tratamento). Fases de crescimento segundo DURBIN, 1983.

FASE I = lag

TROFOFASE

FASE II = logarítmica ou exponencial

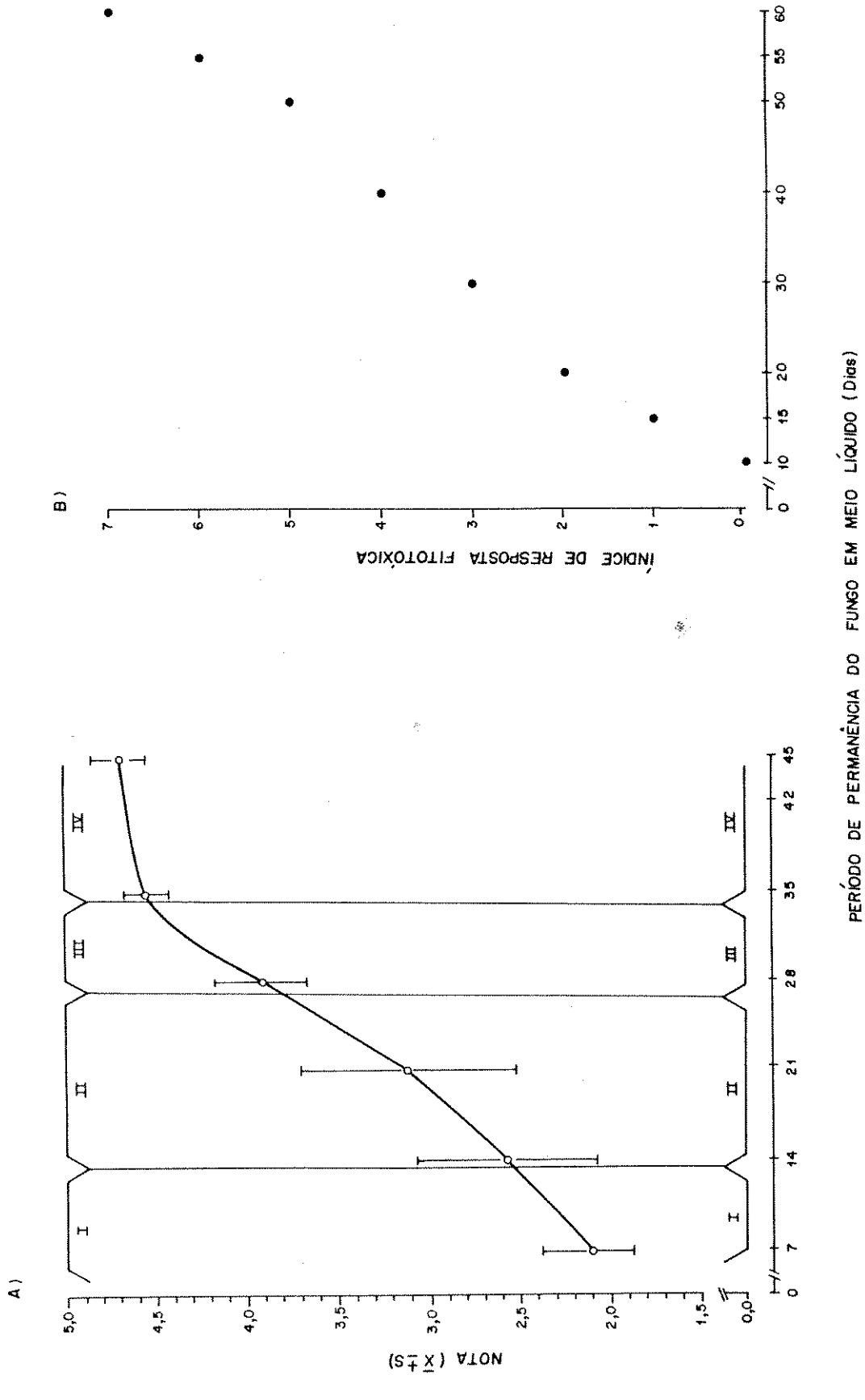
FASE III = estacionária ou equilíbrio

IDIOFASE

FASE IV = autolítica ou morte

B - Resposta fitotóxica do filtrado estéril, avaliada através do teste de transpiração em estacas de tomateiro. Foram retiradas amostras durante o período de permanência do fungo em cultura líquida, como mencionada acima, de uma mesma colônia inicial. Padrão de respostas fitotóxica obtido foi semelhante tanto para o filtrado esterilizado por autoclavagem (autoclavado) como para o filtrado não autoclavado, armazenado a baixas temperaturas. (para indíce de respotas fitotóxica ver Tabela 40).

FIGURA 52


A)
B)
NOTA ($\bar{X} \pm S$)
ÍNDICE DE RESPOSTA FITOTÓXICA
PERÍODO DE PERMANÊNCIA DO FUNGO EM MEIO LÍQUIDO (Dias)
I
II
III
IV

3.8. Efeito de condições ambientais na atividade fitotóxica do filtrado de cultura de *A. solani*

Estudou-se o efeito de condições ambientais (principalmente qualidade de luz) na atividade fitotóxica dos filtrados de cultura de *A. solani*. Isto foi feito com o intuito de se poder conferir a atividade fitotóxica do filtrado em pressão de seleção, durante o período de cultivo dos explantes/ calos para seleção *in vitro*.

Os filtrados que apresentaram caracteristicas cromogênicas, esterilizados por autoclavagem, foram mantidos nas mesmas condições de cultivo de cultura de tecidos em pré-seleção: 1ª condição, temperatura controlada, fonte de luz fornecida por luzes incandecentes e 2ª condição, temperatura ambiente, fonte de luz fornecida por luzes incandescentes. Fez-se, simultaneamente, testes de fitotoxicidade dos mesmos filtrados sem autoclavagem mantidos continuamente nas temperaturas baixas (cerca de 10°C). Resultados anteriores (ver item 3.7.2.) mostraram que baixa temperatura não retira o efeito fitotóxico dos filtrados.

Verificou-se que o efeito das condições ambientais na atividade fitotóxica foi marcante (TABELA 41):

1) filtrados mantidos sob luzes fluorescentes apresentaram-se tóxicos, com atividade fitotóxica equivalente aos filtrados congelados. Ambos os filtrados citados, foram obtidos a partir do período de incubação (25-26 dias) cujo filtrado submetido ao frio foi mais tóxico que o filtrado autoclavado (ver FIGURA 35).

2) filtrados mantidos sob luzes incandescentes não apresentaram toxicidade, pois, a escala de nota sempre se situou em torno de 1,0 (sem sintomas), em grau semelhante ao controle e água estéril. Este fato foi verdade mesmo no filtrado mantido sob luzes incandescentes obtido após o período de incubação de 60 dias, que como vimos na Figura 35 apresenta ação tóxica mais acentuada que o filtrado submetido à baixa temperatura (congelado).

TABELA 41 - EFEITO DE CONDIÇÕES AMBIENTAIS NA ATIVIDADE FITOTÓXICA DO FILTRADO DE CULTURA DE *A. solani*, I-SANTA ELIZA.

Comparação da atividade fitotóxica (avaliada através do método de estacas) dos filtrados mantidos em 2 condições de cultivo: sala com luzes fluorescentes, a 22-29°C (fluorescente) e sala com temperatura controlada, 25 ± 2°C e luzes incandescentes (incandescentes com filtrados mantidos nas temperaturas mencionadas e filtrados submetidos e baixas temperatura (congelado). Cada ponto representa 2 estacas.

Controle- meio de cultura do fungo, sem inoculação do fungo Foi testado após o mesmo período de incubação ao meio de cultura metabolizado (com inoculação do fungo).

** escala de nota: de 1,0 (sem síntomas) a 5,0 (sintomatologia máxima)

* os resultados dos testes de patogenicidade do fungo e do filtrado para cada filtrado considerado, são mostrados na Tabela 39.

TABELA 41

Filtrado obtido após período (dias) de incubação	Numero do filtrado*	Condições de cultivo	Nota ** ($\bar{x} \pm s$)
25	16	congelado	$3,5 \pm 0,7$
	16	fluorescente	$3,6 \pm 0,9$
26	20	congelado	$2,8 \pm 0,1$
	20	congelado	$2,7 \pm 0,3$
	20	fluorescente	$2,8 \pm 0,0$
	20	incandescente	$1,6 \pm 0,0$
26	controle	incandescente	$1,4 \pm 0,5$
45	30	incandescente	$1,3 \pm 0,0$
	30	incandescente	$1,3 \pm 0,3$
	30	incandescente	$2,1 \pm 1,2$
45	controle	incandescente	$1,1 \pm 0,2$
			$1,6 \pm 0,2$
45	controle	fluorescente	$1,2 \pm 0,1$
			$1,1 \pm 0,2$
			$1,6 \pm 0,2$
0	H_2O estéril		$1,0 \pm 0,0$
			$1,1 \pm 0,2$
50	02	incandescente	$1,7 \pm 0,6$
60	21	congelado	$4,0 \pm 0,3$
	21	incandescente	$1,5 \pm 0,4$

Lâmpadas fluorescentes são lâmpadas de descarga de gás com a descarga máxima imitindo alta energia na região ultravioleta, a maioriada qual é absorvida pelo tubo de vidro e por coberturas internas de várias combinações de fósforos, tais como tungstenatos e silicatos de cálcio, magnésio, cadmio e zinco (BICKFORD & DUNN, 1972).

As lâmpadas de luzes fluorescentes luz-do-dia frias como as utilizadas no presente trabalho emitem significante ultravioleta próximo (LEACH, 1971) É interessante que a ação deste espectro de onda é extremamente importante para fungos, em geral, induzindo esporulação, e em particular nos fungos imperfeitos, onde a ação do aspectro do UV 230-360nm estimula vários aspectos do crescimento, sendo que os comprimentos de onda estão confinados a comprimentos de onda menores que 320nm.Isto é verdade para vários fungos imperfeitos, inclusive *A.solani* (LEACH, 1971).

Outro ponto a ser lembrado é o de que o acido alternárico apresenta absorção na faixa do ultravioleta do espectro de luz,sendo que a absorção máxima ocorre perto de 210 a 270nm em meio ácido e 250 a 270 em meio básico (BARTELS-KEITH & GROVE, 1959).

Segundo ADERBAL MAGALHÃES (comunicação pessoal) o espectro de luz emitida pelas luzes fluorescentes ativa o efeito de uma classe de substâncias químicas: os policetilenos. Os policetilenos são, contudo, extremamente sensíveis ao calor e, assim, o tratamento de esterilização (autoclavagem) deveria te-los danificado irremediavelmente. Acrescente-se a isso o fato de que policetilenos não foram até o presente isolados de *A.solani* e, portanto, a ativação de efeito de policetilenos, por ventura existentes nos filtrados de *A.solani*, pelas luzes fluorescentes não deve ter sido a causa, provável , da permanência do efeito fitotóxico sob luzes fluorescentes.

A atividade fitotóxica dos filtrados coloridos poderia ser devida, talvez, aos pigmentos metabolizados por *A.solani* em meio de cultura (Figura 49.A), pigmentos que apresentaram todos spectro de absorção na ultravioleta. Recordando, lâmpadas fluorescentes emitem alta energia nesta região do espectro de luz.

Outra hipótese para os resultados poderia ser degradaçãode compostos responsáveis pela fitotoxicidade do filtrado de cultura de *A.solani* sob luzes incandescentes.

A radiação das lâmpadas incandescentes se situa primeiramente na parte laranja-vermelho do espectro, tendo baixa radiação nos comprimentos azul-violeta e tendo falta quase total de raios ultravioleta (LEACH, 1971). O efeito de degradar metabólitos tóxicos de *A.solani*, responsáveis pela atividade fitotóxica do filtrado de cultura, se deveria, provavelmente aos comprimentos de onda 650-700nm, região esta na qual a energia relativa é de 25 e 15% respectivamente para luzes fluorescentes e de 70 a 90% respectivamente para luzes incandescentes, pois a 625nm, as curvas e energia relativa de ambas as fontes de radiação se cruzam em 60%. (LEACH, 1971).

É bom frisar que estes resultados sè referem a comparação de filtrados mantidos nas 2 fontes de radiação citadas após o mesmo período de permanência (3meses) dos filtrados nas condições descritas. Períodos maiores (2 anos) de permanência dos filtrados em condições ambientais de temperatura, mesmo sob luzes fluorescentes, resultaram em perda total da atividade fitotóxica dos filtrados.O mesmo não aconteceu com os filtrados mantidos em baixas temperaturas , cerca de $-10^{o}C$, filtrado congelado pelo período de 2 anos. Após este período de armazenamento no frio os filtrados de cultura testados(10 filtrados de cultura) não perderam atividade fitotóxica.Fato semelhante, conservação do efeito fitotóxico durante o armazenamento à frio, (6meses), foi observado em relação a toxina específica toxina-AL(ver figura 2b-Revisão de Literatura) isolada de *A.alternata* f.sp. *lycopersici* o agente causal do cancêr de caule no tomateiro (GILCHRIST & GROCAN,1976).

4. Obtenção do Filtrado de Cultura de *A. solani* e sua utilização como pressão de seleção

4.1. - 1º Experimento - Isolado Santa Eliza

Neste experimento, estudou-se o efeito do tipo de es-

terilização e de diluição do filtrado de cultivo obtido a partir de fungo cultivado em meio líquido natural (suco de legumes - V8).Na avaliação do experimento, considerou-se a contaminação (%);crescimento dos caules (I.C.); regeneração (nº de gemas formadas);enraizamento (nº de plantas enraizadas); aclimatação (nº de plantas na estufa) e sobrevivência (nº de plantas no campo), nos diversos tratamentos (TABELA 42.1).

Na análise dos resultados, expressos na Tab. 42.1 destaca-se em primeiro lugar o efeito do tipo de esterilização em relação à contaminação. Esterilização por membranas de Millipore, sem contato com calor, resultou em contaminação bem mais alta que a esterilização por calor úmido (autoclavagem) chegando inclusive a ser total no tratamento 1A (50% do filtrado original). Esterilização por membranas de Millipore exige equipamentos específicos e manuseio extremamente cuidadoso, o que talvez explique o teor de contaminação encontrado. A maior facilidade de esterilização com autoclavagem aliada a condição imprescindível de que este tipo de esterilização não tenha alterado o efeito tóxico do filtrado (Fig.50f) recomenda fortemente este tipo de esterilização, o que facilita sobremaneira a preparação dos meios com filtrados do fungo.

Outro fato interessante foi a promoção de crescimento de calo dos meios com filtrado, em relação ao controle, promoção esta maior nos filtrados que não passaram pelo processo de calor (autoclavagem). Nos filtrados que sofreram este processo, houve, inclusive, ligeira inibição de crescimento, notadamente na concentração 50% diluída (v/v). A promoção observada com os filtrados autoclavados foi qualitativa. Tanto a regeneração como o enraizamento,nos meios com filtrado, principalmente os autoclavados, ocorreram em período mais curto que o controle (ver Tab.44). Um fato interessante é o de que, as primeiras folhas de plantletes regeneradas, geralmente fo

ram inteiras, pequenas e lobadas. Esta característica não se mantêve nas folhas posteriores.

Quanto à regeneração (nº de gemas formadas), houve diminuição no número de gemas formadas em presença de filtrado de cultura de A. *solani*, independentemente do tipo de esterilização empregada. Um dado que deve ser mencionado é o comportamento do controle V8, que diferiu marcantemente conforme o tipo de esterilização empregado, autoclavagem reduziu drasticamente seu efeito quer no crescimento dos calos, quer no número de gemas formadas. O processo de autoclavagem (calor) deve, talvez, causar degradação de certas substâncias, de natureza desconhecida já que se trata de um suco de legumes, que in vitro inibiram tanto o crescimento como a regeneração.

As dificuldades técnicas causadas pela turvidez do meio V8 (ver Fig. 50a,b) acrescida do efeito inibidor deste meio in vitro após autoclavagem (Tab. 42.1), desaconselham a utilização deste meio para a cultura líquida de A. *solani* com objetivo de obtenção de filtrados e posterior utilização em cultura de tecidos.

TABELAS 42 a 45 - Resultados dos experimentos com filtrado de A. *solani* e utilização deste como pressão de seleção in vitro. 1º experimento - Isolado Santa Eliza. Período de cultivo do fungo em meio líquido natural = 19 dias.

HISTÓRICO DO 1º EXPERIMENTO

Preparo dos tratamentos	- 06/07/82
Inoculação dos explantes	- 12/07/82
Início da retirada das plantletes para enraizamento	- 17/08/82
Plantas para estufa	- 18/10/82
Plantas para o campo	- 17/11/82
Eloração das plantas R_o	- 14/12/82
Frutificação das plantas R_o	- 20/01/83

TABELA 42.1

Efeito em regeneração do tipo de esterilização e de concentração do filtrado de cultura do fungo cultivado em meio líquido natural (1º Experimento). Análise quantitativa

Tratamentos	Contaminação (%)	I.C.	% do controle	Nº gemas	% do controle	Plantas enraizadas			Plantas na estufa	Plantas no campo
						Nº	% do controle	% em relação a fase anterior	Nº	Nº
1A 50% filtrado passado de Millipore v/v	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1B 25% " " " v/v	80	2,30	184,0	34	46,6	-	-	-	-	-
1C 10% " " " v/v	22	1,88	150,4	42	57,5	4	14,1	9,0	1	1
1D controle V8 (20%)	25	1,25	100,0	73	100,0	27	100,0	37,0	5	3
2A 100% filtrado autoclavado v/v	0	1,02	150,0	50	72,4	14	77,8	28,0	4	2
2B 50% " " v/v	0	0,72	105,9	35	50,7	25	138,9	71,4	8	1
2C V8 (20%) v/v	0	0,68	71,6	22	31,9	6	33,3	27,2	1	1
2D controle MS normal (concentração 1/2 normal de nutrientes)	0	0,95	100,0	69	100,0	18	100,0	26,1	6	2

O enraizamento das gemas regeneradas foi relativamente baixo (26,1%) no controle. Apenas 2 tratamentos diferiram marcantemente do controle: 1C (10% do extrato passado por Millipore) que apresenta uma queda de enraizamento, na ordem de aproximadamente 4 vezes e 2B (50% do extrato autoclavado) que apresentou uma melhora de enraizamento de aproximadamente 3 vezes (Tab. 42.1).

O tratamento 2B resultou também em promoção do ponto de vista qualitativo, menor período de tempo para enraizamento (de 3 a 34 dias ; enquanto no controle 2D o enraizamento só se iniciou, efetivamente, a partir do 34º dia) e para plantio no campo, pois estavam aptas ao redor do 50º dia a partir das plantas regeneradas (Tab. 44.2), enquanto que em outros tratamentos as plantas estiveram normalmente aptas entre 60 dias (Tab. 44.1) e 73 dias (Tab. 44.2). A visualização do efeito promotor do tratamento 2B pode ser visto na Fig. 59 , assim como a sobrevivência da planta A/2B/07 no campo.Esta planta apresentou dominância apical total como pode ser visto na Fig.59. Esta característica, no entanto, não foi observada na replicata que apresentou o aspecto típico, altamente ramificado. Um fato que deve ser mencionado é o de que a planta A/2B/07 resultou de uma planta regenerada no estádio 2, estádio que resultou em pequena sobrevivência no campo (ver Fig. 32), enquanto as plantas sobreviventes no campo dos outros tratamentos regeneraram nos estádios 3 e 4,mais propícios à sobrevivência no campo.

Neste 1º experimento, com filtrado (período de cultivo do fungo = 19 dias) utilizou-se 2 tipos de explante inicial, ambos provenientes de folha e calo de 12-15 dias. No primeiro caso (Tab. 42.2 o início da desdiferenciação, as primeiras divisões das células ocorrem em presença do filtrado in vitro; no 2º caso (Tab. 42.2), já há células desdiferenciadas quando se inicia a pressão de seleção (pré-seleção in vitro).

TABELA 42- Efeito do Tipo de Esterilização e da Concentração do Filtrado de Cultura de Fungo Cultivado em Meio Líquido Natural em Regeneração (1º Experimento).

Efeito do explante inicial (recém-inoculado ou calo de 12-15 dias). Utilizou-se o isolado Santa Eliza de *A. solani* e o período do fungo em meio líquido natural = 19 dias. Fonte de explante: Folha definitiva de plântula crescida assepticamente. Condições de cultivo: 15 dias no escuro e transferência para condições controladas de luz e temperatura.

N_1 = número de calos regenerados

N_2 = número total de regenerações

N_2/N_1 = freqüência de regeneração

Classe de regeneração:

$$\text{Plantas} = \frac{\text{n estádio } 4.100}{N_2}$$

$$\text{Folhas} = \frac{\text{n estádio } 3 + \text{n estádio } 2 + \text{n estádio } 1}{N_2}$$

$$\text{Gemas} = \frac{\text{n estádio zero}}{N_2}$$

TABELA 42.2- Explante inicial: recém-inoculado

TABELA 42.3- Explante inicial: calo de 12-15 dias de idade

TABELA 42.2- Explante Inicial - Recém-Inoculado

Material Vegetal	Esterilização do Filtrado	Dias após Inoculação	Regeneração								
			Número		Estádio					Classe (%)		
			N_2	N_2/N_1	4	3	2	1	0	Plantas	Folhas	Gemas
B (Si319006	Membranas	70	1	1,0	0	1	0	0	0	0,0	100,0	0,0
Si-78	10% v/v	86	1	1,0	0	1	0	0	0	0,0	100,0	0,0
Si-79	10% v/v	70	5	2,5	0	0	4	0	0	0,0	100,0	0,0
		85	3	1,5	0	2	1	0	0	0,0	100,0	0,0
Si-78	0% (Controle)	162	8	4,2	0	0	2	0	6	0,0	25,0	75,0
Si-79	Autoclavado 50% v/v	70	2	1,0	0	1	0	1	0	0,0	100,0	0,0
Si-78	50% v/v	93	5	2,5	0	3	0	2	0	0,0	100,0	0,0
Si-78	0% (Controle)	93	5	5,0	0	1	3	1	0	0,0	100,0	0,0
Si-81	o% (Controle)	162	5	5,0	0	1	1	3	0	0,0	100,0	0,0

TABELA 42.3- Explante Inicial - Calo

Material Vegetal	Esterilização do Filtrado	Dias após Inoculação in vitro	Regeneração								
			Número		Estádio					Classe (%)		
			N_2	N_2/N_1	4	3	2	1	0	Plantas	Folhas	Gemas
B Petomech (539006) Si-81	Membranas 10% v/v	83	5	2,5	0	0	1	0	4	0,0	20,0	80,0
	0% (Controle)	48	5	...	0	0	0	0	1	0,0	0,0	100,0
	" "	70	5	2,5	0	2	0	0	3	0,0	40,0	60,0
	" "	79	10	5,0	0	4	1	3	2	0,0	86,0	20,0
	" "	84	17	8,5	1	1	2	4	9	5,9	41,2	52,9
	" "	107	32	6,4	2	6	5	7	12	6,2	56,3	37,5
	Autoclavado 100% (sem diluição)	48	12	...	0	0	0	0	1	0,0	0,0	100,0
	" "	70	12	6,0	0	1	11	0	0	0,0	100,0	0,0
	" "	79	5	2,5	0	4	1	0	0	0,0	100,0	0,0
	" "	86	26	6,5	3	9	5	3	6	11,5	65,4	23,1
	" "	124	2	2,0	1	0	0	1	0	50,0	50,0	0,0
	" "	134	5	5,0	0	0	0	0	5	0,0	0,0	100,0
	50% v/v	41	1	1,0	0	0	1	0	0	0,0	100,0	0,0
	" "	48	2	2,0	1	1	0	0	0	50,0	50,0	0,0
	" "	64	25	25,0	2	1	5	17	0	8,0	92,0	0,0
	" "	79	8	8,0	1	5	1	1	0	12,5	87,5	0,0
	" "	86	12	7,0	1	0	2	6	3	8,3	66,7	25,0
	" "	134	7	6,0	2	0	2	0	3	0,0	50,0	50,0
	" "	124	4	3,0	0	0	1	0	2	0,0	33,3	66,7
	" "	140	3									
	10% v/v	79	18	6,0	0	2	14	2	0	0,0	100,0	0,0
	" "	98	3	1,5	0	1	2	0	0	0,0	100,0	0,0
	0% (Controle)	70	8	8,0	0	4	4	0	0	0,0	100,0	0,0
	" "	79	9	9,0	0	4	1	3	1	0,0	88,9	11,1
	" "	86	11	5,5	1	3	5	0	2	9,1	72,7	18,2
	" "	105	10	5,0	3	0	3	0	4	30,0	30,0	40,0
	" "	124	4	4,0	0	2	0	0	2	0,0	50,0	50,0
	" "	159	10	5,0	0	0	1	1	8	0,0	20,0	80,0
E Joaquim Si-74	Membranas 50% v/v	23	3	1,0	0	0	0	0	3	0,0	0,0	100,0
	0% (Controle)	70	17	8,5	1	5	6	5	0	5,9	94,1	0,0
	" "	107	9	4,5	2	1	1	2	3	22,2	44,4	33,4

No 1º experimento, observou-se a qualidade de regeneração com os tipos de explantes iniciais recém - inoculados (TABELA 42.2) e calos de 12-15 dias (TABELA 42.3).

Quanto aos explantes recém-inoculados, não se obteve regeneração na classe de plantas com ápice, apenas regeneração de folhas. Mas é interessante ressaltar que dentro de um mesmo material vegetal (Petomech-B) o período necessário para regeneração variou conforme a amostra. Assim, a amostra correspondente a Si-79 apresentou regeneração no 70º dia após inoculação, tanto em presença do filtrado esterilizado por membranas, como na presença de filtrado esterilizado por antoclavagem, independente da concentração do filtrado utilizada (TABELA 42.2).

Já a amostra Si-78, nas mesmas condições, teve a regeneração acelerada pela presença do filtrado esterilizado por membranas, mesmo em baixa concentração (10% v/v), tanto em relação ao controle esterilizado por membranas como ao controle por autoclavagem. Deve-se frisar que para Si-78 o efeito do filtrado foi bem específico, afetando a velocidade de regeneração, mas não a freqüência de regeneração. A freqüência (N_2/N_1) foi menor na presença do filtrado esterilizado por membranas do que do que no controle (membranas e autoclavado).

De modo geral, pode-se dizer que a presença do filtrado de cultura esterizado em explantes recém-inoculados (TABELA 42.2) teve efeitos distintos:

a. Diminuiu quantitativamente a regeneração, como pode ser observado pelas menores freqüências obtidas nos

tratamentos com filtrado do que nos tratamentos controle, (independente do tipo de esterilização);

b. Não alterou fundamentalmente a qualidade de regeneração, obtendo-se só a classe de folhas como regeneração independente da presença ou não do filtrado, e finalmente

c. O filtrado (independentemente do tipo de esterilização) diminuiu o tempo para visualização macroscópica das regenerações, acelerando o processo de regeneração. Este fato fica mais evidente quando se destaca a amostra Si-78 das demais.

No 1º experimento, quando se utiliza como explante inicial calo de 12-15 dias (TABELA42.3.), observa-se que com o emprego deste explante inicial, obteve-se a classe de regeneração plantas, mesmo no controle, fato que não ocorreu quando se utilizou como explante inicial o explante recém-inoculado (ver TABELA 42.2 - amostra Si-81).

Com calos como explante inicial, o tipo de esterilização utilizado descriminou as respostas do cultivo in vitro.

Com o filtrado esterilizado por membranas (sem possível alterações devidas ao calor) obteve-se diminuição da freqüência de regeneração, tanto na concentração de 10% v/v (material vegeral B - cultivar Petomech) como em concentração mais alta 50% v/v (no híbrido Joaquim). Esta diminuição quantitativa de regeneração foi, também, observada quando se utilizou o explante recém - inoculado (TABELA 42.2).

Os resultados mostram que devemos considerar a influência do material vegetal empregado em relação ao efeito do filtrado *in vitro*. Assim, com a presença do filtrado esterilizado por membranas, calos do cultivar Petomech (amostra Si-81) apresentaram diminuição de freqüência, mas não de velocidade de regeneração. Já calos obtidos a partir do cultivar Joaquim, em presença do filtrado também esterilizado por membranas, apresentaram além da diminuição da freqüência de regeneração, uma clara aceleração das regenerações, embora estas se constituissem apenas de gemas. O próprio material Joaquim (controle) apresentou *in vitro* uma qualidade de regeneração melhor (apresentando sempre a classe das plantas) do que o material Petomech (TABELA 42.3).

Esta melhor atuação do cultivar Joaquim em relação ao Petomech (B) foi observada tanto para regeneração em cultura primária, como para sobrevivência das plantas regeneradas com a mesma origem do explante utilizada neste experimento, folha definitiva.

Se retrocedermos aos resultados anteriores, observaremos que, em cultura primária, o cultivar Joaquim teve porcentagem de regeneração mais homogênea e maior que o cultivar Petomech, B (TABELA 16.2, e de maior sucesso (sobrevivência no campo das plantas regeneradas - 12,1% para o híbrido contra 5,1% do B, conforme mostra a TABELA 30.

Quanto aos calos de 12-15 dias do material vegetal B (amostra Si-81) mantidos em presença do filtrado de cultura do fungo autoclavado, fez-se um estudo mais pormenorizado.

Quanto ao efeito das várias concentrações do filtrado autoclavado em regeneração (TABELA 42.3. chama a atenção os altos valores encontrados de freqüência de regeneração (25,0 para 50% v/v) e de classe de regeneração plantas encontrada (50%, ou seja, metade das plantas regeneradas completas com ápice, para as con

centrações de 100%, sem diluição e 50% v/v). Mas a variação dos dados encontrados não nos permite fazer afirmações categóricas . Esta variação pode ser melhor vista nos desvios padrões das médias para freqüência de regeneração e para estádio de regeneração plantas, parâmetros que melhor expressam a regeneração em termos comparativos:

Concentração (%)	N_2/N_1	Estádio 4 (n)
100	4,4 ± 2,0	0,7 ± 1,2
50	7,4 ± 8,2	1,0 ± 0,8
10	3,8 ± 3,2	0,0 ± 0,0
0	6,1 ± 1,9	0,7 ± 1,2

A TABELA 42.3 mostra também que a regeneração macroscópicamente ocorreu em períodos de tempo mais curtos em presença do filtrado de cultura do fungo, principalmente nas concentrações de 100% e 50% v/v (diluído à metade). A concentração de 10% v/v não teve este efeito promotor, nem em filtrado autoclavado, nem no filtrado esterilizado por este, mas de membranas , quando se utilizou como explante calo de folha definitiva do material vegetal B.

O encurtamento do período em dias necessário para regeneração promovido pelo filtrado de cultura autoclavado, ocasionando a "precocidade" de regeneração pode ser visto graficamente através da dinâmica de regeneração (Fig.53). Pela figura, observa-se que em presença do filtrado de cultura autoclavado , na concentração 50% v/v *in vitro* houve precocidade de regeneração, utilizando-se calo de 12-15 dias como explante inicial. Este efeito promotor do filtrado foi mais evidente no filtrado di

luído à metade do que no filtrado sem diluição. O número de regenerações foi também mais alto na presença dos filtrados autoclavados (100 e 50% v/v) do que no controle autoclavado. É interessante observar que a autoclavagem do meio controle resultou em menor número de regenerações do que a esterilização do meio por sistemas de membranas. Assim, com o calor houve provavelmente degradação, e/ou precipitação por congregação de certos elementos do meio de cultura, mudança esta do meio que não mais lhe conferia todas as condições propícias à regeneração.

Os períodos em dias em que ocorreram regenerações nos diversos tratamentos quando se utilizou calo de 12-15 dias como explante inicial do material vegetal B (amostra Si-81) foram analisados estatisticamente. Foi feito o contraste das médias pelo teste t de Student com a correção de Welch para os graus de liberdade (TABELA 43), conforme citado em MÉTODOS (item 6).

A relação entre a regeneração e o período de tempo (dinâmica de regeneração) em presença do filtrado de cultura de *A. solani* isolado Santa Eliza após 19 dias de cultivo em meio líquido natural pode ser visualizada na Fig.53. Por esta figura, observa-se que a regeneração ocorreu precocemente no tratamento 2B (presença do filtrado autoclavado 50% v/v) em 41 dias. Este dado não foi um fato isolado, mas sem uma característica estatisticamente significativa durante todo o período de regeneração do experimento (TABELA 43). A promoção na diminuição do tempo para regeneração ("precocidade") em presença do filtrado autoclavado 50% v/v usando como explante inicial calo pode ser visualizada na Fig.59 (ver item 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO).

Fato que deve ser ressaltado é o de que a concentração do filtrado de cultura autoclavado foi fator determinante no efeito de "precocidade" de regeneração (diminuição do período de tempo para visualização macroscópica da regeneração). Este e

feito foi mais evidente com a concentração 50% v/v do filtrado de que com o filtrado não diluído (100%). Já a presença da concentração do filtrado autoclavado além de não ter favorecido a "precocidade" de regeneração resultou em número total menor de regeneração que a presença das demais concentrações. Este efeito da concentração 10% v/v foi independente do tipo de esterilização do filtrado de cultura, membrana ou autoclavagem (Fig.53).

Considerando o período (em dias) de tempo para regeneração em presença do filtrado de cultura do fungo (isolado Santa Eliza) após 19 dias do cultivo do fungo em meio líquido natural (1º experimento) com calo como explante inicial (amostra Si-81 - material vegetal B) a análise estatística (TABELA 43) revelou que:

1. O processo de esterilização do filtrado, em si,não afetou o período de regeneração;

2. O período em dias para regeneração em presença do filtrado não diluído (100%) autoclavado foi estatisticamente semelhante ao controle que não foi submetido a esterilização por calor (membranas);

3. Embora não houvesse diferença significativa entre os períodos de regeneração entre as duas concentrações do filtrado autoclavado (100% e 50% v/v) testadas, o efeito da concentração do filtrado autoclavado foi marcante em relação ao controle:

FIGURA 53 - Dinâmica de Regeneração em Presença do Filtrado de *Alternaria solani* Isolado Santa Eliza.

Efeito do tipo de esterilização e de diluição do filtrado do fungo cultivado em meio líquido natural por 19 dias. Explante inicial = calo de 12 a 15 dias, obtido a partir de folha de plântula crescida assepticamente. Material vegetal = "Petomech" 5319006 original. Maiores detalhes (ver TABELA 42).

Filtrado de cultura esterilizado por:

1 - sistema de membranas
    1C = 10% v/v
    1D = 0% (controle)
2 - autoclavagem (1 ctm; 120°C)
    2A = 100% (sem diluição)
    2B = 50% v/v
    2C = 20% v/v
    2D = 0% (controle)

DINÂMICA DE REGENERAÇÃO EM PRESENÇA DO FILTRADO DE Alternaria solani ISOLADO SANTA ELIZA. Efeito do tipo de esterilização e de diluição do filtrado do fungo cultivado em meio líquido natural por 19 dias. Explante inicial = calo de 12 a 15 dias, obtido a partir de folha de plântula crescida assepticamente. Material vegetal = "Petomech" 5319006 original.

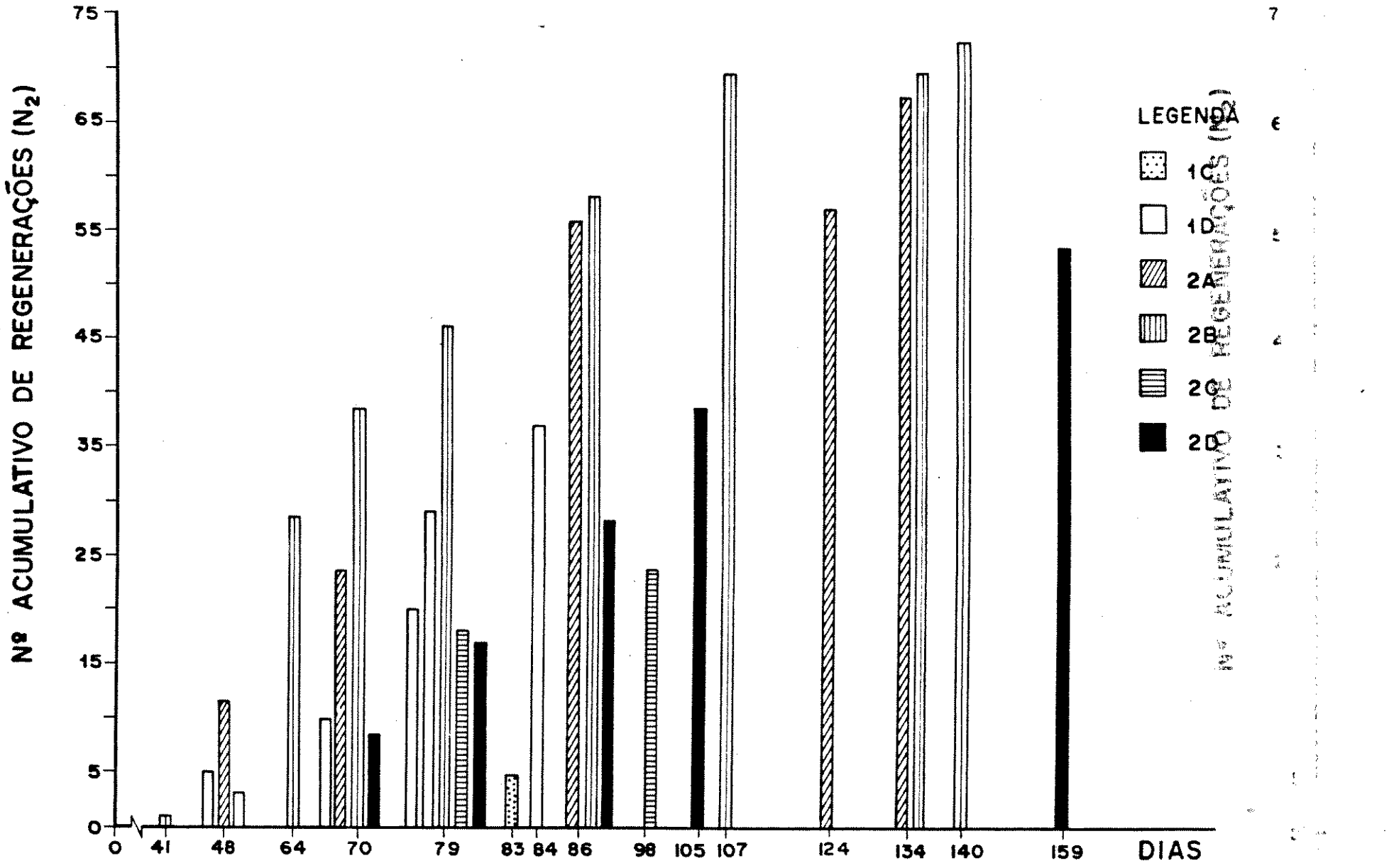


TABELA 43 - Pré-seleção do fungo *Alternaria solani* isolado Santa Eliza. Análise estatística do tempo de regeneração (dias) em relação ao tipo de esterilização e diluição do filtrado de cultura obtido após 19 dias de cultivo do fungo em meio líquido natural (1º experimento). Foi usado o teste t de Student com a correção de Welch para os graus de liberdade.

Tratamento	G.L.	$\bar{x} \pm S$	Decisão t
1D (controle-membrana)		93,6 ± 13,9	
2D (controle-autoclavado)		101,8 ± 30,7	
1D x 2D	66		1,77 NS
1D (controle-membrana)		93,6 ± 13,9	
1A (filtrado 100% - não diluído)		87,8 ± 18,9	
1D x 2A	87		1,83 NS
1D (controle-membrana)		93,6 ± 13,9	
2B (filtrado 50% - v/v)		81,7 ± 26,0	
1D x 2B	102		3,30**
2A (filtrado 100% - não diluído)		87,8 ± 18,9	
2B (filtrado 50% - v/v)		81,7 ± 26,0	
2A x 2B	114		1,47 NS
2A (filtrado 100% - não diluído)		87,8 ± 18,9	
2D (controle-autoclavado)		101,8 ± 30,7	
2A x 2D	83		2,78***
2B (filtrado 50% - v/v)		81,7 ± 26,0	
2D (controle-autoclavado)		101,8 ± 30,7	
2B x 2D	97		3,78****

NS = não significativo G.L. = graus de liberdade

** = significância ao nível de 0,1% - altamente significativo;

*** = significância ao nível de 0,7% - altamente significativo;

**** = significância ao nível de 0,03% - altamente significativo.

a) quanto ao controle que não sofreu o processo de calor, a redução do período para ocorrer regenerações em presença do filtrado 50% v/v autoclavado foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,1\%$);

b) quanto ao controle que sofreu o processo de calor (autoclavagem) a diminuição do período para regeneração em presença do filtrado autoclavado 50% v/v teve um nível de significância mais alto ($p \leq 0,3$) do que a diminuição do período para regeneração em presença do filtrado autoclavado não diluído ($p \leq 0,7\%$).

É interessante observar que a presença do filtrado autoclavado 50% v/v neste experimento (com calo como explante inicial) não só diminuiu o tempo necessário para ocorrer a regeneração (TABELA 42.3 e 45 e Fig.53) como também diminuiu o tempo necessário para o enraizamento, fato que veremos a seguir.

O processo de enraizamento das plantas regeneradas em presença de filtrado de cultura do fungo após 19 dias de cultivo em meio natural (1º experimento) será discutido agora.

Cada plantlete isolada em todos os tratamentos, recebeu um código e foi relacionada com o estádio de regeneração, com o calo que a originou, a presença do filtrado de cultura (tipo de esterização e concentração), o material vegetal e origem utilizados como explantes iniciais. Foi feito também, para cada plantlete, o acompanhamento no período de enraizamento (inclusive com o

tipo de enraizamento e comprimento das raízes principais), passagem para o solo e sobrevivência (floração e frutificação no campo). Algumas plantas regeneradas foram obtidas para resistência in vivo pelo método do fluxo de transpiração. Todos estes dados são mostrados na TABELA 44.

Quanto à qualidade de enraizamento (sem pressão de seleção) das plantas regeneradas em presença do filtrado de cultura (com pressão de seleção) no 1º experimento (TABELA 44) observa-se que nas plantas regeneradas em presença do filtrado esterilizado por membranas de Millipore (concentração 10% v/v), o enraizamento ocorreu em período mais longo que as plantas regeneradas no controle (pressão de seleção apenas do meio de cultivo sem inoculação do fungo (tratamento 1D). Aliás, as plantas regeneradas neste controle apresentaram, de modo geral, um enraizamento rápido (iniciado após 3 dias do isolamento da plantlete) e boa sobrevivência, em relação aos demais tratamentos. Pode-se argumentar que a fonte de explante inicial foi um ponto importante, pois o tratamento 1D (controle) se iniciou a partir de explante recém-inoculado (TABELA 44.1).

Melhor comparação pode ser feita das plantas regeneradas em presença dos filtrados esterilizados por autoclavagem. O enraizamento, neste caso, no controle iniciou-se esporadicamente aos 19 dias, tendo se fixado preferivelmente entre o 28º-40º dia, um período de enraizamento bem mais demorado que o observado nas plantas regeneradas no controle esterilizado por membranas, principalmente as plantas regeneradas A/1D/01 a A/1D/13 (TABELA 44.1).

As plantas regeneradas em presença do filtrado autoclavado 10% v/v não tiveram o tempo de enraizamento acelerado, como ocorreu com as plantas regeneradas em pressão de seleção com o filtrado autoclavado na concentração 50% v/v (TABELA 44.2). Novamente, no enraizamento, observa-se como na promoção de "precocidade" de regeneração que a presença do filtrado não diluído (100%) teve efeito menor na aceleração do enraizamento do que o filtrado diluído à metade, utilizando-se calo do material vegetal B como explante inicial (TABELA 44.2).

Em conclusão, podemos dizer que as concentrações do filtrado de cultura do fungo *A. solani* isolado Santa Eliza após 19 dias de cultivo em meio líquido natural com a utilização como explante inicial de calo do material vegetal B resultaram em efeitos semelhantes no período de regeneração (atuando como pressão de seleção) e no período para enraizamento (não atuando mais como pressão de seleção):

a) 10% v/v (diluído a 1/10) - sem promoção

b) 50% v/v (diluído à metade) - grande promoção

c) 100% (não diluído) - promoção moderada

É interessante ressaltar que o padrão de enraizamento das regenerações no controle foi afetado pelo tratamento de esterilização ao qual o controle foi submetido. Plantas regeneradas no controle não submetido ao calor tiveram um padrão de enraizamento mais rápido, com melhor ramificação e melhor sobrevivência (frutificação) do que plantas regeneradas no controle submetido ao calor.

Tabela 44. - 1º Experimento - Efeito do tipo de esterilização e de diluição do filtrado obtido a partir do fungo cultivado em meio líquido natural. Avaliação qualitativa. Destino das plantas regeneradas desde a individualização até o florescimento e frutificação no campo. Cada planta com código próprio, é individualmente relacionada com o calo que a originou, estádio de regeneração, período e tipo de enraizamento e período em dias que ocorreu floração e frutificação no campo.

Tabela 44.1. - Filtrado esterilizado por uma série decrescente de membranas de Millipore (8 a 0,44 micra), e utilizado in vitro nas seguintes diluições:

a = 50% do filtrado v/v
b = 25% do filtrado v/v
c = 10% do filtrado v/v
d = 20% do suco de legumes v-8 (controle).

Tabela 44.2. - Filtrado esterilizado por autoclavagem (120ºC por 20 minutos) e utilizado in vitro nas seguintes diluições:

a = 100% do filtrado
b = 50% do filtrado v/v
c = 20% do suco de legumes v-8 (controle);
d = meio normal padrão (To-M_3).

Material vegetal: Si-74 = cultivar Joaquim; E

Si-76 = cultivar Petomech lote 5319006 B

Si-78 = cultivar Petomech lote 5319006 B

Si-79 = cultivar Petomech lote 5319006 B

Si-81 = cultivar Petomech lote 5319006 B

Explante inicial: folha definitiva de plântula crescida assepticamente (F), calo de 12 a 15 dias.

○ - ausência de enraizamento;

\+ - enraizamento;

++ - enraizamento profuso, pronto para a fase de aclimatação;

× - presença de ramificações nas raízes;

✡ - contaminação;

† - morte;

- plantio no solo;

- floração no campo;

- frutificação no campo.

Tabela 44.1. - Filtrado esterilizado em série de membranas Millipore - 10% do filtrado (v/v).

Código da planta regenerada	Regeneração em pressão de seleção			Enraizamento em ausência de pressão de seleção										
	Código do calo	Estádio de regeneração	Número comprimento (cm) ramificação	Após dias: 3	5-6	11-12	13-14	19	28-30	36	40-46	47-54	60	96
A/1C/01	Si-79/F calo 1	3				2 5 x								
A/1C/02	Si-79/F calo 2	3										2 3 x		
A/1C/04	Si-78/F calo 1	3									o			

Tabela 44.1. - Continuação.

Explante inicial	Regeneração: Código da planta regenerada	Regeneração: Código do calo	Regeneração: Estádio de regeneração	Número comprimento (cm) ramificação	Enraizamento: Após dias: 3	5-6	11-12	13-14	19	28-30	36	40-46	47-54	60-69	96	107
calo	A/1D/14	Si-81/F calo 6	2		2								4 x			
"	A/1D/15	Si-74/F calo 3	1													
"	A/1D/16	Si-74/F calo 3	1													
"	A/1D/17	Si-81/F calo 8	3													
"	A/1D/18	calo 8	2													
"	A/1D/20	Si-81/F calo 8	3													
"	A/1D/21	Si-81/F calo 9	3													
"	A/1D/22	Si-81/F calo 9	3													
"	A/1D/23 replicata	Si-81/F calo 9	2													
"	A/1D/24	Si-74/F calo 4	4													
"	A/1D/25	Si-74/F calo 4	4													
"	A/1D/26	Si-74/F calo 4	1													

Tabela 44.2.- Filtrado esterilizado em autoclave (120°C por 20 minutos). Filtrado 100% (sem diluição).

Explante inicial	Regeneração: Código da planta regenerada	Regeneração: Código do calo	Regeneração: Estádio de regeneração	Regeneração: Número comprimento (cm) ramificação	Enraizamento: Após dias: 3	5-6	8	11-12	13-14	17	20-21	28-34	38-40	48-55	66	75	96	1
calo	A/2A/01	Si-81/F calo 10	4							+			++	4 7				
"	A/2A/02	Si-81/F calo 10	2															
"	A/2A/03	Si-81/F calo 10	1			0			6 3 x						-			
"	A/2A/04	Si-81/F calo 11	4			+				+			++	8 8 x				
"	A/2A/05	Si-81/F calo 11	2			0												
"	A/2A/06	Si-81/F calo 11	2			0												
"	A/2A/07	Si-81/F calo 11	2															
"	A/2A/08	Si-81/F calo 11	1															

Tabela 44.2. - Filtrado esterilizado em autoclave (120ºC por 20 minutos). Filtrado 50% (v/v).

Explante inicial	Código da planta regenerada	Regeneração Código do calo	Estádio de regeneração	Número comprimento (cm) ramificação	Após dias: 5-6	8	11-12	13-14	17	20-21	28-34	38-40	Enraizamento 48-55	66	70	88	96	105	223
calo	A/2B/01	Si-81/F calo 1	4		7 x								+ +						
"	A/2B/02	Si-81/F calo 2	4				6 x			7 x									
"	A/2B/03 original	Si-81/F calo 1	3							2 10		+							
"	A/2B/03 replicata																		
"	A/2B/05	Si-81/F calo 2	2					1											
"	A/2B/06	Si-81/F calo 2	2																
"	A/2B/07	Si-81/F calo 2	2								4 8 x								
"	A/2B/07 replicata																		

Teste de resistência - nota 1 (sem sintomas) e nota 5 (máximo de sintomas)
(estacas de tomateiro)

Tabela 44.2. - Continuação.

Explante inicial	Regeneração: Código da planta regenerada	Regeneração: Código do calo	Regeneração: Estádio de regeneração	Número comprimento (cm) ramificação / Enraizamento: Após dias: 3	5-6	8	11-12	13-14	17	20-21	28-34	38-40	48-55	66	73	96
calo	A/2A/09	Si-81/F calo 12	3				3 10 x									
"	A/2A/10 original	Si-81/F calo 13	3		2 3			2 7 x								
"	A/2A/10 replicata											8 7 x				
"	A/2A/12	Si-81/F calo 13	1		2 1,5		2 10-12 x						4 9 x			
"	A/2A/13	Si-81/F calo 14	4									†				
"	A/2A/14	Si-81/F calo 14	1										†			

Tabela 44.2. - Continuação.

Explante inicial	Código da planta regenerada	Regeneração Código do calo	Estádio de regeneração	Número comprimento (cm) ramificação	Enraizamento Após dias: 3	5-6	8	11-12	13-14	17	20-21	28-34	38-40	48-55	66	70	88	96	105
calo	A/2B/08	Si-81/F calo 2	3											+					
"	A/2B/09	Si-81/F calo 3	2		o									3 6 x					
"	A/2B/10	Si-81/F calo 4	3			1 x			2					7 7 x					
"	A/2B/11	Si-81/F calo 4	2											o †					
"	A/2B/12	Si-81/F calo 5	4						2 x					3 7 x	†				
"	A/2B/13	Si-81/F calo 5	3											o †					
recém	A/2B/14	Si-81/F calo 6	3											o †					
"	A/2B/16	Si-81/F calo 7	1									+							
calo	A/2B/17	Si-81/F calo 8	4										++					†	

Tabela 44.2.-Filtrado esterilizado em autoclave (120°C por 20 minutos). Filtrado 50% (continuação) e filtrado 10% (v/v).

Explante inicial	Regeneração: Código da planta regenerada	Regeneração: Código do calo	Regeneração: Estádio de regeneração	Regeneração: Número comprimento (cm) ramificação	Enraizamento: Após dias: 3	5-6	8	11-12	13-14	17	20-21	28-34	38-40	48-55	66	88	96	153
calo	A/2B/19	Si-81/F calo 8	1												✡			
"	A/2B/20	Si-81/F calo 9	3												✕			
"	A/2B/23	Si-81/F calo 11	4				✡											†
"	A/2B/25	Si-81/F calo 13	0															
"	A/2C/01	Si-81/F calo 1	2											2 10 x				
"	A/2C/02	Si-81/F calo 2	2		o						†							
"	A/2C/03	Si-81/F calo 2	1								†							
"	A/2C/05	Si-81/F calo 3	3									5 14 x			✿			
"	A/2C/06	Si-81/F calo 4	3									†						

Tabela 44.2. Filtrado esterilizado em autoclave (120°C por 20 minutos) - CONTROLE.

Explante inicial	Regeneração: Código da planta regenerada	Regeneração: Código do calo	Regeneração: Estádio de regeneração	Número comprimento (cm) ramificação / Enraizamento: Após dias: 3	5-6	8	11-12	13-14	19	20-21	28-34	38-40	48-55	66-70	88	96	107
calo	A/2D/01	Si-81/F calo 1	3														
"	A/2D/02	Si-81/F calo 2	3									10 10 x					
"	A/2D/03 original	Si-81/F calo 2	3					+			+ +		18 6 x				
"	A/2D/03 replicata									+							
"	A/2D/06	Si-81/F calo 3	3										8 14 x				
"	A/2D/07	Si-81/F calo 3	2								6 7 x			†			
"	A/2D/08	Si-81/F calo 3	2											†			

Tabela 44.2. - Continuação.

Explante inicial	Regeneração: Código da planta regenerada	Regeneração: Código do calo	Regeneração: Estádio de regeneração	Regeneração: Número comprimento (cm) ramificação	Enraizamento: Após dias: 3	5-6	8	11-12	13-14	19	20-21	28-34	38-40	48-55	66-70	88	96	107
recém	A/2D/10	Si-76/F calo 1	3										5 6 x					
calo	A/2D/11	Si-81/F calo 7	4												†			
"	A/2D/12	Si-81/F calo 8	4							+		6 7 x						
"	A/2D/13	Si-81/F calo 8	4											+				
"	A/2D/15	Si-81/F calo 9	3											†				
"	A/2D/16	Si-81/F calo 9	3						o †									

TABELA 45- Pré-seleção com Filtrado de *Alternaria solani* Isolado Santa Eliza. Efeito do tipo de esterilização e de diluição do filtrado do fungo cultivado em meio líquido natural por 19 dias. Avaliação por número de plantletes nas fases de regeneração, enraizamento, aclimatação e sobrevivência. Considerou-se a % de sucesso das plantletes nas fases de enraizamento a sobrevivência, em relação à fase anterior.

Tratamentos	Regeneração	Enraizamento		Aclimatação (estufa)		Sobrevivência (campo)	
	N_2	N_3	%	N_4	%	N_5	%
1. Esterilização por membrana							
1B. 50% do filtrado (v/v)	3	0	0,0	-	-	-	-
1C. 10% do filtrado (v/v)	22	4	18,2	1	25,0	1	100,0
1D. 20% V-8 v/v (Controle)	113	27	23,9	4	18,5	4	80,0
2. Esterilização por autoclavagem							
2A. 100% do filtrado	62	14	22,6	2	28,6	2	50,0
2B. 50% do filtrado (v/v)	80	25	31,3	1	32,0	1	12,5
2C. 20% V-8 filtrado (v/v)	21	6	28,6	1	16,7	1	100,0
2D. MS padrão (Controle)	62	18	29,0	2	33,3	2	33,3
Análise de Variância*							
Comparação das proporções		$\frac{N_3}{N_2}$		$\frac{N_4}{N_3}$		$\frac{N_5}{N_4}$	
(membrana x autoclavagem) F		3,1 NS		4,2 NS		0,4 NS	

* Valores numéricos com transformação normalizadora de FISHER (arcoseno $\sqrt{p}$)

NS = Não Significante

A permanência do efeito inibidor in vitro do filtrado, mesmo após autoclavagem, (sugere(m), substância(s) termoestável(eis) , o que concorda com a permanência do efeito fitotóxico do filtrado in vivo após autoclavagem, como pode ser visto na Fig. 50 (1-m).

O efeito da autoclavagem alterou inclusive o aspecto dos calos obtidos em presença dos meios com filtrado. Calos formados nos meios com filtrado esterilizado por membranas apresentaram-se friáveis e de cor creme, calos formados em meios com filtrado esterilizado por autoclavagem apresentaram-se ligeiramente duros e de cor acastanhada.

Um ponto interessante a ressaltar é que a perda do efeito promotor do filtrado de 19 dias de idade pela autoclavagem, é mais acentuada na fase de indução dos calos, pois, as plantas regeneradas nestes filtrados autoclavados, principalmente na diluição de 50%, tiveram precocidade para o período de enraizamento e plantio no solo (TAB. 44.2 e FIG. 59 - ver item 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO).

Do 1º experimento da utilização do filtrado de cultura como pressão de seleção podemos dizer que:

1. o efeito tóxico do filtrado se mantém após filtragem;
2. promoção de crescimento dos calos dos meios com filtrado, promoção esta maior nos filtrados que não passaram pelo processo de calor. Isto foi verdade tanto na diluição de 50 como 25%. O tipo de explante inicial empregado não alterou este resultado.

3. autoclavagem dos filtrados de 19 dias de idade resultou em perda do efeito promotor dos filtrados in vitro, notadamente na fase de indução de calos;

4. para o isolado Santa Eliza, houve permanência do efeito inibidor in vitro do filtrado após autoclavagem. Haveria, assim, talvez, 2 grupos de substâncias, as termolábeis possivelmente hormônios vegetais, e as termoestáveis , nas quais estaria(m) talvez a(s) toxina(s);

5. quanto à regeneração (nº de gemas formadas) houve diminuição no número de gemas formadas em presença do filtrado de cultura de *A. solani* independentemente do tipo de esterilização empregada;

6. as plantas regeneradas nos filtrados autoclavados, principalmente na diluição de 50%, tiveram precocidade para o período de enraizamento e plantio no solo;

7. o controle V8 (meio líquido natural empregado para cultivo do fungo) teve comportamento diferente conforme a esterilização empregada. A autoclavagem reduziu drasticamente seu efeito quer no crescimento dos calos, quer no número de gemas formadas;

8. as dificuldades técnicas causadas pela turvidez do V8 acrescida do efeito inibidor deste in vitro após autoclavagem desaconselham a utilização deste meio para a cultura líquida de *A. solani* com o objetivo de obtenção de filtrado e posterior utilização em cultura de tecidos.

4.2. 2º Experimento - isolado Mococa - Período de cultivo em meio líquido de natureza química conhecida = 21 dias

Com a utilização de meio líquido natural (suco de legumes comercial V8) causou uma série de transtornos durante a filtragem e o cultivo in vitro do filtrado (1º experimento - item 4.1.) procurou-se empregar um meio líquido sintético de natureza química conhecida para o cultivo do fungo. Além disso, procurou-se relacionar os resultados com os obtidos por MATERN et al. (1978) que mostraram, pela primeira vez, substâncias tóxicas de A. *solani* específicas, utilizando o meio de Czapek-Dox. O cultivo de A. *solani* passou a ser feito em meio de Czapek-Dox (in PELCZAR & CHAN 1972) com três modificações: diminuição do nível de $NaNo_3$ (de 3 para 2,0 g/l); aumento da concentração de sacarose (de 15 para 30 g/l) e fonte de ferro (de $FeSO_4$ para $FeNa_2EDTA$ na concentração normal de MURASHIGE & SKOOG, 1962). A composição final do meio líquido é mostrada no capítulo de MÉTODOS (item 3.4.2.).

Em meio sólido, estacionário, o aspecto do crescimento micelial foi dependente da intensidade luminosa (Fig. 47- ver item 3). Mantendo-se a alternância de luz, intensidades mais altas resultaram em círculos concêntricos de crescimento (Fig. 47 b) em placa de Petri, como as observadas à superfície da área lesada do hospedeiro, correpondentes aos períodos noturno e diurno, o que também foi observado por PONTE, 1980, para a mancha de alternária do feijão-de-corda, *Vigna sinensis* (L.) Savi. O cultivo de A. *solani* em placa de Petri nas condições descritas não resultou em esporulação, talvez devido a qualidade de luz, necessitando, talvez, de condições especiais de iluminação, como é o caso de A. *tomato* cuja indução de formação de conídios é controlada por doses repetidas de luz azul e ultravioleta próximo, sendo

esta uma fotoreação reversível (KUMAGAI, 1982 e 1983).

O fungo se desenvolveu perfeitamente bem no meio líquido sintético, como pode ser visto na Fig. 50b. Embora tenha se utilizado áres de micélio de uma única placa de fungo crescendo em meio sólido para início do cultivo em meio líquido, algumas colônias apresentaram coloração (Fig. 50c), colorindo o meio líquido incolor original (Fig. 50d). As colonias com características cromogênicas continuaram apresentando efeitos fitotóxicos no teste de estacas de tomateiro (Fig. 50g,j).

Após o cultivo deste fungo em meio líquido pelo período de 21 dias, foi feita a filtragem, O filtrado da cultura foi submetido à duas formas de esterilização: membranas de Millipore e autoclavagem e foi utilizado apenas na diluição de 50% v/v. O cultivo dos calos (explantes iniciais para pré-seleção in vitro foram constituídos somente de calos de 12-15 dias) foi feita em presença de combinações de auxina (AIA 25μM) e citocinina (6-BA 10μm) e somente em presença de 6-BA 10μM, sem auxina. ZILKAH & GRESSEL (1977), comparando dados de crescimento de calos de *Solanum nigrum* em presença tóxica de 2,4-D, em meios com nível normal e nível maior de auxina, verificaram que houve menor susceptibilidade a inibição de 2,4-D nos tecidos que cresceram em níveis mais altos de auxina. Desta maneira, a constituição hormonal (incluindo citocininas) do meio pode afetar a susceptibilidade a compostos fitotóxicos. O controle constituiu-se, independente da combinação de fitorreguladores do meio líquido de Czapek-Dox autoclavado, também diluído à metade. Várias fontes de explantes iniciais foram utilizadas: cotilédone, folha definitiva e caule a partir de plântulas estéreis e folha adulta a partir de plantas crescidas em estufa. Após inoculação dos calos em meio contendo o filtrado da cultura do fungo, estes permanceram 15 dias à temperatura controlada (25 ± 5^{o}C), sob luzes fluorescentes

frias e posteriormente transferidas para condições naturais de luz e temperatura (estufa). Em experimentos do grupo de Murashige, com muitas plantas, incluindo *Asperagus*, *Gerbera*, *Saxifraga* e bromeliáceas, utilizou-se lâmpadas Gro-Lux, ou fluorescentes brancas (MURASHIGE, 1974). Estudos de fitotoxicidade de várias substâncias *in vitro*, utilizando-se onze espécies de várias famílias, incluindo *Solanaceae* (testando tomate, inclusive) foram feitos sob luzes fluorescentes (ZILKAH & GRESSEL, 1977; ZILKAH *et al.*, 1977).

A avaliação foi feita em relação a:

1. contaminação, expressa por porcentagem;
2. crescimento de calos, expresso pelo índice de crescimento; e
3. regeneração, expressa por porcentagem e por média de gemas formadas (nº de gemas/nº de calos regenerados).

Esta avaliação está anotada de duas maneiras:

1. em relação ao meio de cultura empregado, com auxina (FIGURA 54) e sem auxina (FIGURA 55);
2. em relação à fonte de explante e de material vegetal utilizados.

Analisando globalmente os efeitos dos tratamentos, não considerando a fonte de explante empregada (Figs. 54 e 55), observamos que:

1. de modo geral, a contaminação foi menor em presença do filtrado (tanto esterilizado por membranas como por autoclavagem) em relação ao controle, embora, devido à grande variação dos resultados esta diferença não deva ser significativa, mas parece constituir-se numa tendência. Este fato foi observado tanto em presença de auxina (Fig.54-Fase 1), como em ausência de auxina (Fig.55-Fase 1), o que talvez indique um efeito antibiótico do filtrado. Segundo BRIAN *et al.* (1951), *A. solani* acumula durante o crescimento um produ

to metabólico antibiótico, o ácido alternárico;

2. considerando-se o índice de crescimento, houve promoção de crescimento, em ambos os tipos de esterilização. Esta promoção foi, porém, mais acenturada na esterilização com autoclavagem do que com esterilização por membranas. Este fato ocorreu tanto em presença (Fig.54-Fase 1) como em ausência de auxina (Fig.55-Fase 1). Estas promoções podem ser visualizadas na Fig. 54 (presença de auxina) e na Fig. 55 (ausência de auxina).

3. quanto a regeneração, houve interação com fonte de explante. Considerando como um todo, houve uma melhor regeneração (maior porcentagem e principalmente maior nº gema/calo) nos filtrados autoclavados do que nos filtrados esterilizados por membranas e principalmente do que no controle (Figs.54 e 55). A melhor regeneração ocorreu quando o filtrado foi esterilizado por autoclavagem e em presença da combinação de auxina e citocinina (ToA/II/a - Fig. 54 - Fase 2).

Quando se analisa os dados considerando-se a fonte de explante e de material vegetal empregado observa-se que:

I. em presença de auxina (Fig. 54) verifica-se:

   a. diminuição da contaminação em presença dos filtrados de cultura comos calos provindos dos explantes cotilédone e principalmente folha definitiva;

   b. promoção de crescimento do calo, promoção esta mais acentuada com o filtrado autoclavado (tratamento ToA/II). Este fato se verifica com várias fontes de explante (cotilédone, folha definitiva e folha de estufa).

c. com cotilédone o tratamento ToA/I (filtrado esterilizado por membranas) diminuiu o nº de calos regenerados , mas estes foram qualitativamente superiores, pois mais gemas foram formadas. Este fato foi verdade para o material 2 ("Petomech 5319004 original) que mostrou também melhora qualitativa de regeneração em presença do filtrado autoclavado. É interessante notar que o material 4, que foi obtido a partir da multiplicação no campo do material 2, in vitro não apresentou promoção de regeneração em presença do filtrado autoclavado, mostrando talvez a perda desta característica por segregação do material, pois mesmo no controle o poder morfogenético do material multiplicado difere do original.O material 2 original apresentou produção de maior número de gemas em quantidade menor de calos, em comparação com os demais materiais, quer em presença ou ausência de auxina (Fase 2-Figs. 54 e 55). Mas em presença do filtrado, principalmente autoclavado, esta tendência de regeneração do material 2 se acentua, como ocorreu tanto com cotilédone como folha definitiva.

d. com folha definitiva, foi claro o efeito promotor do filtrado autoclavado em ambos os lotes de "Petomech" . Com a utilização desta fonte de explante, se distingue perfeitamente o efeito do tipo de esterilização do filtrado em regeneração. Autoclavagem do filtrado resultou in vitro em aumento de cerca de 4 vezes no número médio de gemas produzido, para ambos os lotes de "Petomech". É interessante lembrar que a ativação pelo calor de adeninas substituídas em citocininas ativas foi observado em estudos com adeninas substituídas nas posições 1 e 3 que estes só se tornavam citocininas ati

vas como resultado na conversão dos isômeros N^6 correspondentes. No caso de 1-benzil ou 1-(γ-γ-dimetilalil) adenina, a abertura de um anel de 1-2 seguida pela ciclização de 1-N^6 e fechamento do anel são fortemente afetados e em temperaturas elevadas resulta em altas produções de isômeros N^6. No caso de adeninas 3 substituídas e formação, pelo calor (autoclavagem) dos isômeros N^6 correspondentes foi demonstrada, assim como para 3-furfuriladenina (SKOOG & LEONARD, 1968). Filtrado de cultura esterilizado por membranas testado *in vitro* com explante de folha definitiva, em presença de auxina, praticamente não teve efeito (material 3);

e. com folha de estufa temos o mesmo padrão que com folha definitiva. Efeito promotor tanto do crescimento do calo como de regeneração ocorrem no teste do filtrado de cultura *in vitro*. Este efeito promotor com folha de estufa fica mais óbvio, quando se verifica que apenas neste caso, houve regeneração com o "Petomech" 5319004 multiplicado (material 4) não havendo regeneração com outro tipo de explante, quer se tenha utilizado caule , quer se tenha utilizado cotilédone (mesmo em presença do filtrado autoclavado). Com o filtrado esterilizado por membranas não se observou qualquer efeito com folha de estufa, fato também ocorrido com folha definitiva.

II. Em ausência de auxina (Fig. 55) verifica-se que:

a. com cotilédone, houve promoção significativa do índice de crescimento com "Petomech" 5319006 original (material 3). Com este material, houve também promoção de regeneração, mas devido a regeneração do controle ter se mostrado bem variável, não chega a ser significativa. Já o híbrido "Joaquim" (material 1), apresentou pequena regeneração em presença do filtrado autoclavado. Deve-se lembrar que este cultivar apresentou alta regeneração, cerca de 80%, no controle em presença de auxina (Fig. 54) evidenciando que este material teria potencialmente grande capacidade de regeneração. Em ausência de auxina, apenas com citocinina, em contato permanente com filtrado autoclavado, "Joaquim" teve uma porcentagem de regeneração de 16,7%, independente do explante inicial utilizado (cotilédone ou caule).

b. com caule, promoção de crescimento do calo, medido pelo índice de crescimento, tanto para filtrado autoclavado como pelo filtrado esterilizado que não passou por tratamento de calor. Quanto à regeneração , houve diminuição do nº de calos regenerados, porém estes foram qualitativamente superiores, produzindo maior nº de gemas no filtrado esterilizado por membranas. No filtrado autoclavado não houve qualquer regeneração. Regeneração nula em presença do filtrado autoclavado também foi observada quando se utilizou como fonte de explante inicial cotilédone. Neste caso, porém, em presença de auxina (Fase 2-Fig.54). É interessante ressaltar que um mesmo material (lote original 5319006 de "Petomech" - material 3) em presença do filtrado autoclavado,embora

tenha resultado em promoção de crescimento de calo, independentemente da fonte de explante utilizada, apresentou em relação a regeneração respostas completamente opostas, pois enquanto com folha definitiva tivemos regeneração total em presença de auxina, obtivemos regeneração nula, independentemente da presença do fitormônio, utilizando-se cotilédone (em presença de auxina - Fig. 54) ou caule (ausência de auxina - Fig. 55). A porcentagem de regeneração do controle do material 3 se situa em torno de 50%, nos explantes utilizados, marca esta que facilita a constatação do efeito inibidor ou promotor da presença de extrato in vitro com o material 3;

c. com folha de estufa, houve forte influência do material vegetal na resposta à presença do filtrado, em relação à regeneração, com o material de tomate de mesa *"Marglobe"* (material 7), enquanto o filtrado autoclavado tenha alterado o padrão de regeneração, no caso inibindo-a, o filtrado esterilizado por membranas não foi efetivo. Efeito nulo do filtrado esterilizado por membranas também foi observado, em presença de auxina, com material de "Petomech" multiplicado (Fig.54-Fase 2). Mas devemos nos recordar que com este material (4+5) em presença de auxina, o filtrado autoclavado promoveu a regeneração, efeito oposto ao observado com ausência de auxina com o mesmo filtrado de cultura, apenas usando o material de tomate de mesa ("Marglobe"). Filtrado de cultura sem tratamento de calor (ToA/I) promoveu, no entanto, a regeneração de outro material de mesa ("Ângela") embora esta promoção não tenha sido muito alta.

Resumindo, deste experimento, podemos dizer que em pré-se-

leção in vitro do filtrado diluído (50% v/v) de A. *solani* (isolado Mococa) cultivado por 21 dias em meio sintético de Czapek-Dox:

1. a presença dos filtrados (independente do tipo de esterilização) promoveu crescimento dos calos, em todos os explantes utilizados, com os materiais testados. Os parâmetros testados (material vegetal, fonte de explante e fitorreguladores influiram na resposta dos filtrados em condições de pré-seleção in vitro, no processo de diferenciação;

2. a escolha do material vegetal influiu fortemente no tipo obtido de resposta de diferenciação. Assim, no mesmo tratamento, obteve-se resposta diversa conforme o material utilizado. Por exemplo, no tratamento de filtrado autoclavado, em ausência de auxina, a partir de folha de estufa, em "Ângela", este tratamento não foi efetivo, com outro material de mesa "Marglobe" este tratamento inibiu a regeneração. É interessante notar que com o material de indústria "Petomech" lote original 5319004 (material 2), embora pareça ter ocorrido numericamente uma inibição de regeneração pela diminuição de regeneração, houve uma melhora de regeneração, pois ocorreu aumento do nº de gemas formadas em presença do filtrado da cultura, independentemente do tipo de esterilização empregada e de presença ou não de auxina (Figs. 54 e 55).

3. a fonte de explante empregada alterou profundamente o tipo de resposta obtido. Este foi o caso do material de indústria "Petomech" lote original 5319006 (material 3) , pois com a utilização de folha definitiva deste material obteve-se regeneração total, enquanto não houve qualquer regeneração, nas mesmas condições de esterilização do filtrado e suprimento exógeno de fitorreguladores, quer se

tenha utilizado cotilédone ou caule;

4. suprimento exógeno dos fitorreguladores afetou a resposta de diferenciação. Neste caso, também, a folha definitiva foi o explante que melhor distinguiu o efeito de auxina exógena na regeneração em pré-seleção. Como exemplo, tomemos o caso do material 2 ("Petomech" lote original 5319004). Enquanto que com cotilédone há pequena diferença nos números de regeneração, com folha definitiva, o mesmo material 2, nas mesmas condições do filtrado, em ausência de auxina, não apresentou qualquer regeneração. Utilizando-se folha definitiva com o filtrado autoclavado em presença de auxina obteve-se, com este material, promoção de regeneração, que foi, então, praticamente total. Em presença de auxina houve geralmente inibição de regeneração no tratamento do filtrado esterilizado por membranas. O filtrado autoclavado, com auxina, promoveu regeneração (Fig.60), este efeito tendo sido mais acentuado em folha definitiva. Em ausência de auxina, a inibição de regeneração no filtrado de cultura esterilizado por membranas foi total no material 2, material este que apresentou regeneração em todos dos demais tratamentos testados. O filtrado submetido a autoclavagem, em ausência de auxina, inibiu a regeneração com o tomate de mesa "Marglobe" (Fig. 55). É bom frisar que há interação entre o fitorregulador e material vegetal empregado, no efeito do filtrado estéril *in vitro*, mesmo mantendo-se constante os demais parâmetros, o que nos pode conduzir a respostas antagônicas. Assim, com o material de tomate de indústria multiplicado (4+5) tivemos com folha de estufa promoção de regeneração em presença de filtrado autoclavado (Fig. 54), enquanto que em ausência de

auxina, o mesmo explante de folha de estufa obtido a partir de tomate de mesa "Ângela" resultou em inibição de regeneração, efeito inverso, em presença do mesmo filtrado autoclavado.

ZILKAH & GRESSEL (1977) comparando dados de crescimento de calos de *Solanum nigrum* em presença tóxica de 2,4-D , em meios com nível normal e nível aumentado de auxina, verificaram que houve menor sucetibilidade à inibição de 2,4-D nos tecidos que cresceram nos níveis mais altos de auxina. Desta maneira, a concentração hormonal do meio pode afetar suscetibilidade aos compostos fitotóxicos.

FIGURAS 54 e 55

Resultados do experimento nº 2 com filtrado de A. solani, isolado Mococa. Filtrado obtido após 21 dias de inoculação do fungo em meio líquido (Czapek-Dox).

Estudou-se diversas fontes de explante inicial, tipo de esterilização do filtrado e efeito de fitorreguladores, notadamente auxina. Avaliação quantitativa. Neste e no 3º experimento utilizou-se:

Fonte de explante: F = folha definitiva de plântulas crescida assépticamente.

C = cotilédone de plântula crescida assépticamente.

H = caule de plântula crescida assépticamente.

D = folha de planta crescida em estufa.

Tipo de esterilição do filtrado (diluição de 50%)

I = Filtrado esterilizado por uma série de membranas de Millipore (8; 0,8; 0,45 e 0,22) + MS modificado.

II = Filtrado esterilizado por calor úmido (autoclavagem a 120°C por 20 minutos) + MS modificado.

III = Controle (meio MS modificado) esterilizado por calor úmido (autoclavagem a 120°C por 20 minutos) + MS modificado.

Efeito de fitorreguladores: a = AIA 25 µM + 6-BA 10 µM - FIGURA 54

b = sem AIA apenas 6-BA 10 µM - FIGURA 55.

2º Experimento: Efeito da presença de auxina e do tipo de esterilização do filtrado obtido a partir do fungo cultivado em meio sintético de natureza química conhecida. Efeito da fonte de explante e de material vegetal empregado.

FIGURA-54 - Cultivo *in vitro* com auxina (AIA 25 µM; 6-BA 10 µM).

FIGURA-55 - Cultivo *in vitro* sem auxina (só 6-BA 10 µM).

LEGENDA	SIGLA	Material vegetal empregado:
	A	- "Petomech" 5319004 original;
	B	- "Petomech" 5319006 original;
	C	- "Petomech" 5319004 multiplicado;
	D	- "Petomech" 5319006 multiplicado;
	E	- "Joaquin";
	F	- "Ângela";
	G	- "Marglobe".
	C + D	

FONTE DE EXPLANTE	TEMPO ANTERIOR DE CULTIVO *in vitro* (dias)
cotilédone	19-30
folha definitiva	15
caule	35; 55-60
folha adulta	50-55

FIGURA 54

PRESSÃO DE SELEÇÃO: EFEITO DE ESTERILIZAÇÃO
(Experimento Nº 2)

CULTIVO *in vitro* COM AUXINA (AIA 25 μM ; 6-BA 10 μM)

FASE 1 : FORMAÇÃO DE CALO

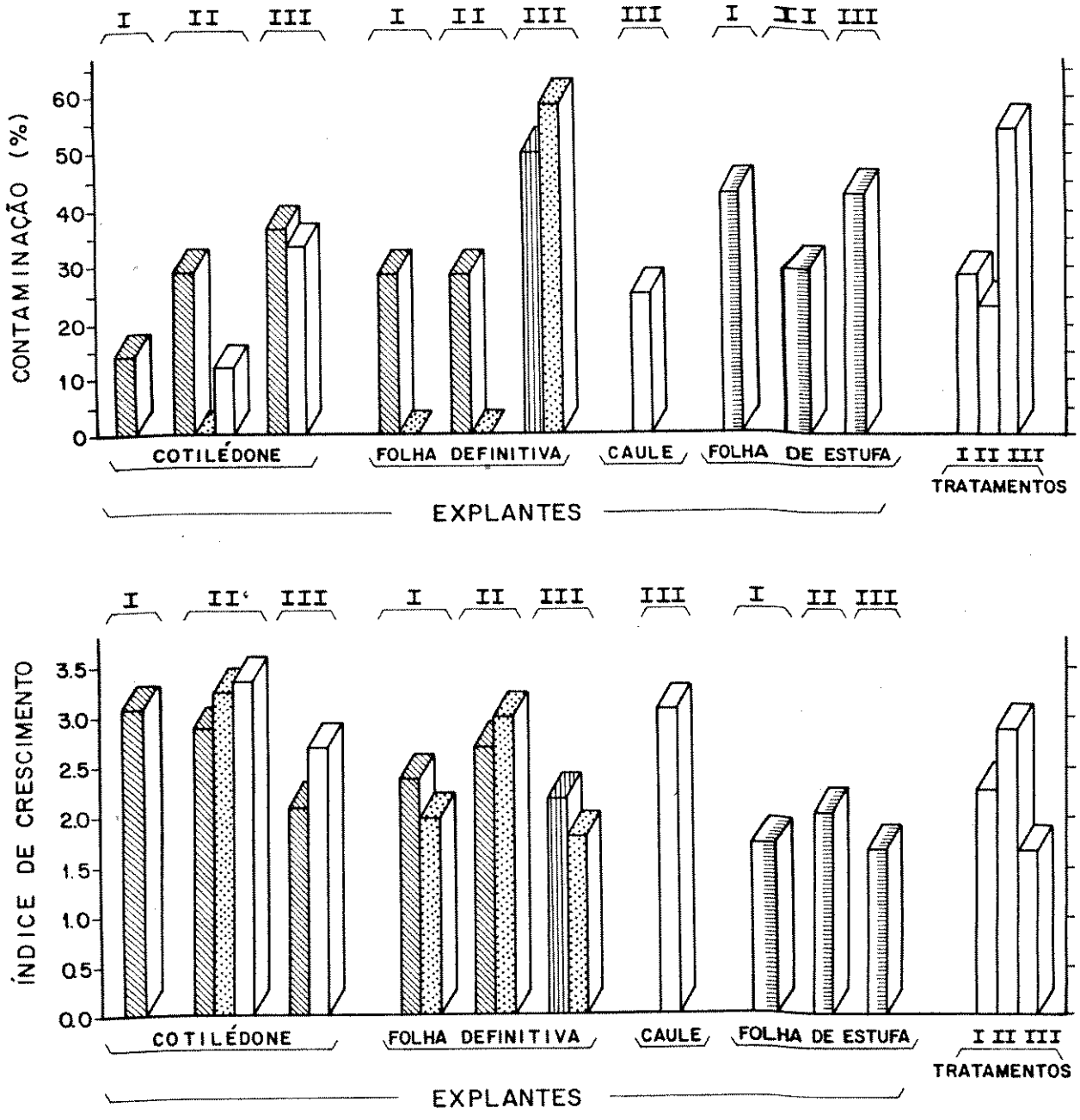


FIGURA 54

PRESSÃO DE SELEÇÃO: EFEITO DE ESTERILIZAÇÃO
(Experimento Nº 2)

CULTIVO *in vitro* COM AUXINA (AIA 25 μM ; 6- BA 10 μM)

FASE 2 : REGENERAÇÃO

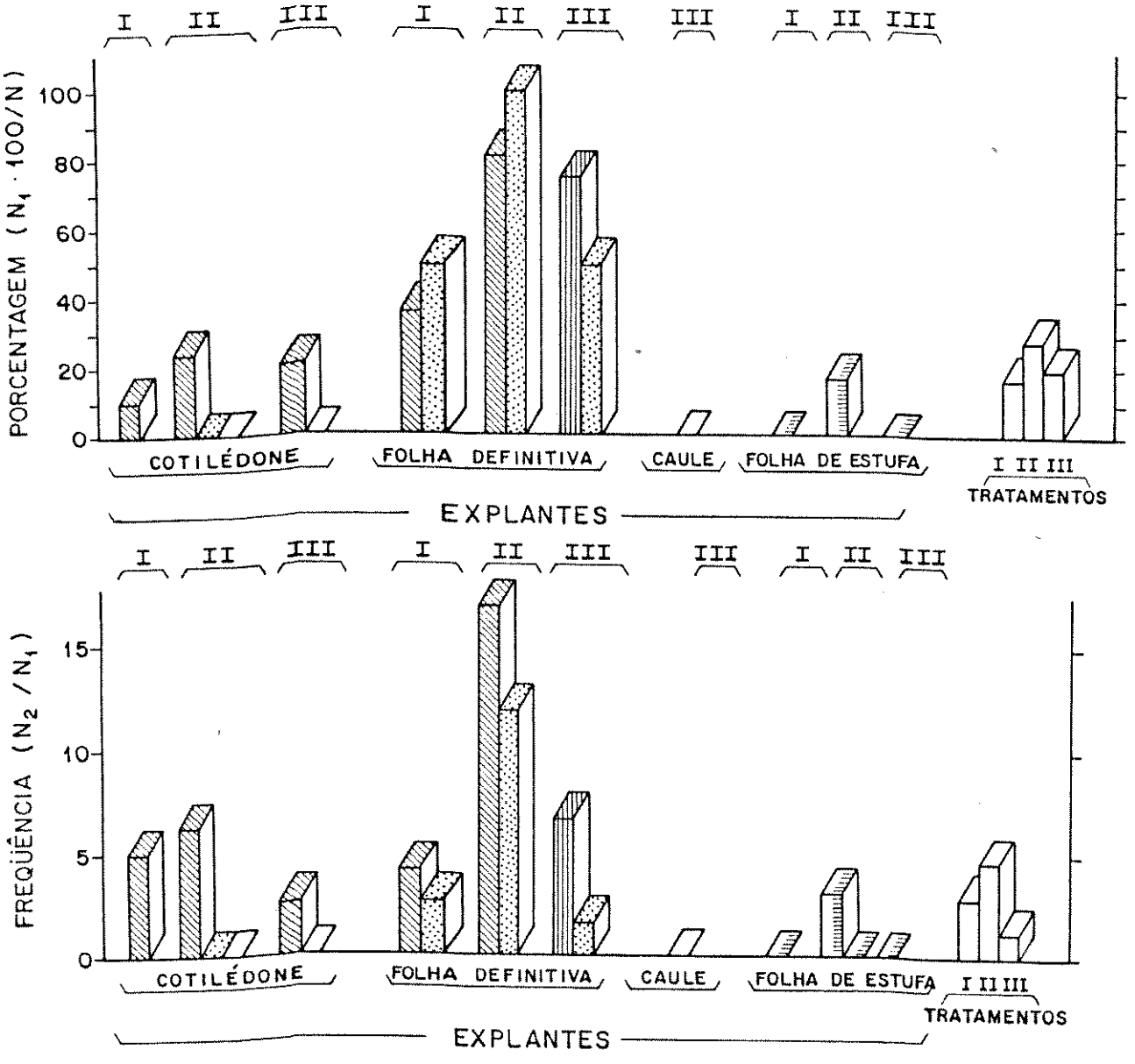
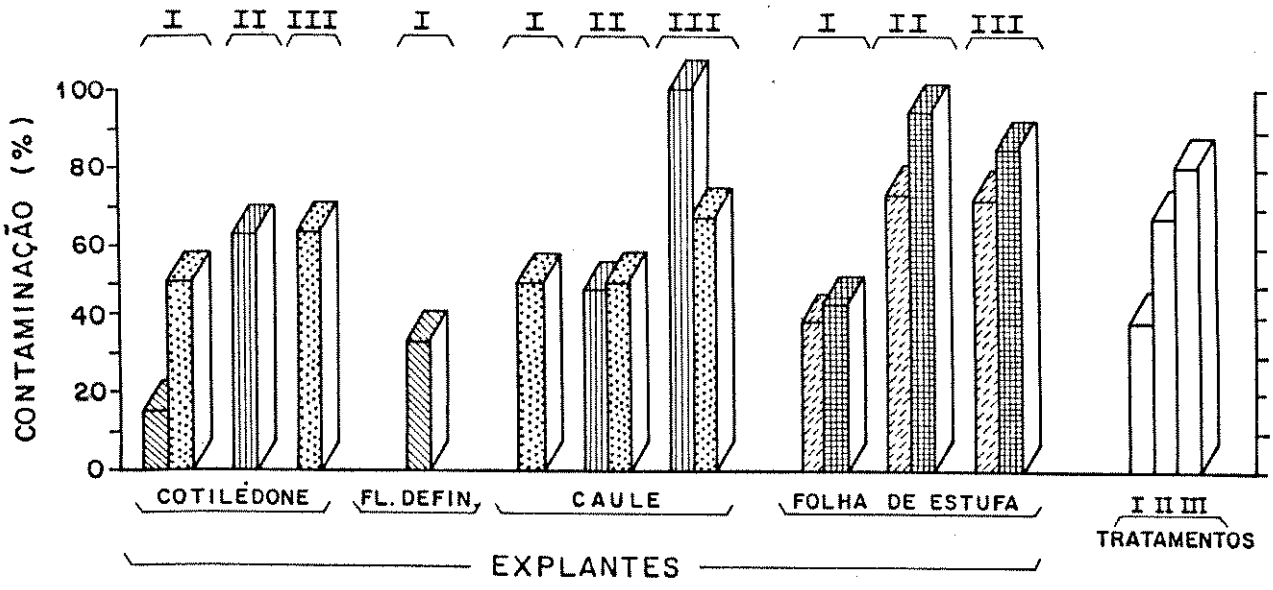


FIGURA 55

PRESSÃO DE SELEÇÃO: EFEITO DE ESTERILIZAÇÃO DO FILTRADO (Experimento Nº 2)

CULTIVO *in vitro* SEM AUXINA (SÓ 6-BA 10 μM)

FASE 1 : FORMAÇÃO DE CALO



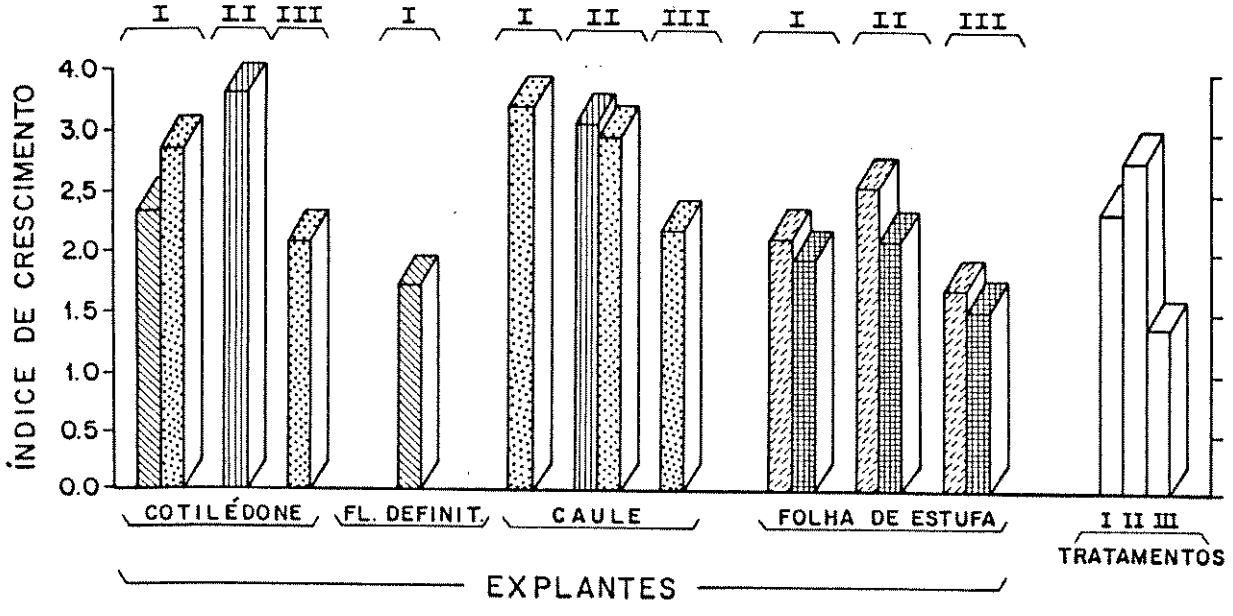


FIGURA 55

PRESSÃO DE SELEÇÃO: EFEITO DE ESTERILIZAÇÃO DO FILTRADO (Experimento Nº 2)

CULTIVO *in vitro* SEM AUXINA (SÓ 6-BA 10 μM)

FASE 2 : REGENERAÇÃO

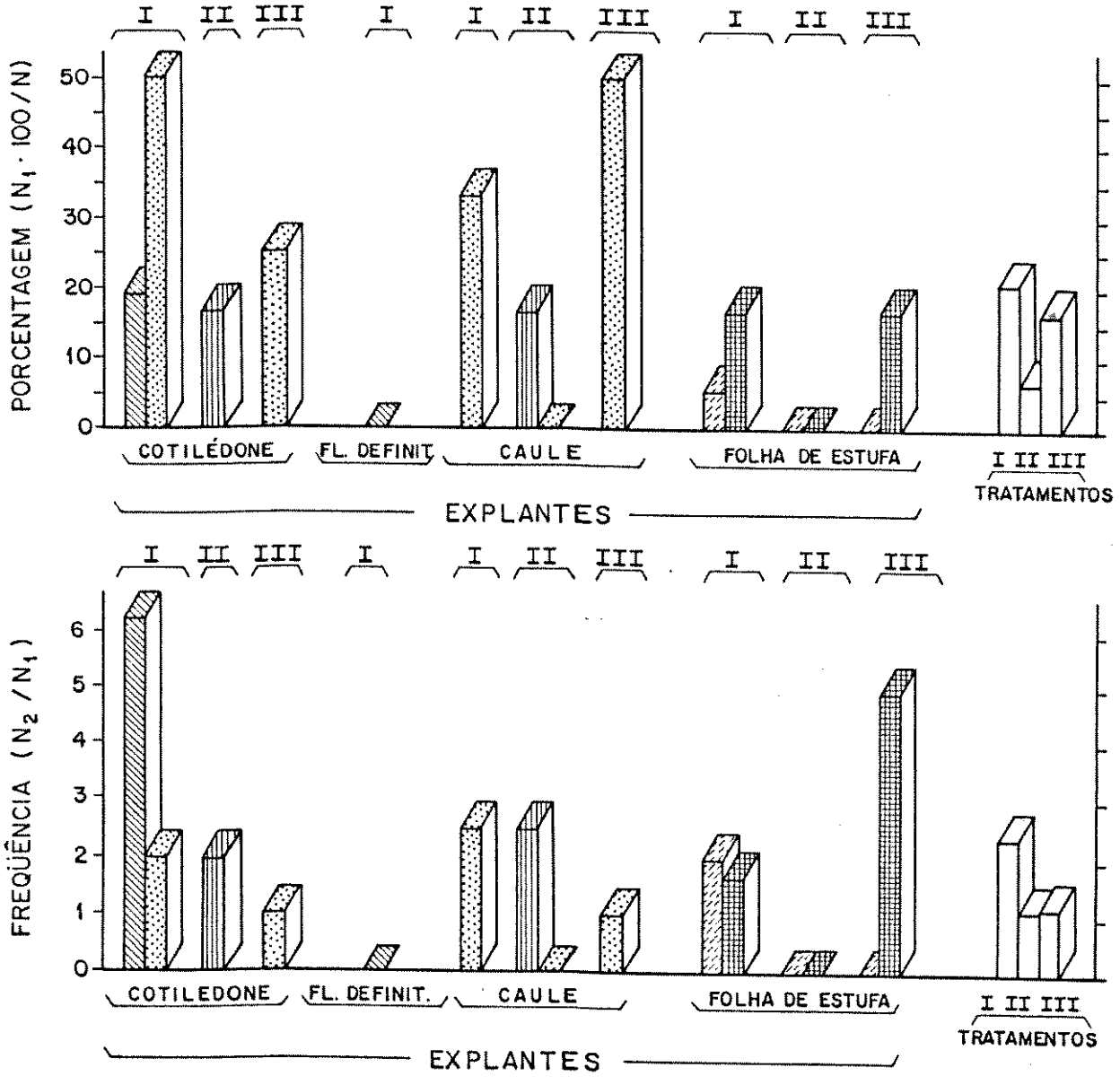
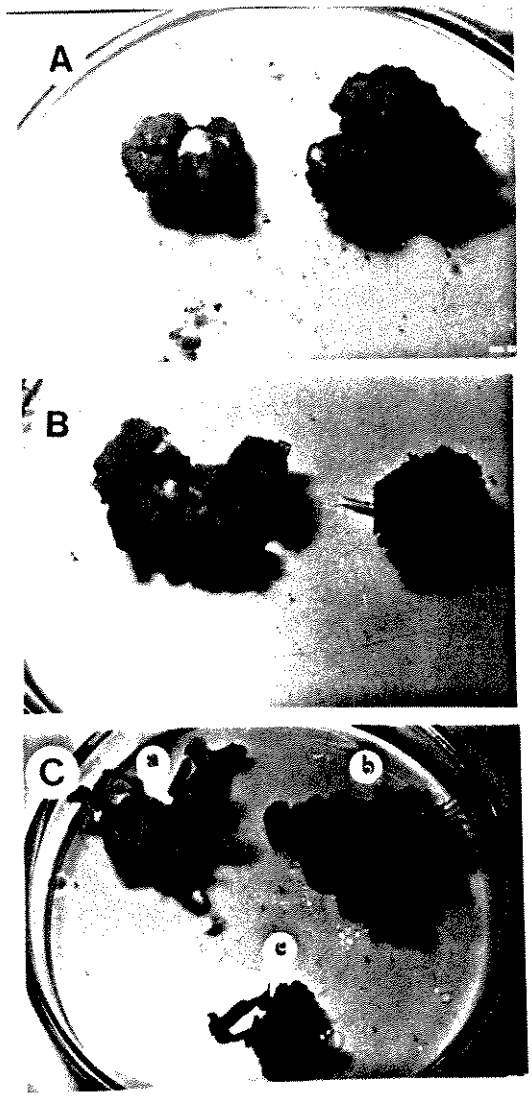


FIGURA 56 - Calos obtidos no 2º experimento com filtrado estéril de *A. solani*

A. Em presença de auxina. À esquerda, o calo que permaneceu em ToA/III/a (controle). À direita, calo que permaneceu em ToA/II/a (50% de filtrado autoclavado). Note-se que o desenvolvimento do calo que permaneceu em presença do filtrado foi maior do que aquele que permaneceu em meio MS normal.

B. Em ausência de auxina. À esquerda, o calo que permaneceu em ToA/I/b (50% do filtrado esterilizado em Millipore). À direita, calo que permaneceu em ToA/III/b (controle). Os calos que se desenvolveram em presença do filtrado apresentam um crescimento maior do que aqueles que se desenvolveram em meio MS normal. Em (A) e (B) calos após 15 dias de inoculação a partir de calo de folha adulta como explante inicial.

C. Em presença de auxina:



a. calo obtido no tratamento ToA/II/a (50% do filtrado esterilizado em Millipore);

b. calo obtido no tratamento ToA/I/a (50% de filtrado autoclavado);

c. calo obtido no tratamento ToA/III/A (controle).

Todos os tratamentos apresentaram um bom índice de regeneração, não havendo diferenças significativas entre eles, em relação ao crescimento de calos.

Documentação dos calos (em C) após 40 dias de inoculação, a partir de calo de folha definitiva como explante inicial.

4.3. 3º Experimento - isolado Mococa - Período de cultivo do fungo: 21 dias

No 2º experimento, o filtrado de cultura obtido após cultivo de *A. solani* isolado Mococa por 21 dias foi testado em relação a tipo de esterilização do filtrado, e as influências no cultivo *in vitro* do suprimento hormonal exógeno e de explante bem como do material vegetal. Presença de auxina foi benéfica, pois, além de ter favorecido regeneração influiu no fenótipo dos calos pois a presença de AIA no meio de cultura resultou em calos de cor creme e friáveis, enquanto que sem esta auxina os calos se apresentaram duros e menores. Por isso, neste 3º experimento, manteve-se a combinação hormonal padrão por nós utilizada para regeneração do tomate: AIA 25 μM e 6-BA 10 μM.

Neste 3º experimento, quisemos estudar mais detalhadamente fatores relacionados ao próprio preparo do meio de cultura utilizado na pré-seleção correlacionando-os com a resposta *in vitro*. Apenas um parêntese, neste experimento foi utilizado o mesmo filtrado de cultura testado anteriormente (experimento nº 2 - item 4.2). Os fatores estudados foram: a) diminuição da composição salina do meio MURASHIGE & SKOOG da metade de concentração no 2º experimento para 1/4 da composição original neste experimento, tendo-se em vista que o fungo foi cultivado em meio sintético e poderia estar havendo, talvez, concentrações altas de certos sais no meio de cultura de pré-seleção, concentrações estas que seriam provavelmente tóxicas e que mascariam, assim, possível efeito fitotóxico de toxina(s) *in vitro*, além de ser talvez uma das razões pela não constatação de um efeito inibidor bem óbvio no experimento anterior, e b) diluição do filtrado estéril pois, talvez, a utilizada anteriormente não tenha sido aquela mais adequada para discriminar respostas.

Neste 3º experimento, foi levado em conta outro fator: idade dos calos que são submetidos a pressão de seleção (ver

Métodos - item .3). O filtrado foi submetido à autoclavagem para esterilização, tratamento este que além de facilitar a preparação do meio mantém o efeito fitotóxico do filtrado (ver Fig.50 1), assegurando, assim, uma real pressão de seleção.

Vamos analisar o resultado do experimento nº 3 por partes. Primeiro, analisaremos a contaminação. Neste aspecto, temos dois tipos de comportamento:

1. experimentos que apresentaram níveis constantes de contaminação em todos os tratamentos. Tal foi o uso dos experimentos Si-120/D ("Petomech" 5319004 multiplicado - folha definitiva de estufa) e Si-92/3/F ("Petomech" 5319006 original - folha definitiva estéril) cuja contaminação se situou consistemente ao redor dos 50% em todos os experimentos (Figs. 57A e 57B) e
2. os demais experimentos nos quais a contaminação variou geralmente de zero a 16%, mas chegando ao máximo de 66,6% em dois casos.

De modo geral, podemos dizer que a contaminação destes experimentos se situou ao redor dos 20%.

Quanto ao crescimento de calos medido pelo índice de crescimento, se considerarmos as médias ± desvio-padrão destes índices, verificaremos que não houve diferença significativa entre os crescimentos de calos mantidos quer em diluições do filtrado (Fig. 57A) , quer em diluições do meio sintético de Czapek-Dox (Fig.57B) . Mas se compararmos o efeito de cada diluição em si, filtrado x controle, observamos que houve promoção de crescimento dos calos mantidos nas diluições de 75 e 50%, mas não houve promoção de crescimento na diluição de 25%.

Particularizando por explante o efeito das diluições do filtrado notamos que, com folha de estufa ocorreu inibição de cres

cimento do calo, principalmente na diluição de 50% (Fig. 57A), mas este efeito foi também observado no controle (Fig. 57B).

Regeneração não ocorreu com este tipo de explante. Com cotilédone, obteve-se um padrão de crescimento e regeneração nula que se repetiu em todos os tratamentos testados.

Caule foi o material mais propício a regeneração (100% do tratamento ToA/II/1 e 75% no tratamento ToA/II/5). Deve-se considerar com muito cuidado a regeneração total do experimento Si-92/5/H em presença do filtrado com diluição de 75%, pois em vários experimentos posteriores não se observou qualquer regeneração nesta diluição em vários tipos de explantes empregados. Quanto a alta porcentagem obtida no outro experimento Si-92/2/H em presença de 50% do meio sintético de Czapek-Dox (controle), devemos considerar que este mesmo experimento não se verificou nenhuma regeneração quer em presença do filtrado (independente de diluição) quer no controle mais diluído 25% (Figs. 57A e 57B - Fase 2).

Este resultado parece sugerir que houve uma variação maior do poder regenerador do material do que pressão de seleção. Poderia se chegar também que esta variação com caule poderia ser atribuída a idade avançada dos calos (83 dias) que já estariam em processo de diferenciação mesmo que não se pudesse detecta-se macroscopicamente quando do início do cultivo em presença do filtrado, pois apenas calos sem qualquer sinal externo de regeneração foram utilizados. Este problema desaconselha o uso futuro de calos de idade avançada para início de pré-seleção in vitro.

Se analisarmos os resultados de folha definitiva em bloco por tratamento, teremos:

Diluição	Índice de crescimento média ± desvio-padrão	intervalo
75% do filtrado de cultura (v/v)	1,01 ± 0,20	0,81 - 1,21
50% do filtrado de cultura (v/v)	0,84 ± 0,38	0,46 - 1,18
25% do filtrado de cultura (v/v)	1,17 ± 0,50	0,67 - 1,67
75% do meio Czapek-Dox	0,90 ± 0,35	0,55 - 1,25
50% do meio Czapek-Dox	0,88 ± 0,31	0,57 - 1,19
25% do meio Czapek-Dox	1,13 ± 0,49	0,64 - 1,62

Ou seja, não houve praticamente efeito em relação ao crescimento do calo. O principal efeito foi na regeneração. Se individualizarmos um experimento como o Si-92/5 veremos que este com folha definitiva não apresentou qualquer regeneração em presença do filtrado (Fig. 57A - Fase 2 - Tratamento 2), apenas no controle 50% de meio sintético (Fig.57B - Fase 2 - Tratamento 5).

O material Si-92/5 ("Petomech" lote 5319006 original) teve comportamento contraditório; com caule mesmo partindo de calos de idade avançada apresentou regeneração total na mais alta concentração do filtrado testada; enquanto que com folha definitiva, este material não apresentou qualquer regeneração em presença do filtrado, como já foi dito anteriormente. Se atentarmos que o material de "Petomech" lote 5319006 original foi testado também nos experimentos Si-92/2 e Si-92/3 a situação fica mais confusa, pois, enquanto que em presença da mais alta concentração do filtrado de cultura

(75%) com o experimento Si-92/5 tivemos 100% de regeneração utilizando caule, no experimento Si-92/2 mesmo material vegetal , mesmo explante não houve qualquer regeneração.

Se analisarmos agora o controle (Fig. 57 B) , também nas concentração mais alta do meio sintético(4) veremos que,enquanto com folha definitiva com Si-92/5 obtivemos 100% de regeneração, com Si-92/3, mesmo material vegetal, mesmo explante, a regeneração foi nula.

É interessante observar que em ambos os casos citados não houve grande diferença no crescimento dos calos em situações tão antagônicas de regeneração. Este tipo de resultado parece sugerir que no mesmo lote de sementes a potencialidade de regeneração não é uniformemente distribuída, dependendo da coleta ao acaso de material mais favorável. Este tipo de constatação também ocorre quando se analisa a regeneração dos materiais em si, sem interferência de pressão de seleção (ver Figs. 57A e 57B) . Esta é uma idéia que, no entanto, precisa de muito mais dados para ser fundamentada.

Quando se compara os resultados do tratamento ToA/II/2 da Fig.57A e o tratamento II da Fig. 54 , que se referem às mesmas condições de cultivo, mesma combinação de fitorreguladores, mesma idade do calo e mesmo filtrado, diferindo fundamentalmente na composição salina do meio de MURASHIGE & SKOOG utilizada em pré - seleção, observa-se que houve uma diminuição tanto do crescimento de calos (em média cerca de 3 vezes) como principalmente de regeneração

(em média cerca de 6 vezes) paralelas à diminuição da concentração salina do meio de cultura in vitro com o filtrado. Seria como se menor concentração de sais atravancasse o efeito promotor do filtrado de cultura, neste caso, autoclavado. É interessante relatar que, no entanto, a aparência dos calos na concentração mais diluída foi melhor, pois estes se apresentaram mais friáveis e de cor mais clara.

Este fato agora mencionado foi constatado pela análise de cada tratamento como um todo, considerando vários materiais e fonte de explante, mas pode ser dramaticamente ilustrado quando se isola um determinado material vegetal, mesmo explante para as condições salinas do meio mencionadas.

É o caso do material referente ao experimento Si-92/5 já citado, com folha definitiva. Quando se utilizou concentração salina de MURASHIGE & SKOOG diluída à metade da original houve regeneração em presença do filtrado (Fig. 54 - tratamento II o que, no entanto, não representou efeito promotor do filtrado autoclavado, pois, na mesma composição salina do meio, sem filtrado, houve também regeneração no controle (Fig. 54 - tratamento III.

Uma outra evidência obtida deste material mostrando uma possível interação da concentração salina do meio com regeneração é, que o mesmo material citado, em presença de menor concentração salina (Fig.57A) não apresentou qualquer regeneração no filtrado de cultura, apresentando diminuição da porcentagem de regeneração paralela com o aumento da diluição. Com 75, 50 e 25% da diluição do meio Czapek-Dox (v/v) obtivemos respectivamente 100, 50 e 0% de regeneração.

Os dados de índice de crescimento do 3º experimento com o isolado Mococa foram analisados estatísticamente. As comparações múltiplas entre os tratamentos foram feitos por meio de análise de variância efetuadas pelo pacote estatístico MINITAB, versão 81, implantado no Computador Digital - PDP 10 - UNICAMP (ver item 6 - MÉTODOS).

A análise de variância do efeito da porcentagem de diluição do filtrado de cultura de *A solani*, em presença de auxina e citocinina (FIGURA 57A) e somente em presença de citocinina (FIGURA 57B) como um todo mostrou que:

1. a diluição do filtrado de cultura (75, 50 e 25% v/v) não inibiu o crescimento de calos, embora, nesta escala de diluição do filtrado houve aumento linear de fitotoxicidade observado pelos sintomas característicos da doença causados por estas diluições *in vivo* (ver FIGURA 62 - Gráfico das diluições);
2. a diluição do meio sintético (75, 50 e 25%) no qual o fungo foi cultivado também não afetou o cultivo *in vitro*, inibição observada também não foi significativa;
3. quanto ao tipo de fitorreguladores empregados, observou-se que tanto em presença conjunta de auxina e cotocinina, como só na presença de citocinina, houve promoção significativa de crescimento de calos;

4. considerando todos os tratamentos (diluição do filtrado e presença/ausência de auxina) não houve diferença significativa entre o meio sintético do fungo e filtrado do fungo;

5. avaliando cada diluição do filtrado em relação a correspondente diluição do meio sintético, não se observa efeito significativo do filtrado no crescimento de calos, avaliado através do I.C.;

6. utilizando-se o mesmo tipo de esterilização (por membranas de Millipore) que não altera nem fisicamente , nem quimicamente o filtrado, observou-se não haver diferença significativa entre crescimento de calos em presença ou ausência de citocininas. No entanto, em presença de auxina, os calos apresentaram um aspecto melhor, sendo mais friáveis e apresentaram, no geral, regeneração mais alta.

7. o crescimento de calos não foi afetado significativamente pela presença ou ausência de auxinas. Este fato ocorreu tanto com o filtrado esterilizado por membranas de Millipore, como o filtrado esterilizado por calor (autoclavagem);

A análise das médias 2 x 2 observa-se que:

I) tanto o meio do fungo, como o filtrado de cultura de tempo não afetaram significativamente o crescimento de calos, o que já fora evidenciado anteriormente pela análise de variância (item 1 e 2);

II) em presença de citocinina:

a. não houve diferença significativa entre crescimento

de calos mantidos em filtrados esterilizados por autoclavagem ou por filtragem em sistemas de membranas. Ou seja, o tratamento de esterilização dos filtrados de cultura não afetou o cultivo *in vitro* (calos), assim como, não afetou o efeito fitotóxico *in vivo* (ver FIGURA 50 l, m);

b. houve promoção de crescimento significativa em presença do filtrado que passou pelo processo de calor pela autoclavagem, nível de 1% de significância maior do que pelo filtrado que não passou por este processo de calor (nível de 5% de significância).

III. Em presença de auxina e citocinina:

a. constatou-se novamente não haver tido interferência do calor no efeito *in vitro* do filtrado;

b. o filtrado que não sofreu o processo de calor não teve efeito significativo em relação ao controle que passou pelo processo de calor; e

c. o filtrado autoclavado promoveu significativamente o crescimento dos calos em relação ao controle autoclavado. Esta promoção foi, inclusive, altamente significativa (nível de 1%). Parece, portanto, que durante o processo de calor houve(ram) alteração(ões) que ativou(aram) substância)s) que promoveu(eram) o crescimento dos calos *in vitro*. Esta(s) substância(s) inclusive, teve(tiveram) efeito ulterior qualitativo, pois houve promoção do filtrado de cultura de 21 dias tanto na regeneração (ver Fig. 54 - Fase 2 - tratamentos I e II, principalmente folha definitiva) como no enraizamento (ver TABELA 44) no filtrado autoclavado da cultura do fungo do isolado Santa Eliza (diluição 50% v/v). O isolado Santa Eliza, porém, apresentou efeito diferente quanto ao crescimento de calos, pois, o processo de calor para este isolado retirou o efeito promotor do crescimento de calos.

A promoção de crescimento encontrada no isolado Mococa poderia ser devida, talvez, à destruição da(s) toxina(s) na autoclava-

gem, que seria(m) termolábil(eis). Mas, é importante lembrarmo-nos que o efeito fitotóxico permanece mesmo após autoclavagem, como pode ser visto na FIGURA 50 l, m, evidenciando que tal(is) substância (s) continua(m) presente(s) no filtrado, mesmo após autoclavagem.

O efeito fitotóxico dos filtrados do fungo endêmico *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) sacc. f. sp. *aeschynomene* também é mantido após tratamento com calor (WALKER & TEMPLETON, 1978). Este fungo está em fase de registro e comercialização para controle biológico de ervas daninhas, pois é altamente específico sendo seletivamente tóxico para certas monocotiledôneas e dicotiledôneas não hospedeiras, sendo que as dicotiledôneas são mais sensíveis. Estacas das espécies sensíveis que foram colocadas nos filtrados de cultura rapidamente desenvolveram epinastia, murchamento, os bordos foliares secaram e eventualmente colapsaram. Sintomas semelhantes foram observados com o filtrado de *Alternaria solani* (Fig.50 g,j) mesmo após autoclavagem dos filtrados (Fig.50 l,m).

WALKER & TEMPLETON (1978) verificaram que filtrados de cultura do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) sacc. f. sp. *aeschynomene* 5% (v/v), partir do meio de Czapek-Dox inoculado por 21 dias afetou significativamente a erva daninha *Sida spinosa* L. e *Aeschynomene virginia* L. B.S.P., esta última grassa nos arrozais.

Os autores acreditam que esta erva daninha pode ser erradicada dos arrozais por aplicações massivas do fungo e o controle desta erva poderia ser feito por toxina(s) deste fungo.

É interessante lembrar que dentro do gênero *Alternaria*, duas espécies têm sido estudadas para controle biológico de ervas daninhas. São elas: *A. alternantherae* e *A. macrospora*. Uma das plantas teste nestes estudos tem sido o tomateiro, que tem se mostrado sensível a este patógeno.

FIGURA 57 - Resultados do experimento nº 3 com filtrado de cultura de *A. solani*, isolado Mococa. Efeito das diluições da composição salina do meio de cultura e do filtrado obtido a partir do fungo cultivado em meio de Czapek-Dox modificado (filtragem após 21 dias de inoculação do fungo). Fitorreguladores utilizados: AIA 25 µM e 6-BA 10 µM. Condições de cultivo: 15 dias sob luz artificial e temperatura de 25 ± 2°C e posterior transferência para condições naturais de luz e temperatura (estufa) e avaliações de formação e crescimento de calo, através do IC e de regeneração (% e nº de gema/calo). Avaliações feitas após 15 dias de inoculação dos explantes nos meios citados. Utilizou-se as mesmas fontes de explantes e legenda do experimento nº 2 (FIGURA 54 e 55)

FIGURA 57A - Efeito da diluição do filtrado de cultura

1 = 75% do filtrado + 25% do MS diluído a 1/4
2 = 50% do filtrado + 50% do MS diluído a 1/4
3 = 25% do filtrado + 75% do MS diluído a 1/4

FIGURA 57B - Efeito da diluição do meio líquido do cultivo do fungo (Czapek-Dox modificado)

4 = 75% de Czapek-Dox modificado + 25% do MS diluído a 1/4
5 = 50% de Czapek-Dox modificado + 50% do MS diluído a 1/4
6 = 25% de Czapek-Dox modificado + 75% do MS diluído a 1/4

FONTE DE EXPLANTE	TEMPO ANTERIOR DE CULTIVO *in vitro* (DIAS)
cotilédone	0
folha definitiva	25-37
folha definitiva	66
folha definitiva	83
caule	83
folha adulta	0
folha adulta	25-28

FIGURA 57 A

PRESSÃO DE SELEÇÃO: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (Experimento Nº 3)

A. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO DE CULTURA (% v/v)

FASE 1 : FORMAÇÃO DE CALO

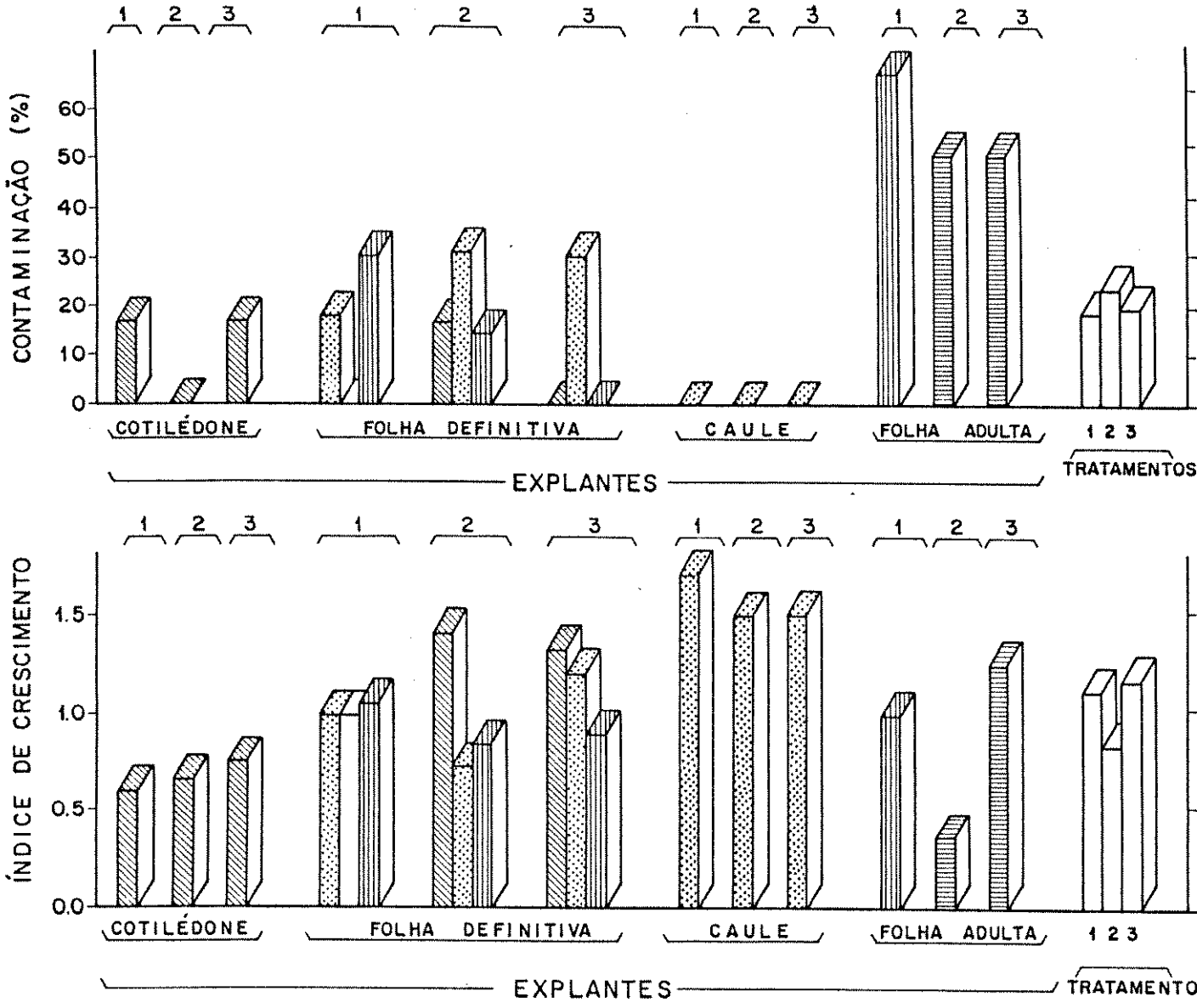


FIGURA 57 A

PRESSÃO DE SELEÇÃO: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (Experimento Nº 3)

A. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO DE CULTURA (% v/v)

FASE 2 : REGENERAÇÃO

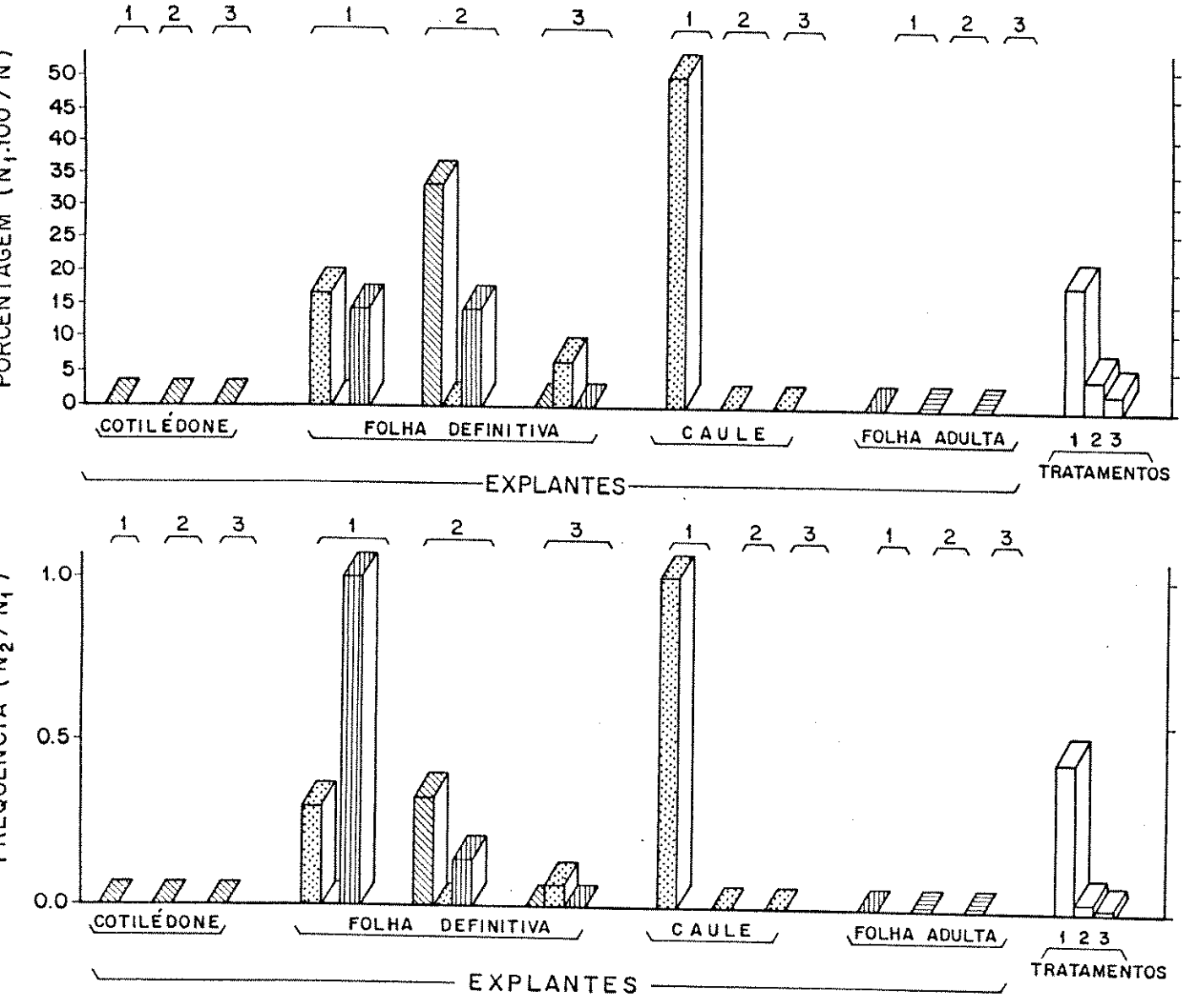
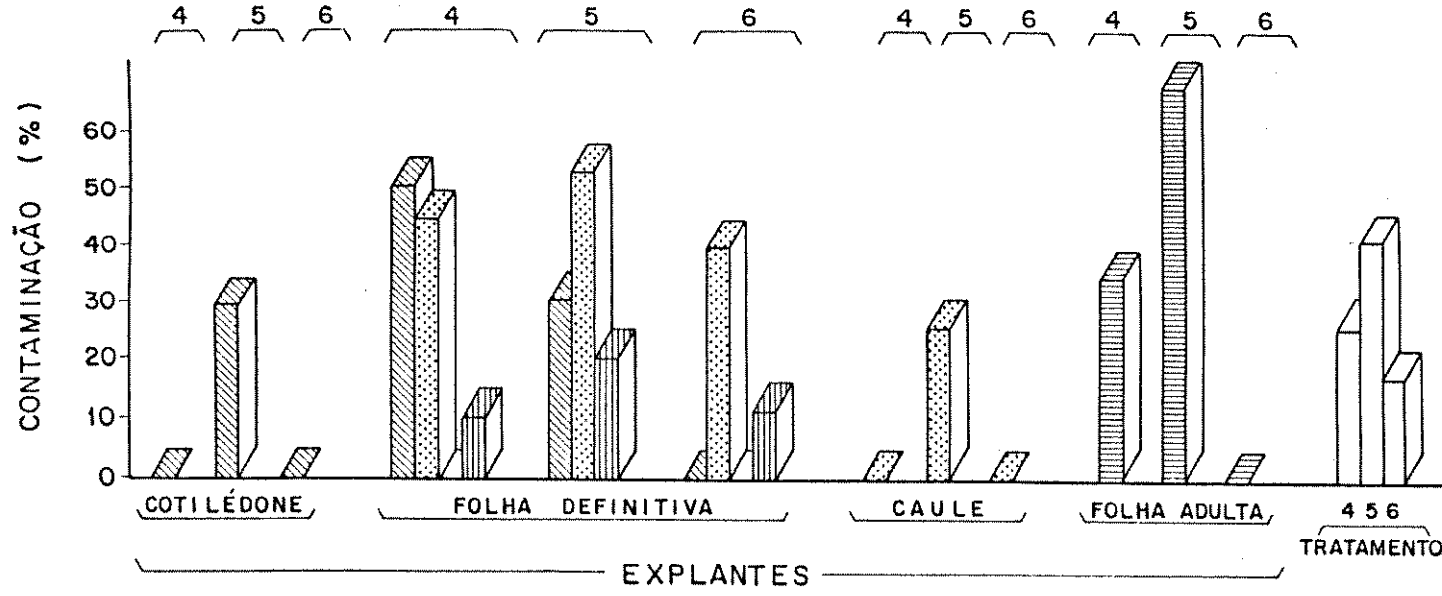


FIGURA 57 B

PRESSÃO DE SELEÇÃO: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (Experimento Nº 3)

B. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DO FUNGO - CONTROLE (% v/v)

FASE 1 : FORMAÇÃO DE CALO



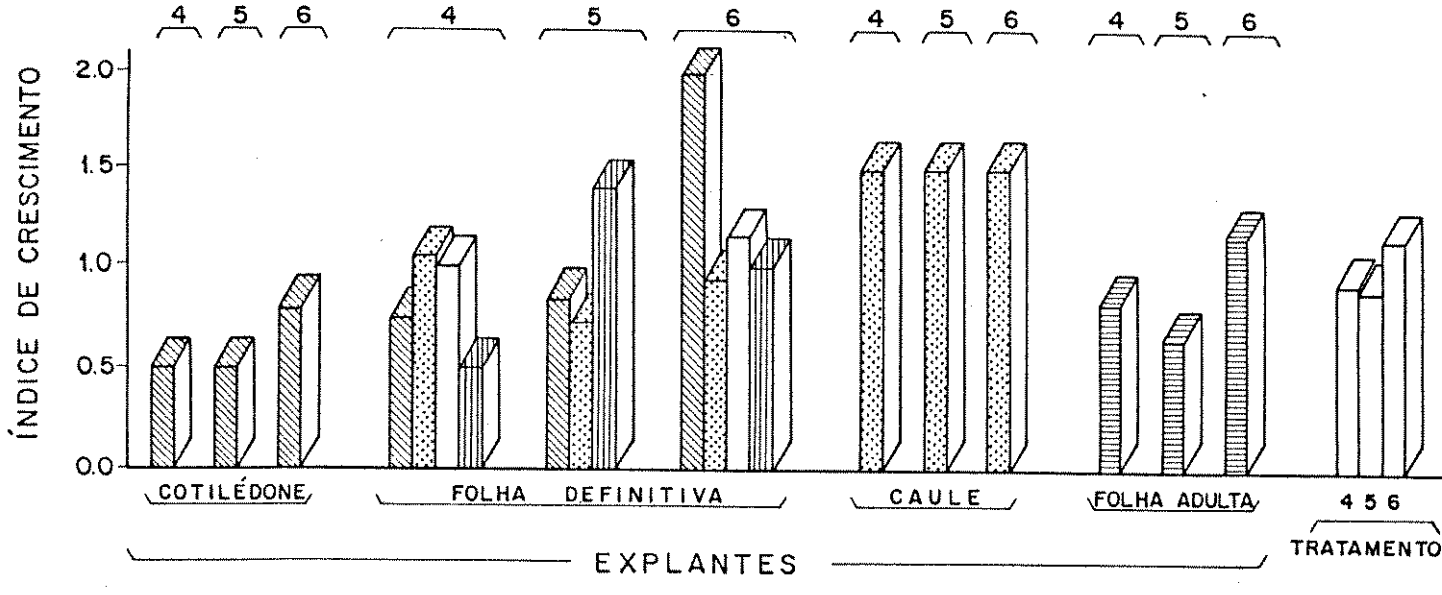
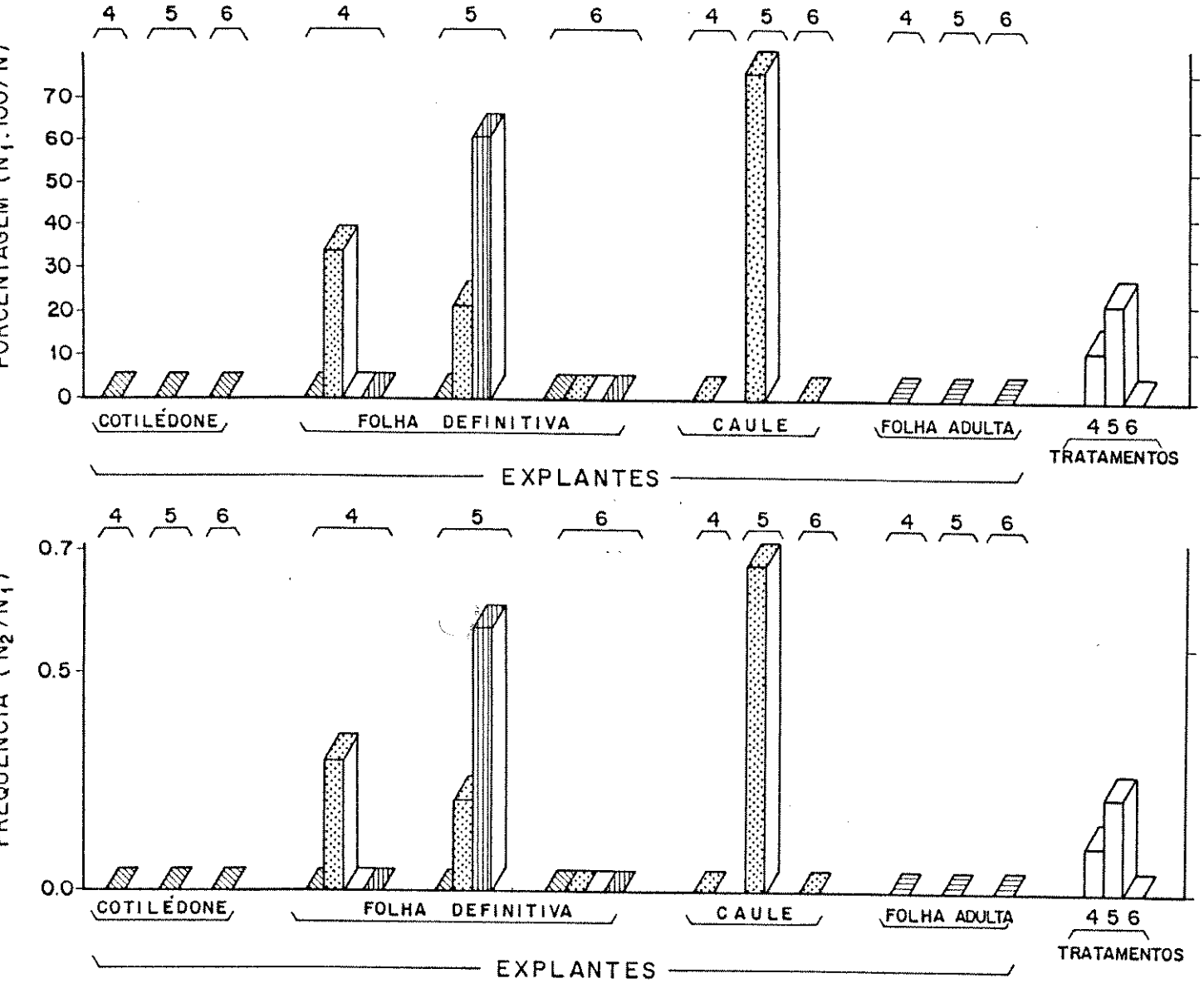


FIGURA 57 B

PRESSÃO DE SELEÇÃO: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (Experimento Nº 3)

B. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DO FUNGO - CONTROLE (% v/v)

FASE 2 : REGENERAÇÃO



No 4º experimento utilizou-se filtrados de cultura correspondentes a culturas mais prolongadas do fungo (33 e 60 dias) em meio líquido de Czapek-Dox (FIGURA 58). Em relação ao filtrado de cultura correspondente ao período de crescimento de 33 dias (FIGURA 58A) observa-se que as curvas de crescimento de calos, crescimento este avaliado por media ponderada (índice de crescimento), foram paralelas, em presença e ausência do filtrado de cultura. A presença do filtrado de cultura, após 15 dias da inoculação dos explantes iniciais (no caso calos) promoveu o crescimento dos calos (esta promoção foi de 300% em relação ao controle), quando se utilizou filtrado de cultura do fungo após crescimento de colônia do fungo em meio líquido de Czapek-Dox (período correspondente a fase III do crescimento do fungo em meio líquido - *ver* FIGURA 52). Este efeito promotor da presença do filtrado de cultura de 33 dias de idade foi diminuindo de intensidade com o aumento do período de permanência contínua dos calos no meio seletivo, de tal forma que após 92 dias de permanência contínua dos calos em meio seletivo com filtrado de cultura do fungo de 33 dias de idade, a promoção de crescimento de calo no meio seletivo foi pequena cerca de 140% em relação ao controle, quando se utilizou calo como explante inicial (FIGURA 58A).

É interessante lembrar que o filtrado de cultura de 33 dias de idade, corresponde a filtrados de atividade fitotóxica estatisticamente significativa (*ver* FIGURA 51) e com provável efeito primeiro na patogênese. Assim, o filtrado de cultura autoclavado utilizado neste 4º experimento, que *in vivo* causou efeitos fitotóxicos, *in vitro* promoveu o crescimento dos calos, sendo que este surpreendente efeito promotor do filtrado fitotóxico foi se enfraquecendo após períodos mais prolongados em contacto contínuo com o meio seletivo (FIGURA 58A).

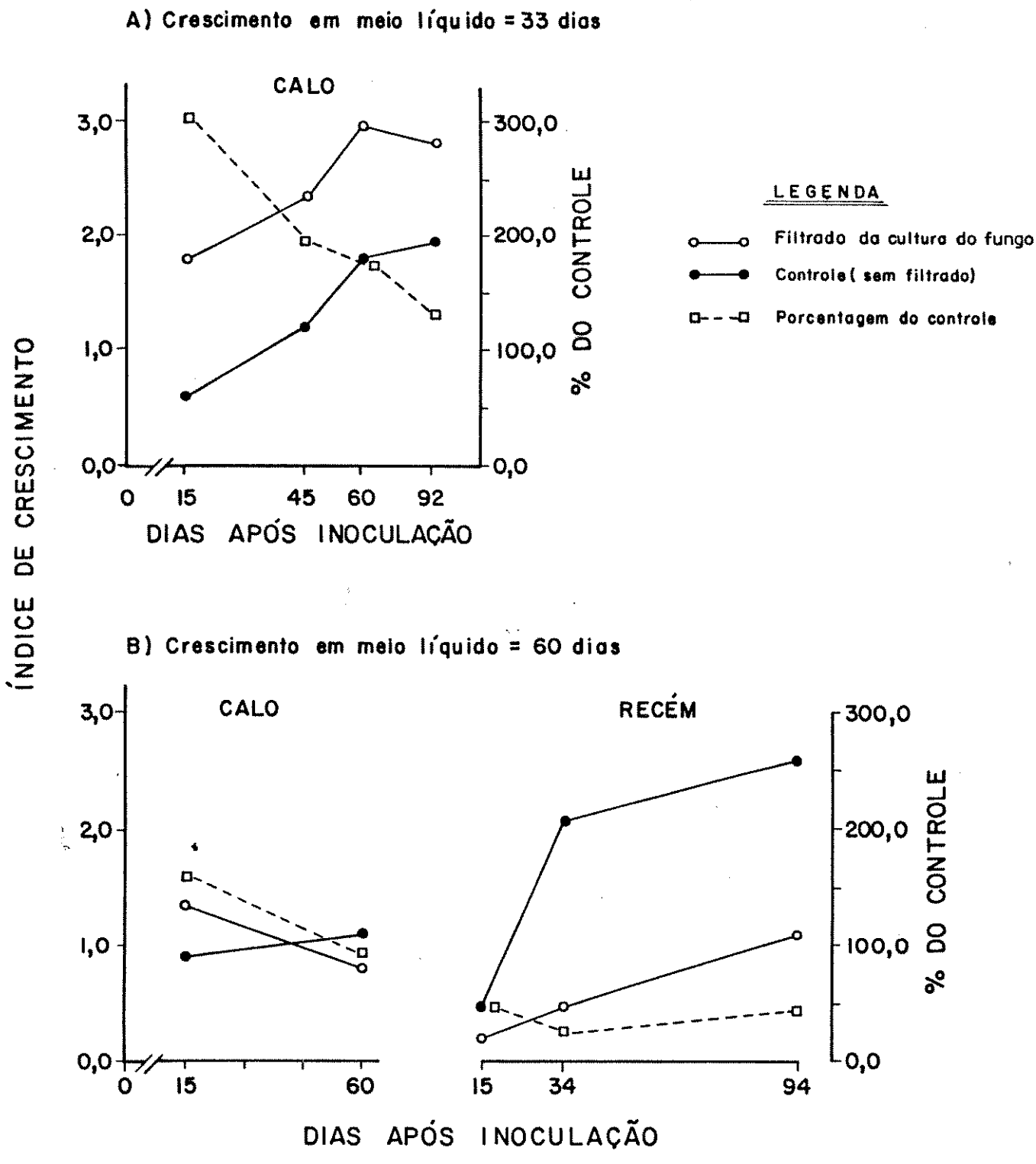
FIGURA 58. *Utilização do filtrado de cultura de A.solani isolado Santa Eliza como pressão de seleção (4º experimento).* Filtrado autoclavado. Efeitos do período de crescimento do fungo em meio líquido de Czapek-Dox e do tipo de explante inicial, em relação ao crescimento de calos. Avaliação feita após vários períodos de permanência contínua dos explantes em meio seletivo. Composição do meio seletivo: MS normal + filtrado de cultura (75% v/v).

A) Periodo de incubação do fungo em meio líquido de 33 dias.

B) Período de incubação do fungo em meio líquido de 60 dias

Foram utilizados calos de 14 dias (A) e de 21 dias (B) e explantes recém-excisados (B). Em todos os casos os explantes foram retirados de folhas de plantas mantidas em estufa. Material vegetal empregado: A+B, material que foi utilizado simultâneamente em experimento de produção de plantas (experimento Si-145/D — ver TABELA 25).

FIGURA 58


A) Crescimento em meio líquido = 33 dias
CALO
3,0
2,0
1,0
0,0
300,0
200,0
100,0
0,0
% DO CONTROLE
0
15
45
60
92
DIAS APÓS INOCULAÇÃO
ÍNDICE DE CRESCIMENTO
LEGENDA
Filtrado da cultura do fungo
Controle (sem filtrado)
Porcentagem do controle
B) Crescimento em meio líquido = 60 dias
CALO
RECÉM
3,0
2,0
1,0
0,0
300,0
200,0
100,0
0,0
% DO CONTROLE
0
15
60
15
34
94
DIAS APÓS INOCULAÇÃO

DURBIN (1983) considera que se tivermos uma visão relativamente ampla do conceito de toxinas, poderíamos incluir hormônios vegetais, como toxinas. Para este autor 2 exemplos bem documentados que envolvem a produção do AIA diretamente pelos plasmídeos do *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, exemplos estes que colaborariam com o ponto de vista de hormônios como toxinas. A produção do hormônio vegetal é necessária para a formação do tumor nestas doenças causadas pelas bactérias citadas; linhagens com capacidade aumentada de síntese de AIA produzem tumores menores. Pelo menos no caso de *P. syringae* pv. *savastanoi*. DNA extracromossomico tem os genes estruturais que codificam a síntese do AIA. Assim, mutantes AIA^- que não possuem o plasmídeo, não contêm atividades enzimáticas para as 2 reações que precedem imediatamente o AIA e assim não formam tumores (COMAI & KOSUGE, 1980 *apud* DURBIN, 1983). A reintrodução do plasmídeo via transformação restaura estas características de síntese de AIA e conseqüentemente a formação do tumor. Foi verificado que em *Agrobacterium tumefaciens* a raça virulenta na indução do câncer vegetal, com o plasmídeo, está associada com a habilidade de liberar citocininas (trans-zeatina) e quantidades aumentadas de auxinas para o ambiente circundante (WEILER & SPANIER , 1981).

O sistema de cultura de tecidos envolve os reguladores de crescimento como verdadeiros alicerces; assim, a promoção do crescimento dos calos *in vitro* causada pelo filtrado do fungo, poderia ser devida, talvez, a liberação de auxinas naturais e/ou citocininas pelo próprio fungo, auxinas e citocininas estas, que a cultura de tecidos como sistema sensível, responderia.

No 4º experimento foram empregados, também, períodos de inscrição mais prolongados do fungo (60 dias), correspondendo a fase IV de crescimento do fungo (FIGURA 58B). Com este período de incubação do fungo utilizou-se 2 tipos de explante inicial: recém-excisado e calo. Com explante recém-excisado observou-se inibição praticamente total da fase de formação de calo, inibição esta que não foi revertida em nenhum momento da briga permanência no meio seletivo (92 dias). Quando se utiliza calo como explante inicial, pode-se acompanhar o efeito *in vitro* de filtrados de fungo correspondentes a diferentes fases do crescimento do fungo, na fase de formação de calo. Avaliação feita após o mesmo período de permanência no meio seletivo, por exemplo 15 dias, observa-se que enquanto o filtrado de cultura de 33 dias de crescimento do fungo em meio líquido promoveu o crescimento (FIGURA 58A). Sendo que o índice de crescimento obtido foi 3 vezes maior que o índice obtido nos calos mantidos em meio seletivo com filtrado de fungo de 60 dias. Com o filtrado de cultura correspondente a fase final do crescimento do fungo (60 dias - fase IV) não se observa mais o efeito promotor *in vitro* na fase de formação de calo (FIGURA 57B), mesmo em períodos mais longos de permanência dos explantes no meio seletivo. Esta falta de promoção observada com o filtrado obtido da fase final do crescimento do fungo, talvez indicasse que o metabólito excretado da cultura do fungo, que apresentaria efeito promotor *in vitro*, o seria metabolizado e/ou excretado nas fases II e III (ver experimentos anteriores e filtrado de 33 dias neste experimento). O aspecto do fungo após 33 dias, é mostrado na FIGURA 50C. Outro ponto seria que os metabólitos da fase final de crescimento do fungo teriam efeito inibidor *in vitro* e este efeito se situaria principalmente na fase de divisão e multiplicação celular, no processo de desdiferenciação, pois, pra

ticamente não houve desdiferenciação no explante recém-excisado quando colocado em contacto com o filtrado de cultura do fungo de 60 dias de idade (FIGURA 58B).

Em relação ao período de permanência dos explantes em pressão de seleção, os dedos na literatura, resumidos por ORTON (1984) são de que calos derivados de protoplastos de mesófilo de folhas de batata "Russel Burbank" foram cultivados por apenas 1 mes antes da regeneração. Geralmente, pouca ou nenhuma variação foi observada entre as plantas regeneradas de tais culturas "jovens" e o grau de variação aumentou com a idade. Inicialmente nenhuma variação foi observada entre plantas regeneradas de protoplastos de batata dihaploides, mas foi observada variação se as culturas do calo foram mantidas por períodos prolongados. Batata, como cana-de-açucar são exemplos de plantas propagadas largamente por via assexuada, o que teria como conseqüência uma mistura genética pré-existente no tecido doador. ORTON (1984) sugere que a variação somaclonal, mesmo na batata, se origina das misturas genéticas pré-existentes nas plantas doadoras e surge de novo durante a cultura *in vitro*. Assim, períodos mais prolongados de cultura deveriam, pois, aumentar a probabilidade de obtenção de variantes.

Foram feitos vários ensaios com pressão de seleção *in vitro* utilizando-se filtrados de cultura de *A. solani* isolado Santa Eliza. A obtenção destes filtrados, assim como o resultado dos testes de patogenicidade do fungo e do filtrado foram mostrados na TABELA 39. Estes filtrados foram utilizados em várias diluições e verificou-se a ocorrência qualitativa de regeneração. Os resultados positivos (ocorrência de regeneração) são mostrados na TABELA 46, evidenciando que a metodologia utilizada de pressão de seleção em presença do filtrado de cultura de

TABELA 46 - Regeneração *in vitro* em presença de filtrados estéreis de cultura de *A. solani* isolado Santa Eliza cultivado em meio líquido sintético (Czapek - Dox. Resultados dos testes de patogenicidade das culturas do fungo e dos respectivos filtrados são mostrados na TABELA 39.

Sigla do filtrado	Período de crescimento do fungo em meio líquido (dias)	Diluição do filtrado estéril (%)
To.A/2/60	60	75,0
To.A/3	42	75,0
To.A/4	42	75,0
To.A/5	45	75,0
To.A/14	30	75,0
To.A/15	29	37,5
To.A/16	25	75,0
To.A/18	26	75,0
To.A/19	26	75,0
To.A/20	26	75,0
To.A/23	60	50,0
To.A/24	27	50,0
To.A/25	45	50,0

A. solani em células de tomate cultivadas *in vitro*, por nós empregada, resultou, em vários casos, em regeneração de plantas.

5. Testes de resistência/suscetibilidade em plantas regeneradas (gerações R_0 e R_1)

5.1. Testes de resistência/suscetibilidade realizados na 1a. geração (R_0) de plantas regeneradas através da utilização das técnicas de cultura de tecidos com o emprego do filtrado de cultura do fungo como pressão de seleção.

As plantas da geração R_0 foram testadas com filtrado de cultura do fungo, isolado Santa Eliza, não diluído, através do método do fluxo de transpiração que utiliza estacas de tomateiro - (ver MÉTODOS, Ítem 3.5.). O conceito de índice de nota foi dado como descrito na TABELA 40 (ver RESULTADOS E DISCUSSÃO - Ítem 3.7.1.). O efeito de filtrado comprovadamente tóxico, em plantas S, em relação ao período de crescimento do fungo já foi descrito anteriormente (ver RESULTADOS E DISCUSSÃO - TABELA 40), mas, recapitularemos os pontos principais, pois, o teste da resistência/sustibilidade foi feito com filtrados de cultura de 2 períodos de crescimento do fungo 30 e 45 dias, sendo que nos testes efetuados nas plantas R_0 empregou-se filtrados de cultura de 45 dias de idade.

Os resultados dos testes de resistência/suscetibilidade de plantas regeneradas R_0, pelo método de estacas de tomateiro, são mostrados na TABELA 47. Estes resultados são mostrados em relação a 3 controles: 1 = meio de Czapek-Dox sem inoculação do fungo, para observar-se possível efeito fitotóxico da composição do meio de cultura do fungo; 2 = meio de MS sem inoculação de calos

para observar-se possível efeito fitotóxico da composição do meio de cultivo dos calos e 3 = água destilada esterilizada. Avaliação foi feita após 24 horas de permanencia das estacas de plantas R_0, obtidas por pressão de seleção ou por variação somaclonal, em filtrados de cultura de 45 dias de idade, comprovadamente fitotóxicos. Foram usadas 2-3 estacas por frasco, 2-3 frascos por planta testada. Das avaliações feita por tratamento, foi feita a média e calculado o desvio-padrão. Estas médias com os respectivos desvios-padrões são mostradas também na TABELA 47.

TABELA 47 - Resultados do teste de suscetibilidade/resistência em plantas R_0 (teste de estacas de tomateiro).

1 = controle - meio de Czapek-Dox sem inoculação do fungo
2 = controle - meio de MS sem inoculação dos calos
3 = controle - água destilada esterilizada

Material Vegetal

A = "Petomech" 5319004 original
B = "Petomech" 5319006 original
C = "Petomech" 5319006 multiplicado em 1981
E = "Joaquin"

Utilização do índice de notas 1-7 (ver TABELA 40).

* Sementes armazenadas. Teste posteriormente em R_1.
- Não realizada pré-seleção, plantas obtidas por variação somaclonal.

Teste feito com plantas vegetativas. Algumas destas plantas não chegaram à fase reprodutiva, pois foram podadas drasticamente por apresentarem-se, posteriormente, infestadas por traças.

TABELA 47 - Resultados do teste de suscetibilidade/resistência (teste de estacas de tomateiro) em plantas R_0

Código da planta	Material vegetal	Pré seleção	Índice ($\bar{x} \pm$ desvio) Filtrado tóxico	Controle 1	2	3
A/1D/06	B	+	1,00	1,50		
A/1D/16a	E	+	4,50±1,56	2,00		
A/2B/07*	B	+	2,00	1,00		
A2/IIa/05a*	E	+	5,00			
Si.92-1/C/05b	A	-			2,00	
Si.92-2/H/01c	B	-	2,18±0,88			
Si.92-3/C/08a	B	-	3,00			
Si.92-3/C/15c	B	-	2,73±0,32			
Si.92-6/H/02a	E	-	4,10±1,62			
Si.92-6/C/03a	E	-	3,00±1,28			1,75
Si.96-1/H/08a	A	-	3,75±2,47			
Si.119-2/C/02a	A	-			2,00	
Si.119-2/C/05a	A	-	3,50	1,50		
Si.119-2/C/47a	A	-	4,50			
Si.119-2/C/57b	A	-	2,00			
Si.119-2/C/72a	A	-	5,75	1,00		
Si.119-2/C/81a	A	-	4,75			
Si.119-2/C/50b	A	-	3,25	1,25		
Si.119-2/C/62b	A	-	2,50			
Si.119-2/C/85a	A	-	2,00			
Si.119-2/H/01a*	A	-	3,00±1,22	1,25±0,35		
Si.119-2/H/05d	A	-				1,00
Si.119-2/H/15b	A	-	3,50			
Si.119-2/H/17	A	-		1,25		
Si.126/C/01-c	D	-	4,75±1,06			
Si.126/C/47a	D	-		2,50		1,75
Si.126/C/83	D	-	3,37±0,53	1,25		
Si.126/C/144a	D	-	5,12±0,88			

Utilizando-se o teste das estacas de tomateiro para avaliação do efeito fitotóxico do filtrado estéril não diluído da cultura de fungo observou-se que:

1) este tipo de teste in vivo mostra que houve um aumento do efeito fitotóxico, com o aumento do período de crescimento do fungo em meio líquido, em plantas S (ver ítem 3.7.1.). Há evidências que, parecem indicar 2 períodos distintos: quanto ao efeito fitotóxico nos primeiros 30 dias, seriam liberadas substância(s) que provocariam principalmente murcha e no segundo período a liberação seria predominante de substância(s) que provocariam necrose. Em ambos os períodos, o aumento da liberação seria proporcional ao aumento do período de permanência do fungo em meio líquido (TABELA 40). Sabe-se que os fungos produzem substâncias que atuam em vários processos metabólicos, por exemplo, a atuação do ácido alternárico resulta em murcha (BRIAN et al.,1949), enquanto que *Alternaria tenuis* Nees apresenta metabólitos que causam necrose, como o eter monoetil alternariol ou metabólitos que causam clorose, como o mesmo eter monoetil alternariol e a toxina produzida por este fungo, a tentotoxina (PERO & MAIN, 1970).
A tentotoxina produz clorose em plântulas. Observação interessante, neste caso, é que a tentotoxina é ineficaz quando aplicada após 48 horas de germinação. Este fato foi explicado pela inibição do caminho bioquímico que é efêmero nos cloroplastos em desenvolvimento. Pouco é conhecido sobre o modo de ação de outras toxinas de *Alternaria* que induzem clorose, tais como: ácido tenuazóico (ver FIGURA 1 , TABELA 3), alternariol monoetil

éter e altenuene (TABELA 3)

2) este tipo de teste de resistência consegue,dentro de certos limites, descriminar respostas das plantas regeneradas (R_0). De modo geral, não se obteve plantas resitentes ao filtrado tóxico. O resultado com a planta A/2B/07 (regenerado em presença do filtrado 50% v/v obtido após 19 dias de cultivo do fungo em meio de Czapek-Dox) parece promissor, mas testes futuros deverão ser feitos para confirmar este fato (TABELA 47). A planta A/2B/07 pode ser vista na FIGURA 59.

Plantas R_0 apresentaram crescimento vigoroso no campo , quer obtidas em pressão de seleção (FIGURA 60), quer obtidas sem pressão de seleção de presença de filtrado de cultura do fungo (FIGURA 61).

FIGURA 59- UTILIZAÇÃO DO FILTRADO DE A. solani COMO PRESSÃO DE SELEÇÃO (Diluição do filtrado 50% v/v).

(A) REGENERAÇÃO

Com o mesmo período de tempo (66 dias), obtem-se do tratamento com filtrado autoclavado (à direita) uma planta completa, inclusive com ápice (A/2B/01) enquanto no controle (à esquerda) formou-se apenas uma folha (A/2D/01). As plantas regeneradas provieram de calos distintos, oriundos do mesmo tipo de explante inicial (calo de folha de 12-15 dias de idade). Documentação feita por ocasião da passagem dos plantletes para a fase de enraizamento.

(B) SOBREVIVÊNCIA NO CAMPO

Visão da planta regenerada R = A/2B/07, em presença do filtrado autoclavado, no campo. Material vegetal = "Petomech" 5319006, explante inicial = folha. À esquerda, visão geral da planta onde se pode ver os frutos classificados como "Light Red" e "Mature green" este apresentando bico.
À direita, fruto "Light Red" visto com maior aproximação, que tem índice de forma = 2,55. As medidas dos eixos do fruto foram obtidas com paquímetro Verma Caliper marca Mitutoyo.

Histórico de A/2B/07

Germinação	05/04/82
Cultivo do submeristema	26/04/82
Explante em meio padrão	22/06/82
Pré-seleção (50% do filtrado autoclavado)	13/07/82
Retirada da plantlete	06/10/82
Estádio de plantlete = 4	
Fenótipo das folhas = típico	
Aclimatação	05/11/82
4 raízes bem ramificadas, 4cm de altura, 5 folhas	
Passagem para condições de ambiente	10/11/82
Plantas no solo	24/11/82

FIGURA 59

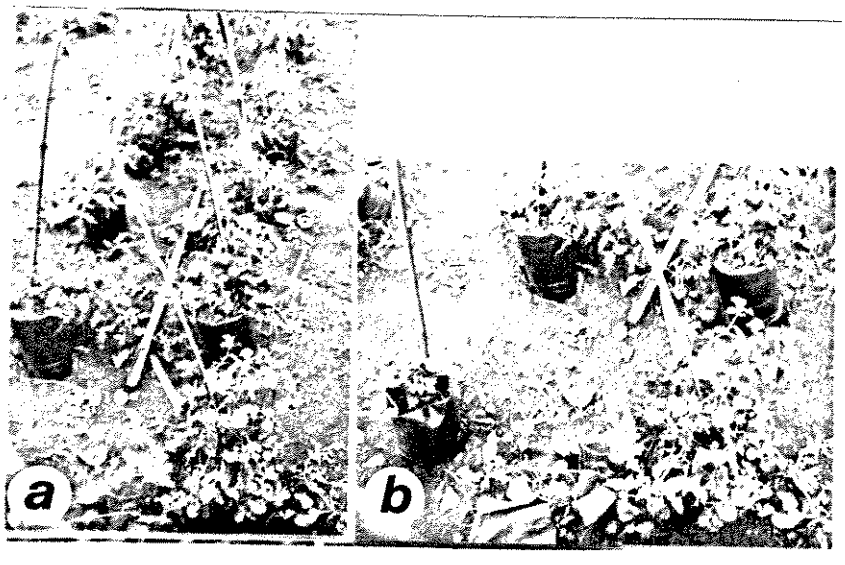


FIGURAS 60 e 61 - Aspecto da planta R_0 obtida de pressão de seleção apresentando crescimento vigoroso no campo (cultivar Joaquim, explante inicial = folha definitiva).

FIGURA 60 - Aspecto da planta regenerada na presença de filtrado autoclavado (50% v/v) - 2º experimento:

a) Visão geral no campo, das plantas regeneradas, tanto de variação somaclonal como d e pré-seleção in vitro. Em primeiro plano, a planta A-2/IIa/05a (planta R_0 original).

b) Aspecto mais aproximado de algumas plantas, notadamente A-2/IIa/05a. Esta é a planta regenerada em presença do filtrado autoclavado de cultura do fungo isolado Mococa, na concentração de 50% v/v. Regeneração (estádio 3) ocorrida em presença de AIA 25 µM e 6-BA 10 µM. Progênie desta planta foi testada para teste de resistência in vivo (sigla da planta R_1 nos testes in vivo = B_3). Nos testes in vivo plantas B_3 se apresentaram estatisticamente superiores em relação à resistência.



HISTÓRICO DA PLANTA R_0(A-2/IIa/05a)

	DATA
. Germinação	24/11/82
. Cultivo de submeristema	17/12/82
. Inoculação	10/02/83
. Pré-seleção (filtrado de cultura de fungo após 21 dias de permanência em meio líquido, 50% v/v, autoclavado). A. *solani* isolado Mococa.	
. Explante inicial = calo de 22 dias de idade obtido a partir de folha definitiva.	
. Retirada da plantlete	16/04/83
. Enraizamento	20/05/83
. Aclimatação	11/06/83
. Passagem para o solo	30/06/83

Teste de Resistência in vivo

Planta R_0(A-2/IIa/05a)

estaca colocada em presença do filtrado comprovadamente tóxico - nota 4,0 (máximo de sensibilidade = 5,0)	27/10/83

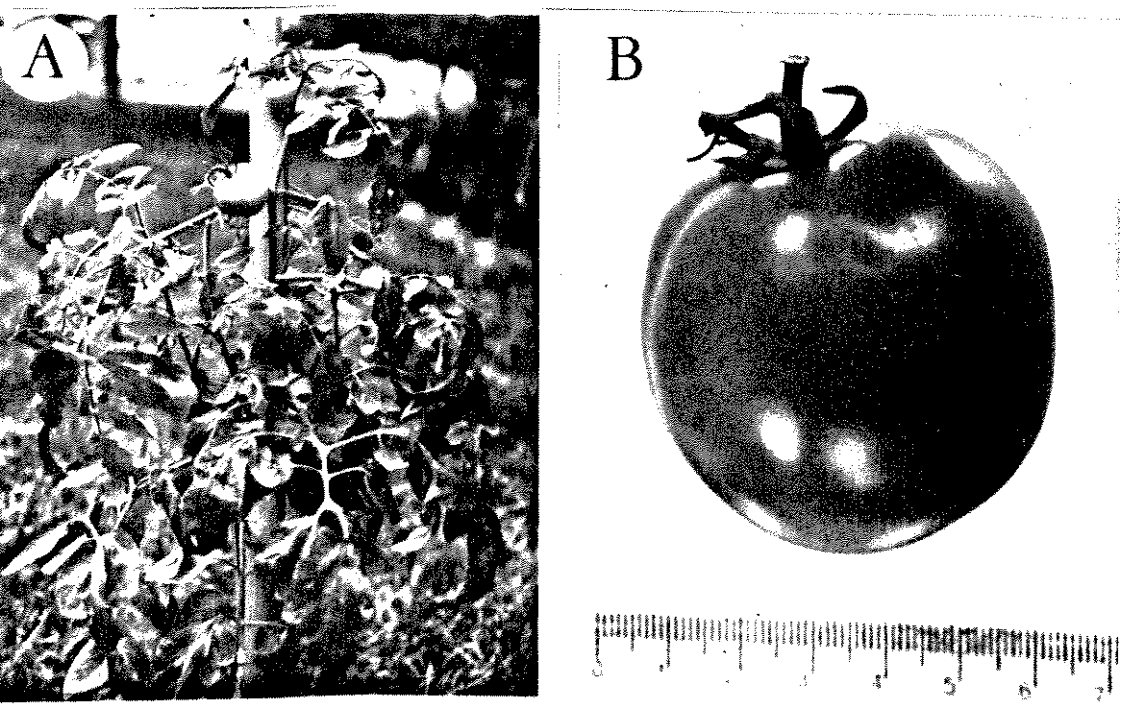
Planta R_1(B_3)

	30/10/84
discos e folíolos com filtrados comprovadamente tóxicos de diferentes concentrações	06/12/84
	11/12/84

FIGURA 61 - Aspecto da planta regenerada em meio sintético sem inoculação do fungo (75% v/v) - 3º experimento

A) Aspecto geral da planta no campo (A-3/II-4/05a). Esta planta é resultado de regeneração em presença de 75% v/v do meio Czapek-Dox sem inoculação do fungo e de AIA 25 µM e 6-BA 10 µM. Estádio de regeneração = 4.

B) Aspecto do fruto "Red" (eixo maior = 5,1 mm e eixo menor = 4,1 mm) com índice de forma = 1,24. Documentação fotográfica em 15/02/84. Plantas provindas das sementes deste fruto foram testadas para resistência in vitro (sigla das plantas R_1= C_3).



HISTÓRICO DA PLANTA R_0(A-3/II-4/05a)

Material Vegetal - Joaquim original

. Germinação 24/11/82

. Cultivo de submeristema 16/12/82

. Explante (folha definitiva) em meio padrão 25/01/83

. Pré-seleção (75% do meio Czapek-Dox sem inoculação do fungo : 25% do MS diluído 1/4 - Experimento nº3) 09/03/83

. Retirada da plantlete 04/08/83

Estádio da plantlete = 4

Fenótipo das folhas = inteiro
Plantlete pequena

. Aclimatação 03/11/83

. Plantas no solo 16/11/83

. Documentação fotográfica da planta com frutos 15/02/84

HISTÓRICO DE PLANTA R_1 (C_3)

. Germinação 09/10/84

. Testes de Resistência in vivo

Folíolos 06/12/84

discos
- 1ª montagem 21/11/84
- 2ª montagem 06/12/84

5.2. Testes de resistência/suscetibilidade realizados 2a. geração (R_1) de plantas regeneradas através da utilização das técnicas de cultura de tecidos com o emprego de cultura do fungo como pressão de seleção.

As plantas da geração R_1 foram testadas com filtrado de cultura, comprovadamente fitotóxico, utilizado em várias concentrações C, (100% - não diluído, também empregado em testes com plantas R_0 - ver item 5.1.; e diluído nas concentrações de 75;50; 25 % v/v). Foi utilizado, nas plantas R_1, 2 períodos de crescimento do fungo em meio de Czapek-Dox (P $\leq$ 30 e 45 dias).

Foram realizados 3 tipos de ensaios biológicos: teste de discos foliares, de folíolos e de germinação. A avaliação destes testes, leitura (L) foi feita após 3 e 5 dias, no caso dos testes de discos e folíolos, e após 7 dias, no teste de germinação e crescimento de plântulas, da montagem dos testes. Foram feitas 3 montagens para o teste de discos em: 30/10/1984; 06/12/1984 e 11/12/1984; 1 montagem para o teste de folíolos em 06/12/1984, simultânea ao teste de discos e 1 montagem para o teste de germinação em 29/11/1984.

Antes, porém, de falarmos sobre os testes de resistência/suscetibilidade em plantas regeneradas, falaremos como estes testes se comportam em plantas S (originadas de sementes). O comportamento dos 3 tipos de testes biológicos mencionados acrescido do teste de fluxo de transpiração (estacas) em plantas S (cultivares Ângela e Petomech) é mostrado na FIGURA 62 , em relação a filtrados de fungos obtidos após 45 dias de incubação em meio de Czapek-Dox. Por esta figura observa-se, de modo geral, em todos os testes linearidade entre a concentração do filtrado empregado e a sintomatologia observada nos 3 sistemas biológicos empregados: fluxo de transpiração (FIGURA 62A - Método de estacas); sintoma de necrose (FIGURAS 62A e B- Metodo de folíolos e discos) e crescimento de plântulas (FIGURA 62D), pois, a presença do fil-

trado não afetou a germinação, em si.

Os processos biológicos de fluxo de transpiração e crescimento de plântulas são processos complexos que respondem a uma infinidade de substâncias, assim, no presente trabalho, preferimos nos ater a testes biológicos de ação mais restrita, como o de folíolos e discos, cuja avaliação foi feita em relação a um sintoma mais específico, necrose, sintoma que parece estar mais relacionado com a produção de metabólitos produzidos pelo filtrado de cultura de *A. solani* e patogenicidade (ver DISCUSSÃO GERAL - item 3). Nestes testes, a severidade da toxicidade foi feita como severidade da doença pela proporção do tecido foliar danificado.

Em relação ao efeito da concentração empregada do filtrado nos testes citados em plantas S, verificou-se que tanto no teste de folíolos como no teste de discos, a concentração de 25% v/v do filtrado não foi efetiva. Resultado semelhante da concentração de 25% v/v foi obtida em crescimento de plântulas, tanto para o comprimento do hipocótilo como para o comprimento da radícula, não se observando diferença significativa entre os comprimentos, para ambos os órgãos, de plântulas crescidas no controle (0%, apenas o meio Czapek-Dox da cultura do fungo, não metabolizado) e na concentração de 25% v/v do filtrado. Já no teste de fluxo de transpiração, as estacas de tomateiro responderam a concentrações mais baixas do filtrado, à metade da concentração anteriormente citada (12,5%). Assim, no teste de fluxo de transpiração a concentração de 12,5% v/v apresentou efeito fitotóxico. Estes resultados, em plantas S, sugerem que o método todo de estacas, provavelmente, está respondendo a um complexo de fatores.

Os resultados dos testes de folíolos e discos (FIGURA 62A e FIGURA 62B), em plantas S, foram, em linhas gerais semelhantes, já que basicamente são iguais, diferindo apenas que no teste de discos há uma precisão maior de metodologia, pois, as

áreas testadas, no teste dos discos foliares, são padronizadas. Esta maior precisão da metodologia, talvez, explique os resultados melhores delineados no teste dos discos (FIGURA 62C), no qual se observa diferenças de efeito de concentração e principalmente de resistência/suscetibilidade do cultivar empregado, pois, o material submetido a pressão de seleção no presente trabalho, em larga escala, ("Petomech") foi mais suscetível que o material de mesa "Ângela".

O teste de discos foliares foi, por nós escolhido, no presente trabalho, como padrão para testes de resistência/suscetibilidades em plantas regeneradas da geração R_1, embora, tenham sido realizados, igualmente, os outros testes de resistência/suscetibilidade mencionados. No entanto, os resultados dos testes de folíolos e de germinação confirmaram os resultados dos testes dos discos, e por isso, apenas os resultados dos testes dos discos serão apresentados.

Foram feitas 3 montagens do teste de discos de folhas com as plantas descritas na TABELA 48: isto foi feito para se verificar a real incorporação ao genótipo da planta da característica desejável, resistência a(s) toxina(s) do patógeno, característica esta originada de pressão de seleção *in vitro*.

No presente trabalho discutiremos os resultados da 1º montagem (FIGURAS 63-72), pois, as demais montagens confirmaram estatísticamente os resultados da 1a. montagem. Nas 2a. e 3a. montagens, utilizaram-se além das plantas obtidas por pressão de seleção, plantas R obtidas por variação somaclonal. Os resultados das 2a. e 3a. montagens, em relação a estas plantas foram coincidentes. Os resultados da 2a. e 3a. montagens serão discutidos, em têrmos de procedencia do material vegetal R_1, com base nos contrastes de médias significativas, reveladas pelo teste estatístico de SCHEFFÉ (ver (MÉTODOS - item 6).

TABELA 48 - Esquema das plantas testadas (origem, tratamento e método utilizado) para resistência in vivo com filtrado de cultura de *A. solani*.

Plantas Obtidas	Planta R_o Sigla	Planta R_o Teste in vivo	Planta R_1 Sigla	Planta R_1 Teste in vivo
A. in vitro				
COM PRÉ-SELEÇÃO	A.		B	
1. com filtrado do fungo	(*Alternaria*)			
cultivado em meio sin	A/2A/10	estacas	B_1	discos
tético	A-2(IIa/05a	"	B_3	discos e folíolos
			C	
2. meio sólido sem inocu	A-3/II4/03c	"	C_1	discos
lação do fungo - con-	A-3/II4/03b	"	C_2	discos
trole	A-3/II4/05a	"	C_3	discos e folíolos
SEM PRÉ-SELEÇÃO	Si		D	
cultivo in vitro sem	Si-70/F/13	"	D_1	discos
pressão de seleção(va	Si-70/F/22	"	D_2	-
riação somaclonal)	Si-71/F/48b	"	D_3	-
	Si-77/C/63	"	D_4	-
	Si-84/F/12	"	D_5	-
	Si-84/F/18b	"	D_6	-
	Si-92/C/5a	"	D_7	-
	Si-92-3/C/18a	"	D_8	-
	SI-92-1/H/12a	"	D_9	-
	Si-119-2/C/1a	"	D_{10}	-
	S-119-2/C/49a	"	D_{11}	discos
	Si-119-2/C/53c	"	D_{12}	-
	Si-119-2/C/58a	"	D_{13}	-
	Si-119-2/C/62a	"	D_{14}	-
	Si-119-2/C/64a	"	D_{15}	-
	Si-119-2/C/68c	"	D_{16}	-
	Si-95/H/06a	"	D_{17}	-
	Si-119-2/H/1b	"	D_{18}	discos

B. Sementes (sem interferência da técnica de cultura de tecidos)	Plantas S Teste in vivo
cv. Ângela	estacas, folíolos e discos
cv. Petomech	estacas, folíolos e discos

Observação: As características das plantas R_1 (D_{14} e D_{15}) estão descritas no ítem de produção de plantas (ver TABELA 38).

FIGURA 62 - Efeito da concentração do filtrado de cultura de *A. solani* em 3 testes biológicos. Período de permanência do fungo em meio líquido sintético: 45 dias.

FLUXO DE TRANSPIRAÇÃO

a) Teste de estacas. Curva-padrão obtida com utilização de estacas do cv. Ângela, e avaliação após 24 horas de permanência das estacas nos filtrados correspondentes. Por este teste, foi analisada a resistência *in vivo* das plantas R_0 obtidas de cultura de tecidos.

CONTATO COM O LIMBO FOLIAR (pincelamento dos filtrados na superfície inferior do limbo)

Curvas-padrões obtidas com os cultivares Ângela e Petomech , após 5 dias de contato permenente com os filtrados a partir de:

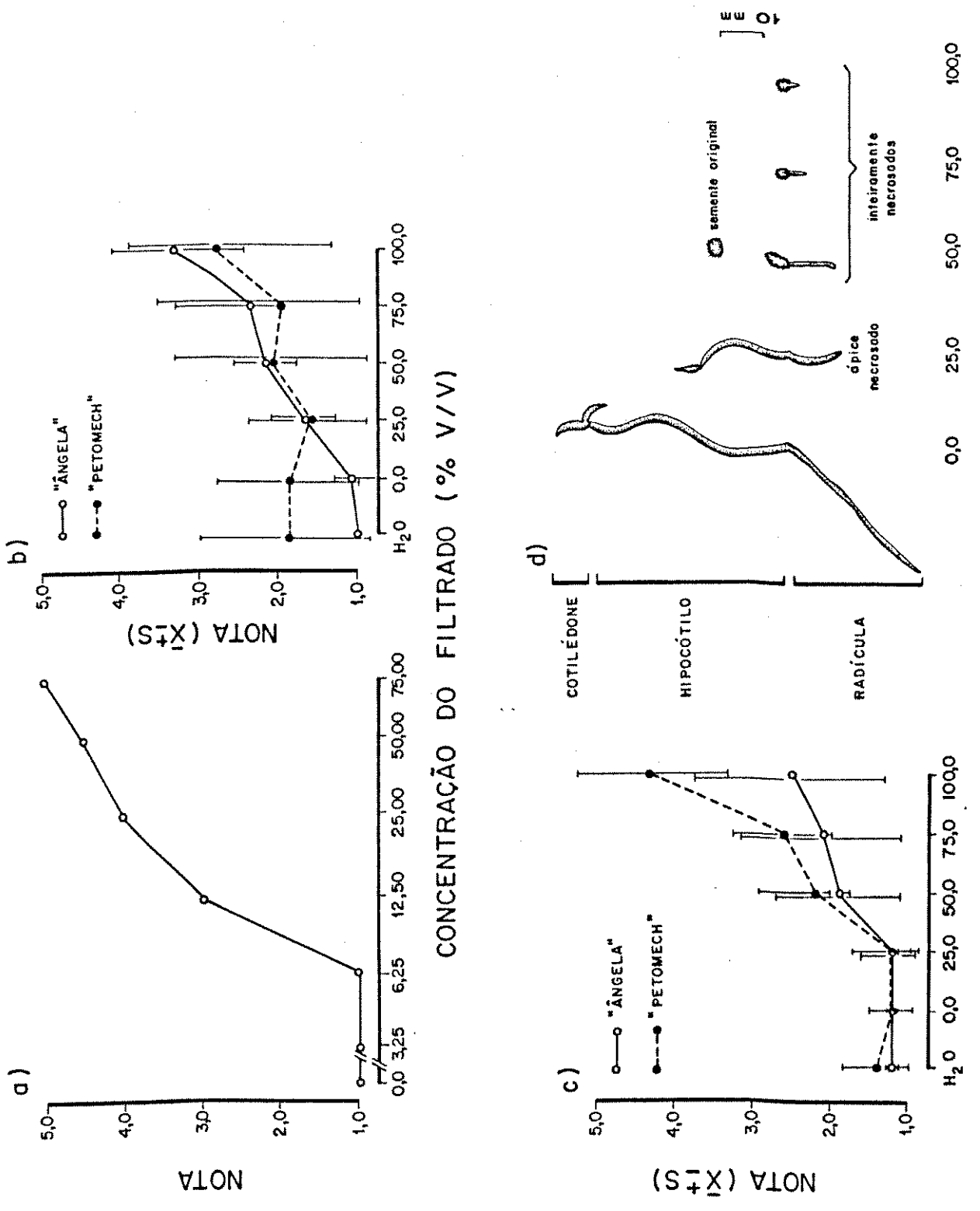
b) folíolos intactos (Teste de folíolos)

c) discos de folhas (Teste de discos)

Ambos os testes foram usados para se analisar a resitência *in vivo* de plantas R_1 obtidas de cultura de tecidos.

d) Teste de germinação e crescimento de plântulas.

FIGURA 62


a)
b)
c)
d)
NOTA
NOTA (X̄ ± S)
"ÂNGELA"
"PETOMECH"
CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (% V/V)
H2O
0,0
3,25
6,25
12,50
25,00
50,00
75,00
25,0
50,0
75,0
100,0
1,0
2,0
3,0
4,0
5,0
COTILÉDONE
HIPOCÓTILO
RADÍCULA
semente original
ápice necrosado
inteiramente necrosados
1 cm

FIGURAS 63 a 72 - TESTES DE RESISTÊNCIA/SUSCETIBILIDADE AO FILTRADO DE CULTURA DE *A SOLANI* REALIZADOS EM PLANTAS R_1. Testes realizados pelo método de discos. Análise estatística (teste F e intervalos de confiança ao nível de 95%) dos dados referentes a 1a. montagem realizada em 30/10/1984.

LEGENDA

Material vegetal (ver TABELA 48)

S = plantas obtidas de sementes

B, C = plantas R (pressão de seleção)

B = em presença do filtrado de cultura do fungo cultivado em meio sintético (Czapek-Dox)

B_1 = A/2A/10 (geração R_0)

B_3 = A-2/IIa)05a (geração R_0) - ver histórico e FIGURA 60.

C = plantas controle (meio de Czapek-Dox sem inoculação do fungo)

C_1 = A-3/II4/03c (geração R_0

C_3 = A-3/II4/05a (geração R_0 - ver histórico e FIGURA 61

Nível de significância do teste F
(quando não indicado na própria figura)

NS = Não Significativo

S* = Significativo $p \leq 0,05$

S**= Significativo $p \leq 0,01$

S***=Significativo $p \leq 0,005$

S****Significativo $p \leq 0,001$

FIGURAS 63 a 67 - Analise estatística a 1 critério

FIGURAS 68 a 72 - Análise estatística a 2 critérios

1º MONTAGEM - CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (C)

Leitura do teste após 3 dias. Período de permanência do fungo em meio líquido = 30 dias. Análise de variância a 1 critério.

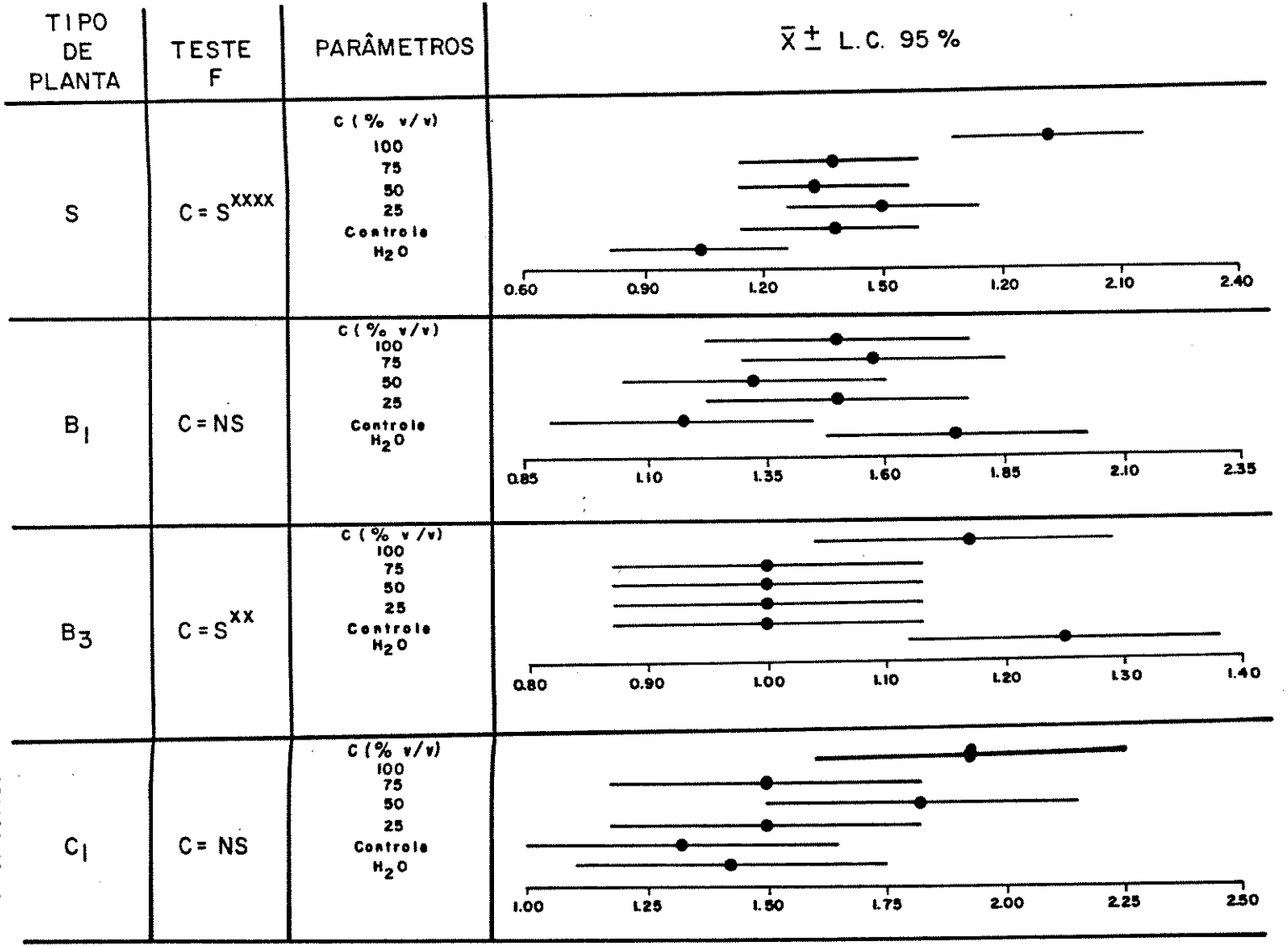
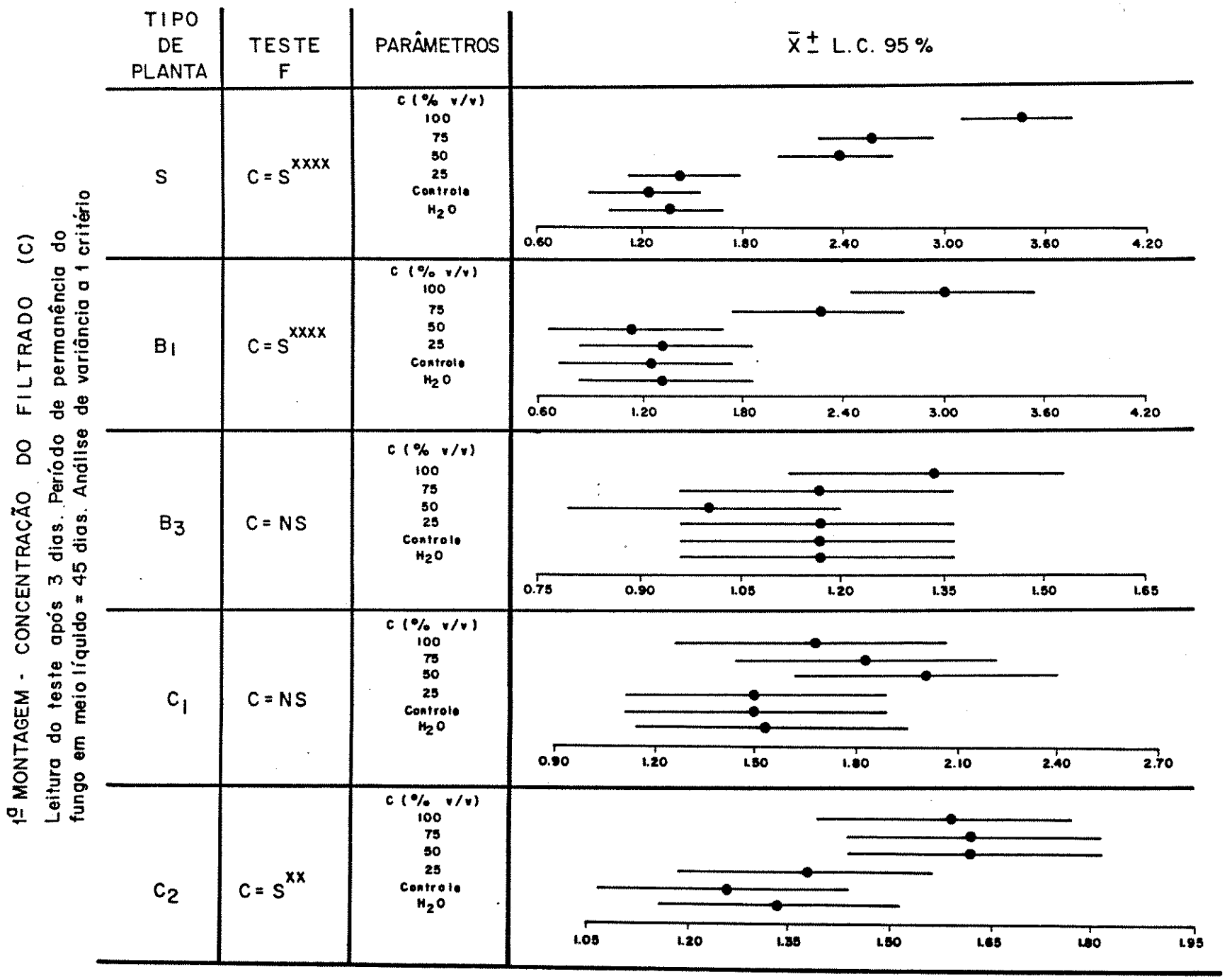


FIGURA 64

1ª MONTAGEM - CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (C)

Leitura do teste após 5 dias. Período de permanência do fungo = 30 dias. Análise de variância a 1 critério.

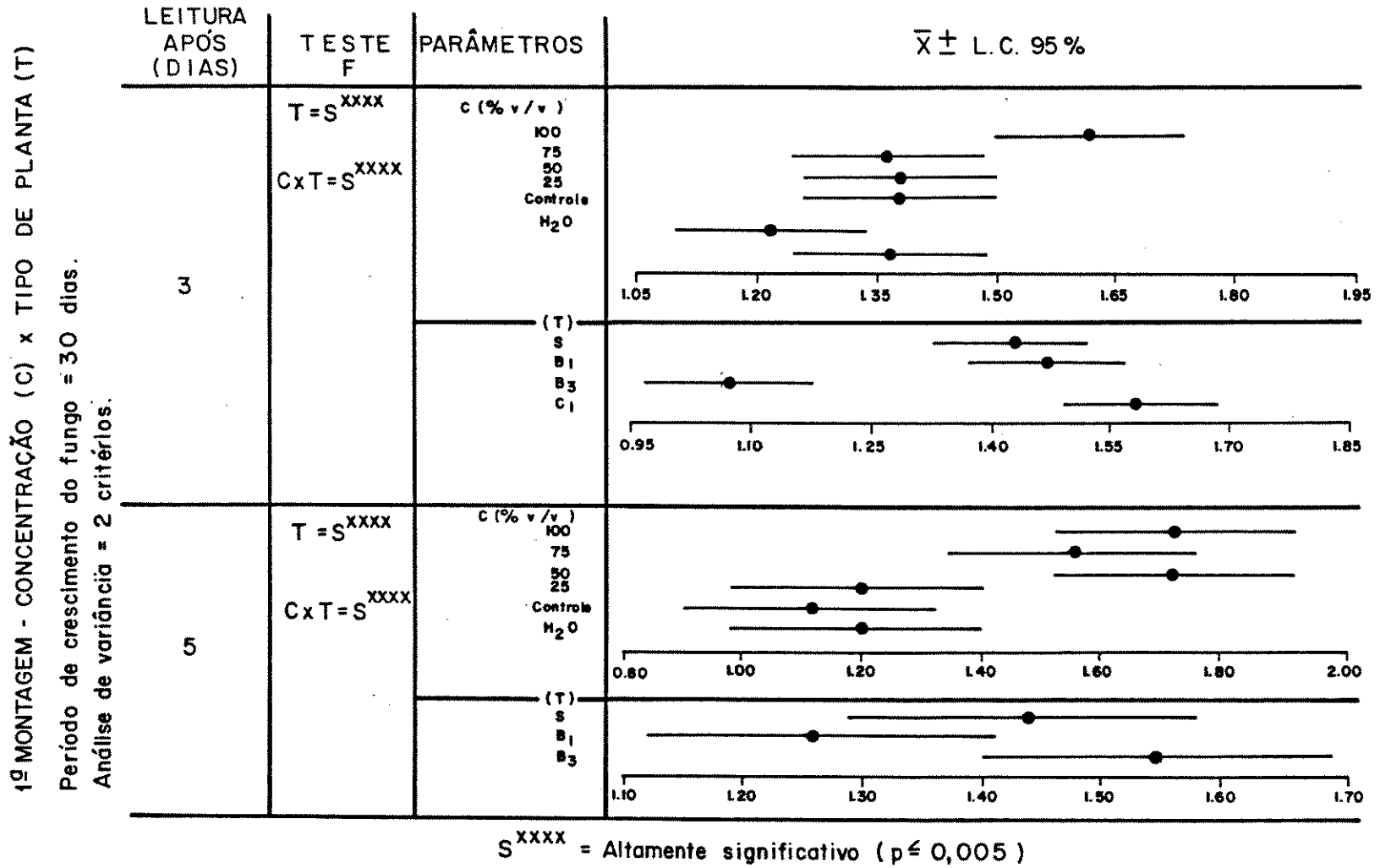
FIGURA 65


1ª MONTAGEM - CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (C)
Leitura do teste após 3 dias. Período de permanência do fungo em meio líquido = 45 dias. Análise de variância a 1 critério
TIPO DE PLANTA
TESTE F
PARÂMETROS
$\bar{X} \pm$ L.C. 95 %
S
$C = S^{XXXX}$
B1
$C = S^{XXXX}$
B3
C = NS
C1
C = NS
C2
$C = S^{XX}$
C (% v/v)
100
75
50
25
Controle
H_2O
0.60 1.20 1.80 2.40 3.00 3.60 4.20
0.75 0.90 1.05 1.20 1.35 1.50 1.65
0.90 1.20 1.50 1.80 2.10 2.40 2.70
1.05 1.20 1.35 1.50 1.65 1.80 1.95

1º MONTAGEM - CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (C)
Leitura do teste após 5 dias. Período de permanência do fungo = 45 dias. Análise de variância a 1 critério.

TIPO DE PLANTA	TESTE F	PARÂMETROS	$\bar{X} \pm$ L. C. 95 %
S	$C = S^{XXXX}$	C (% v/v) 100 75 50 25 Controle H_2O	0.70 1.40 2.10 2.80 3.50 4.20 4.90
B_1	$C = S^{XXX}$	C (% v/v) 100 75 50 25 Controle H_2O	0.60 1.20 1.80 2.40 3.00 3.60 4.20
B_3	$C = S^{XX}$	C (% v/v) 100 75 50 25 Controle H_2O	0.00 0.50 1.00 1.50 2.00 2.50 3.00
C_1	$C = S^{XXXX}$	C (% v/v) 100 75 50 25 Controle H_2O	0.00 0.70 1.40 2.10 2.80 3.50 4.20
C_2	$C = S^{XXX}$	C (% v/v) 100 75 50 25 Controle H_2O	1.35 1.44 1.53 1.62 1.71 1.80 1.89

FIGURA 67


1º MONTAGEM - CONCENTRAÇÃO (C) x TIPO DE PLANTA (T)
Período de crescimento do fungo = 30 dias.
Análise de variância = 2 critérios.
LEITURA APÓS (DIAS)
TESTE F
PARÂMETROS
X̄ ± L.C. 95 %
3
T = S XXXX
C x T = S XXXX
C (% v/v)
100
75
50
25
Controle
H2O
1.05 1.20 1.35 1.50 1.65 1.80 1.95
(T)
S
B1
B3
C1
0.95 1.10 1.25 1.40 1.55 1.70 1.85
5
T = S XXXX
C x T = S XXXX
C (% v/v)
100
75
50
25
Controle
H2O
0.80 1.00 1.20 1.40 1.60 1.80 2.00
(T)
S
B1
B3
1.10 1.20 1.30 1.40 1.50 1.60 1.70
S XXXX = Altamente significativo (p ≤ 0,005)

1º MONTAGEM - CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO DO FUNGO (C) x LEITURA DO TESTE (L)
Período de crescimento do fungo em meio líquido = 30 dias.
Análise de variância = 2 critérios.

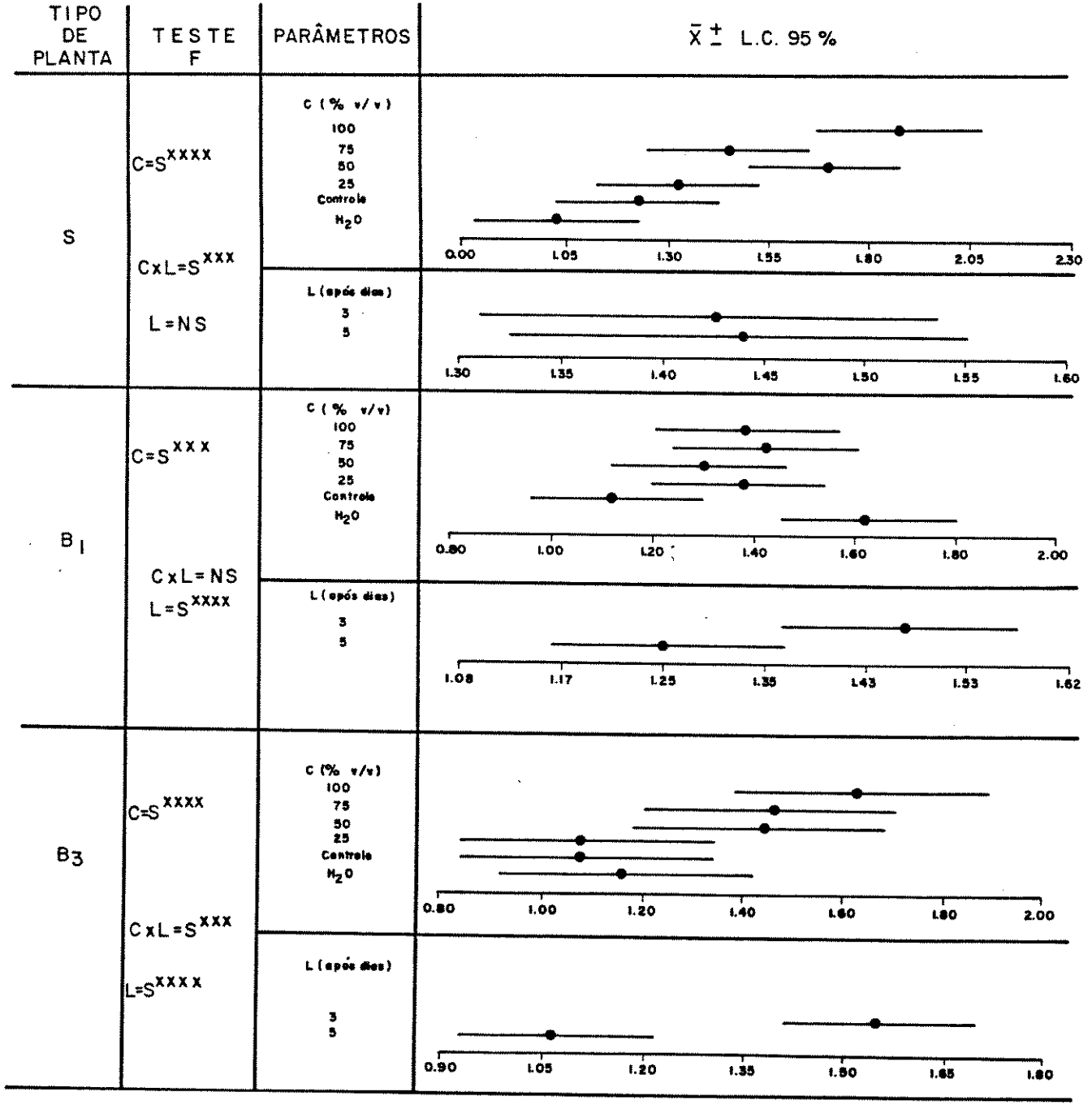


FIGURA 69

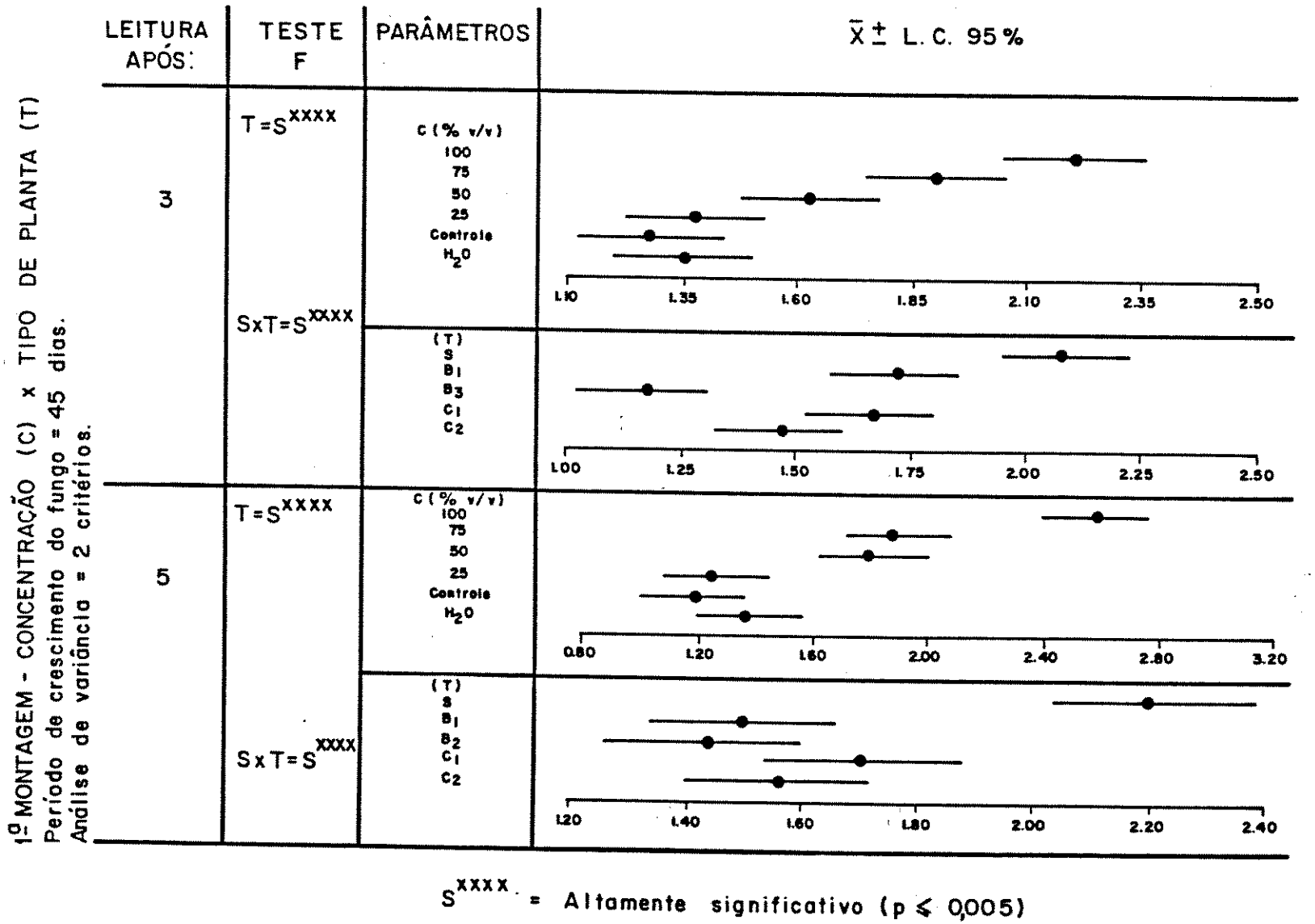
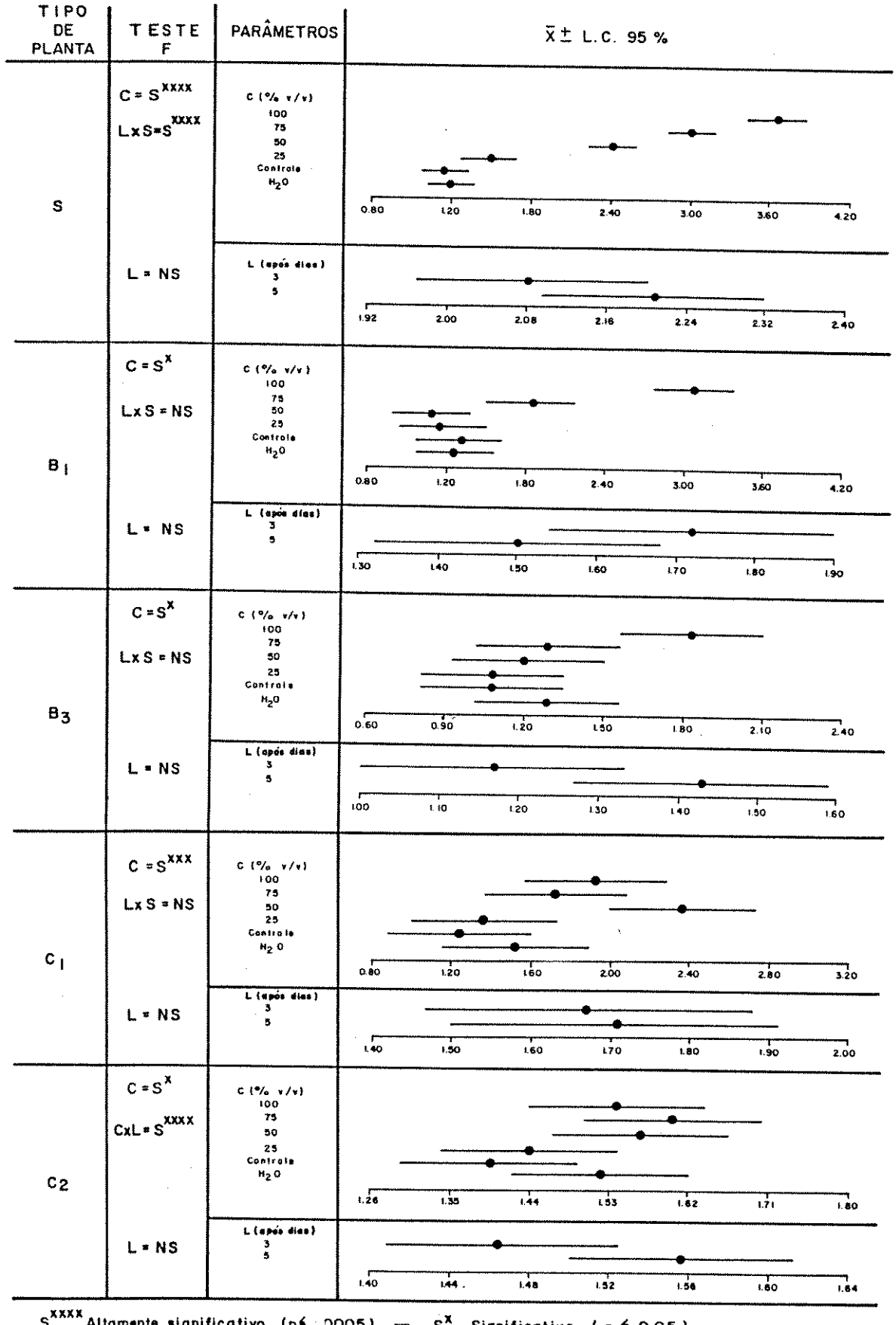

1º MONTAGEM - CONCENTRAÇÃO (C) x TIPO DE PLANTA (T)
Período de crescimento do fungo = 45 dias.
Análise de variância = 2 critérios.
LEITURA APÓS:
TESTE F
PARÂMETROS
X̄ ± L. C. 95 %
3
T = S XXXX
C (% v/v)
100
75
50
25
Controle
H2O
1.10 1.35 1.60 1.85 2.10 2.35 2.50
S x T = S XXXX
(T)
S
B1
B3
C1
C2
1.00 1.25 1.50 1.75 2.00 2.25 2.50
5
T = S XXXX
C (% v/v)
100
75
50
25
Controle
H2O
0.80 1.20 1.60 2.00 2.40 2.80 3.20
S x T = S XXXX
(T)
S
B1
B2
C1
C2
1.20 1.40 1.60 1.80 2.00 2.20 2.40
S XXXX = Altamente significativo (p ≤ 0,005)

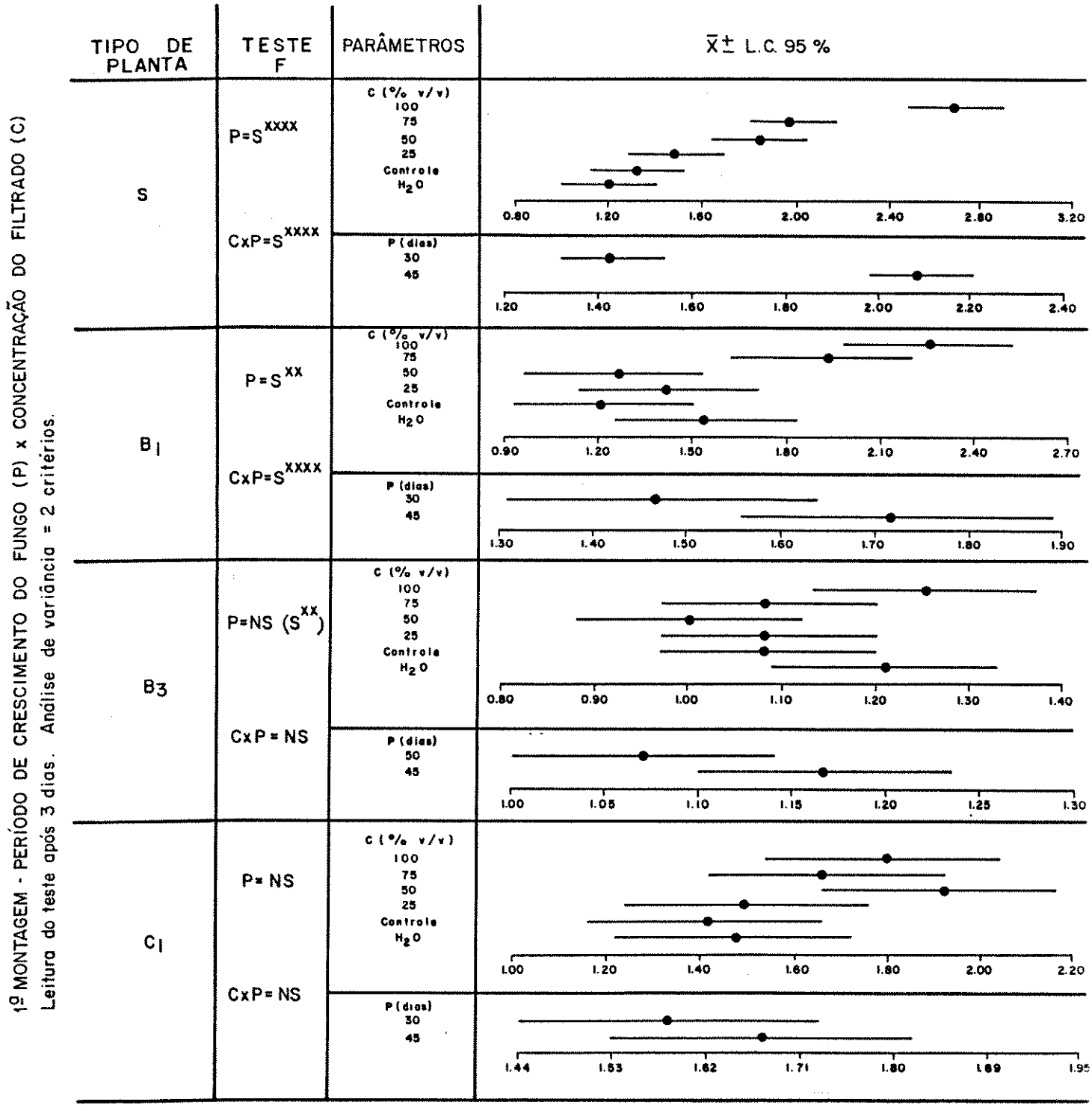
FIGURA 70



1º MONTAGEM - CONCENTRACÃO DO FILTRADO DO FUNGO (C) x LEITURA DO TESTE (L)
Período de crescimento do fungo em meio líquido = 45 dias. Análise de variância = 2 critérios.

S^{XXXX} Altamente significativo ($p \leq 0.005$) — S^{X} Significativo ($p \leq 0.05$)
S^{XX} Significativo ($p \leq 0.025$) — S^{XXX} Altamente significativo ($p \leq 0.01$)

FIGURA 71


1º MONTAGEM - PERÍODO DE CRESCIMENTO DO FUNGO (P) x CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (C)
Leitura do teste após 3 dias. Análise de variância = 2 critérios.
TIPO DE PLANTA
TESTE F
PARÂMETROS
X̄ ± L.C. 95 %
S
P=S^XXXX
CxP=S^XXXX
B1
P=S^XX
CxP=S^XXXX
B3
P=NS (S^XX)
CxP = NS
C1
P= NS
CxP= NS
C (% v/v)
100
75
50
25
Controle
H2O
P (dias)
30
45
0.80 1.20 1.60 2.00 2.40 2.80 3.20
1.20 1.40 1.60 1.80 2.00 2.20 2.40
0.90 1.20 1.50 1.80 2.10 2.40 2.70
1.30 1.40 1.50 1.60 1.70 1.80 1.90
0.80 0.90 1.00 1.10 1.20 1.30 1.40
1.00 1.05 1.10 1.15 1.20 1.25 1.30
1.00 1.20 1.40 1.60 1.80 2.00 2.20
1.44 1.53 1.62 1.71 1.80 1.89 1.95

1º MONTAGEM - PERÍODO DE CRESCIMENTO DO FUNGO (P) x CONCENTRAÇÃO DO FILTRADO (C)

Leitura do teste após 5 dias. Análise de variância = 2 critérios.

TIPO DA PLANTA	TESTE F	PARÂMETROS	$\bar{X} \pm$ L.C. 95 %
S	$P = S^{XXXX}$	C (% v/v) 100 75 50 25 Controle	0.50 1.00 1.50 2.00 2.50 3.00 3.50
	$P \times C = S^{XXX}$	P (dias) 30 45	1.20 1.40 1.60 1.80 2.00 2.20 2.40
B_1	$P = S^{XXXX}$	C (% v/v) 100 75 50 25 Controle H_2O	0.90 1.20 1.50 1.80 2.10 2.40 2.70
	$P \times C = S^{XXXX}$	P (dias) 30 45	1.10 1.20 1.30 1.40 1.50 1.60 1.70
B_3	$P = NS$	C (% v/v) 100 75 50 25 Controle H_2O	0.40 0.80 1.20 1.60 2.00 2.40 2.80
	$P \times C = NS$	P (dias) 30 45	1.20 1.30 1.40 1.50 1.60 1.70 1.80

Os resultados dos testes de resistência/susceptibilidade realizados na 1a. montagem, usando o teste de discos foliares, são mostrados em relação aos resultados das análises de variância efetuadas e dos intervalos de confiança 95% calculados. Estes resultados estão apresentados nas FIGURAS 63 a 72. As análises de variância foram feitas a 1 critério (FIGURAS 63 a 67) e a 2 critérios (FIGURAS 68 a 72).

Quanto ao filtrado de cultura correspondente ao período de crescimento de 30 dias, a leitura do teste após 3 dias mostra que praticamente apenas a planta B3 discrimina resposta à concentração (nível de significância de 5%, FIGURA 63). Este efeito do filtrado de cultura de 30 dias de idade se manteve na leitura de 5 dias (FIGURA 64), mas após 5 dias, a planta B3 teve uma resposta relativamente menor. Com o filtrado de 30 dias, a planta obtida de semente (S), no caso, Petomech, teve resposta significativa em relação à concentração do filtrado, devida à concentração de 100% na leitura de 3 dias (FIGURA 63). Já na leitura de 5 dias, a planta S foi estatisticamente afetada pela concentração do filtrado (efeito altamente significativo - nível de 0.1%), enquanto que ambas as plantas provindas de cultura de tecidos, com pressão de seleção, B1 e B3 mostraram-se ser mais resistentes à presença do filtrado de 30 dias de idade.

Em relação ao filtrado correspondente ao período de crescimento em meio líquido de Czapek-Dox de 45 dias, as plantas provindas de sementes (S) mostraram susceptibilidade a concentrações maiores que 25% v/v, susceptibilidade esta que teve aumento linear com o aumento da concentração. É interessante notar que com o filtrado correspondente ao período de 45 dias de idade, na leitura de 3 dias (FIGURA 65), as plantas regeneradas em pressão de seleção com o filtrado de cultura *in vitro* apresentaram efeito oposto ao observado com o período de crescimento do fungo de 30 dias, quando (FIGURA 63) a planta B3 apresentou resposta à concentração do filtrado e a planta B1 praticamente se mostrou resistente, não apresentando resposta à concentração do filtrado.

Os testes de discos de folhas com o filtrado correspondente ao período de 45 dias de crescimento do fungo apresentaram respostas mais discriminatórias, em relação à concentração, após o período de leitura de 5 dias (FIGURA 66). Por esta figura, observa-se que as plantas provindas de sementes apresentaram resposta linear à concentração, mostrando ser o material original utilizado no programa de utilização das técnicas de cultura de tecidos com pressão de seleção, material vegetal suscetível ao filtrado de cultura de *A. solani*, o agente causal da doença da Pinta-preta. Quanto às demais plantas testadas, estas serão discutidas quando falarmos das análises estatísticas a 2 critérios (FIGURAS 67 a 72).

1) Em relação à interação da concentração do filtrado x tipo de planta, com o filtrado do fungo obtido após o período de crescimento em meio líquido de 30 dias , esta foi significativa ($p < 0.05$) sendo que esta interação significativa se deveu ao tipo de planta, critério que foi altamente significativo, pois, a planta B3 se destacou das demais, mostrando maior resistência (FIGURA 67);

2) Os dias de leitura, após a montagem do teste de discos foliares, afetaram significativamente os resultados das plantas S, embora não tenham afetado os resultados com as plantas B1 e B3. Já a concentração do filtrado de cultura do fungo empregada afetou significativamente o resultado do teste de discos para todas as plantas testadas (FIGURA 68);

3) Com a leitura do teste dos discos foliares após 3 dias da montagem, com a utilização do filtrado do fungo crescido por um período de 45 dias em meio líquido, observou-se a interação altamente significativa entre o tipo de planta e a concentração do filtrado empregada. As plantas S foram as mais suscetíveis de todas as plantas testa

das, evidenciando, assim, que no presente trabalho , a utilização de técnicas de cultura de tecidos como pré-seleção realmente resultou em melhor resistência da planta ao filtrado de cultura do patógeno. Mas, não foi apenas a técnica de cultura de tecidos em si que afetou esta resistência, pois, a presença do filtrado de cultura no meio seletivo resultou em uma planta que, no teste de resistência empregado, apresentou maior resistência ao filtrado de cultura do fungo, filtrado este que contém a(s) toxina(s), liberada(s) pelo fungo, responsável(is) pela patogênese. A planta B3, no teste de resistência dos discos, la. montagem, se destacou das demais, evidenciando que a pré-seleção *in vitro* resultou em maior resistência *in vivo*. É interessante notar que, com a leitura de 5 dias, esta resistência da planta B3, nos teste dos discos foliares, não é tão evidente como na leitura de 3 dias. A utilização da técnica de cultura de tecidos favoreceu o aparecimento de determinado tipo de planta que apresentou maior resistência no teste de resistência/susceptibilidade ao filtrado de cultura de *A. solani*, o agente causal da doença Pinta-preta (FIGURA 69);

4) Para o filtrado de cultura obtido após crescimento do fungo em meio líquido por 45 dias, a leitura do teste não afetou significativamente o resultado. Para nenhuma das plantas testadas, os dias (3 e 5) considerados após a montagem do teste, afetaram significativamente o resultado, embora, para algumas plantas a leitura interagiu significativamente com a concentração (planta C2 e planta S). O tipo de planta influenciou o resultado, tanto em relação à leitura como à concentração. Para a planta B1, o efeito de concentração no teste dos discos foi significativo, sem qualquer interação com a leitura. O efeito de concentração foi significativo para a planta B3 , mas neste caso, a leitura interagiu significativamente com a concentração. Para as plantas C2, em particular , que apresentam rápida degeneração neste teste de disco foliar, períodos de permanência dos discos, mais longos

que 3 dias, danificaram o material vegetal, independente da concentração do filtrado empregada. Este efeito se refletiu no nível de significância da leitura e, principalmente, na interação C x L. Nesta planta, então, o efeito na verdade não é da concentração do filtrado de cultura testada, mas, sim, do próprio material vegetal testado.

5) Na leitura do teste após 3 dias, em relação ao período de crescimento do fungo (30 e 45 dias de idade), verificou-se que o período de crescimento afetou significativamente o teste de resistência/susceptibilidade, ou seja, o filtrado de cultura de 45 dias teve efeito estatisticamente diferente do filtrado de cultura de 30 dias, confirmando a idéia de que o fungo, durante o período de crescimento em meio líquido Czapek-Dox metaboliza e libera substâncias com atividade diferenciada: no 1º período (até por volta de 30 dias), as substâncias liberadas atuariam predominantemente produzindo o sintoma de murcha e sintomas associados, como epinastia, e, no 2º período seria liberadas substâncias que produziriam predominantemente o sintoma de necrose. A interação de concentração com o período de crescimento do fungo foi altamente significativo, mostrando que não só o período de crescimento do filtrado de cultura utilizado influenciou o resultado. Este fato é particularmente evidente para a planta S provinda de semente, que foi a mais suscetível das plantas testadas e que apresentou maior suscetibilidade com o filtrado de 45 dias de idade, e em graus de suscetibilidade decrescentes, com o decréscimo da concentração do filtrado empregada: 100%, 75% e 50% v/v. Para a planta B1 a interação é significativamente alta ($p < 0.001$), embora, o período de crescimento do fungo não tenha tido diferença tão marcante, pois o nível de significância das diferenças entre os períodos de crescimento foi de 2,5% (FIGURA 71);

6) Quanto ao efeito do período de crescimento do fungo (P) e concentração do filtrado (C) empregados no teste dos discos foliares, observa-se que, tanto a planta S, como a planta B1, se mostraram suscetíveis à concentração do filtrado. Para a planta provinda de semente, observa-se nitidamente como o período de crescimento do fungo de 45 dias resultou, nos testes de discos, em indução do sintoma de necrose. Pelos gráficos, observa-se que na planta B1 o efeito de concentração deve-se fundamentalmente, à resposta à concentração de 100%, assim, a planta B1 não apresentou resposta de suscetibilidade em concentrações mais baixas. Para a planta B3, nem o período de crescimento do fungo, nem a interação deste período com a concentração afetaram estatisticamente os resultados observados (FIGURA 72).

Para confirmação da resistência da planta B3 nos testes de discos, é necessário observar-se os contrastes das médias dos tratamentos significativos. Isto foi realizado pelo teste estatístico de SCHEFFÉ na 2a. e 3a. montagens, que empregaram, além das plantas regeneradas em pressão de seleção, plantas obtidas por variação somaclonal.

Na 2a. montagem com o teste de discos, os contrastes das médias de testes F com valores de F significativos, feitos pelo teste estatístico de SCHEFFÉ para filtrado de cultura de 45 dias de idade, revelaram que a planta S foi a mais afetada que as demais ($p < 0.001$), assim, material proveniente de semente é estatisticamente mais suscetível. Em relação às demais plantas testadas (B1, B3, C3, D1 e D18), verificou-se que:

1) B1 e B3 individualmente se diferenciaram estatisticamente das demais plantas ($p \leq 0.001$ para ambos os casos);

2) Plantas obtidas por variação somaclonal D1 e D18 não diferem estatisticamente da planta controle, C3 ($p > 0.05$);

3) Já as plantas regeneradas por pressão de seleção diferem estatisticamente de controle, como por exemplo, B3 ($p \leq 0.001$). O resultado com o material vegetal B3 foi estatisticamente diferente do obtido com as plantas provindas de sementes e da outra planta regenerada por pressão de seleção (B1). Estas diferenças foram, inclusive, altamente significativas ($p \leq 0.001$);

4) A leitura do teste (após 3 ou 4 dias) não afetou significativamente os resultados mencionados ($p > 0.05$).

Na 3a. montagem com o teste dos discos, também com o período de crescimento do fungo em meio líquido de 45 dias, mas com 3 leituras (3, 4 e 6 dias), os contrastes das médias nos testes de valores de F significativos revelaram, pelo teste de SCHEFFÉ, que:

1) A planta B3 foi mais resistente que as demais testadas ($p \leq 0.001$); esta diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0.001$) se manteve, tanto considerando as plantas obtidas de cultura de tecidos (B1 e C3) como um conjunto, como considerando as plantas provindas de sementes e de variação somaclonal, como outro conjunto;

2) quanto à outra planta regenerada sob pressão de seleção (B1), esta não foi estatisticamente diferente ($p > 0.05$) quanto à resistência das plantas provindas de semente, embora a planta originada de semente, tenha se mostrado estatisticamente a mais suscetível de todas as plantas testadas ($p \leq 0.001$);

3) a resistência/suscetibilidade estatisticamente significativa varia conforme os contrastes feitos em relação a o material vegetal empregado. Por exemplo, o material B1 que foi citado como não estatisticamente diferente d a planta S, mostrou diferença altamente significativa ($p \leq 0.001$) em relação às plantas originadas de variação somaclonal. Assim, a planta B1 foi estatisticamente mais resistente que as plantas provenientes da variação somaclonal, sendo que, o mesmo foi verdade para a planta B3, ou seja, pelo teste de discos foliares, as plantas originadas de variação somaclonal foram estatisticamente mais suscetíveis ao filtrado de cultura do fungo do que plantas regeneradas sob pressão de seleção ($p \leq 0.001$ tanto para B1 como para B3). Na verdade, plantas resultantes de variação somaclonal apresentaram, inclusive,maior suscetibilidade nos testes de discos foliares que a própria planta controle C ($p \leq 0.05$). Esta característica de suscetibilidade das plantas obtidas por variação somaclonal aconteceu estatisticamente independente do variante somaclonal testado ($p > 0.05$) ; planta com característica morfológica marcante (D1 = grande vigor na geração R_0) , ou sem característica morfológica especial na geração R_0, como ocorreu com D18.

Outro teste de resistência/suscetibilidade empregado foi o teste de germinação e crescimento de plântulas (ver FIGURA 62D). No tomateiro, observou-se estatisticamente correlação entre os órgãos radícula e hipocótilo em todos os tratamento (concentrações do filtrado). Em presença de água destilada a correlação é positiva, altamente significante ($p \leq 0.001$), ou seja, a radícula cresce e o hipocótilo também. Na concentração de 25% v/v,

as plântulas se comportam como as plântulas controle, apresentando correlação positiva, altamente significante. Já na concentração de 50% v/v do filtrado, não há correlação positiva entre radícula e hipocótilo, o que evidencia resposta diferencial destes órgãos à esta concentração do filtrado. Quanto ao órgão testado, observou-se que o hipocótilo parece ser mais sensível ao filtrado, pois, mostra melhor os efeitos de concentração. Pode-se argumentar que este fato seria talvez uma decorrência da ação sofrida pela raiz, embora, a radícula não discrimine as concentrações do filtrado. Verificou-se que o crescimento de plântulas foi influenciado pelo meio sintético de cultura do fungo Czapek-Dox, principalmente na radícula, o que não aconteceu com os outros testes de resistência utilizados: teste de estacas, teste de discos e teste de folíolos. Além disso, as diferenças de comprimento das radículas só foram significativas nas concentrações mais altas empregadas (75% e 100% v/v), mesmo em plantas originadas de sementes, plantas sabidamente suscetíveis ao filtrado de cultura. Mas, este tipo de teste apresentou resposta diferencial em relação à espécie empregada, pois, radículas de alface Grand Rapids foram estatisticamente afetadas pelas concentrações d e 50%, 75% e 100% v/v do filtrado de cultura do fungo. No caso de alface, tanto em 50% como em 100% v/v do filtrado não houve correlação significativa entre os órgãos, ou seja, hipocótilo e radícula reagiram diferencialmente à presença dos filtrados. Quando se fez a análise de variância a 2 critérios (espécie de planta x concentração do filtrado), observou-se que, tanto os critérios individuais, como a interação entre estes, é altamente significativa ($p \leq 0.005$), ou seja, conforme a espécie (tomate ou alface) a concentração do filtrado de cultura, no teste germinação e crescimento de plântulas, agiu diferentemente, mostrando que o filtrado de cultura teve um efeito mais específico, dependendo da espécie estudada, hospedeira ou não.

VI - DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

1 - Estabelecimento de metodologia para obtenção de plantas de tomate a partir de cultura de tecidos.

O estabelecimento da metodologia para a obtenção de plantas a partir de cultura de tecidos foi feita, basicamente, com material vegetal de acessões de banco de germoplasma. As várias fases envolvidas neste processo são mostradas em forma de fluxograma (Figura 73).

Quanto a fase de obtenção de explantes, na literatura,tem sido utilizadas várias fontes de explantes para iniciar o cultivo in vitro do tomateiro, tais como: folhas, internós, meristema caulenar apical, raízes, anteras e até mesmo protoplastos. Os explantes utilizados para obtenção de calos foram, predominantemente, folhas e região caulinar.O objetivo, desta primeira fase do fluxograma , foi obter-se baixa contaminação durante o cultivo in vitro.

Mas, o cultivo das plantas de tomate em condições de estufa ou campo acarreta, no entanto, muitas possibilidades de acumúlo de agentes contaminantes como poeira, esporos de fungos e bactérias acúmulo este favorecido pela presença maciça de pêlos nas folhas desta espécie. Este acúmulo de contaminantes resulta em alta contaminação do explante no cultivo in vitro, dificultando o sucesso de utilização da folha de estufa (material com o qual se obteve o primeiro resultado positivo de regeneração no tomateiro).

Para se chegar a menor contaminação possível da explante em meio de cultura 2 caminhos fora seguidos:

1) pré-incubação de folíolos obtidos de folhas adultas de plantas crescidas na estufa ou campo, incubados em câmara úmida com 12-16 horas, anterior a esterilização superficial dos folíolos (- ver Figura 6). Menores porcentagens de contaminação foram obtidas com a utilização desta técnica (Tabela 9), mas, a contaminação ainda alta deste material, aliada a condição de não apresentar facilidades de regeneração (ver Tabela 24, 25, 26 e 27 em que se observa regeneração nas 2ª e 3ª etapas de cultivo in vitro com este explante),nos levaram à procura de outro caminho.

2) obtenção de plântulas estéreis cultivadas diretamente, em condições assépticas a partir da: a) germinação de sementes esterilizadas superficialmente (Figura 4), cujo resultado foi a obtenção de 3 fontes de explante, a saber, cotilédone, hipocótilo e submeristema e b) desenvolvimento do apíce caulinar, retirado da plântula estéril proveniente da germinação de sementes, cujo resultado foi a obtenção de explantes de folha definitiva, caule e novamente submeristema (Figura 5). A utilização das plantas originadas in vitro teve uma vantagem adicional: o aumento da disponibilidade de material vegetal in vitro sem se necessitar de grande área de cultivo, nem estufa, obtendo-se, além disso, material já estéril dispensando-se, pois, o processo de esterilização superficial do explante. Mesmo com a utilização de explantes estéreis crescidos em condições assépticos houve a presença, contante, da bactéria de cancro bacteriano. Este problema foi solucionado com a utilização de banho de água quente como pré-tratamento da esterilização de sementes (Tabela 10).

Os explantes (cotilédone, hipocótilo, folha definitiva, - caule e folha adulta) não contaminados foram utilizados para a formação de calo (fase 2 do fluxograma) e regeneração de plantas em meio sólido (fase 3). Após a regeneração de novas plantas, estas foram isoladas, catalogadas e enraizadas (fase 3), aclimatadas progressivamente (fase em que ocorreram perdas) plantadas no solo, e posteriormente no campo, onde floresceram e frutificaram normalmente, produzindo sementes. Os passos para se obter frutos e consequentemente sementes de plantas provindas de submeristemas, sem regeneração, (Figura 31), são, essencialmente, os mesmos de plantas obtidas por regeneração em cultura de tecidos (Figura 32).

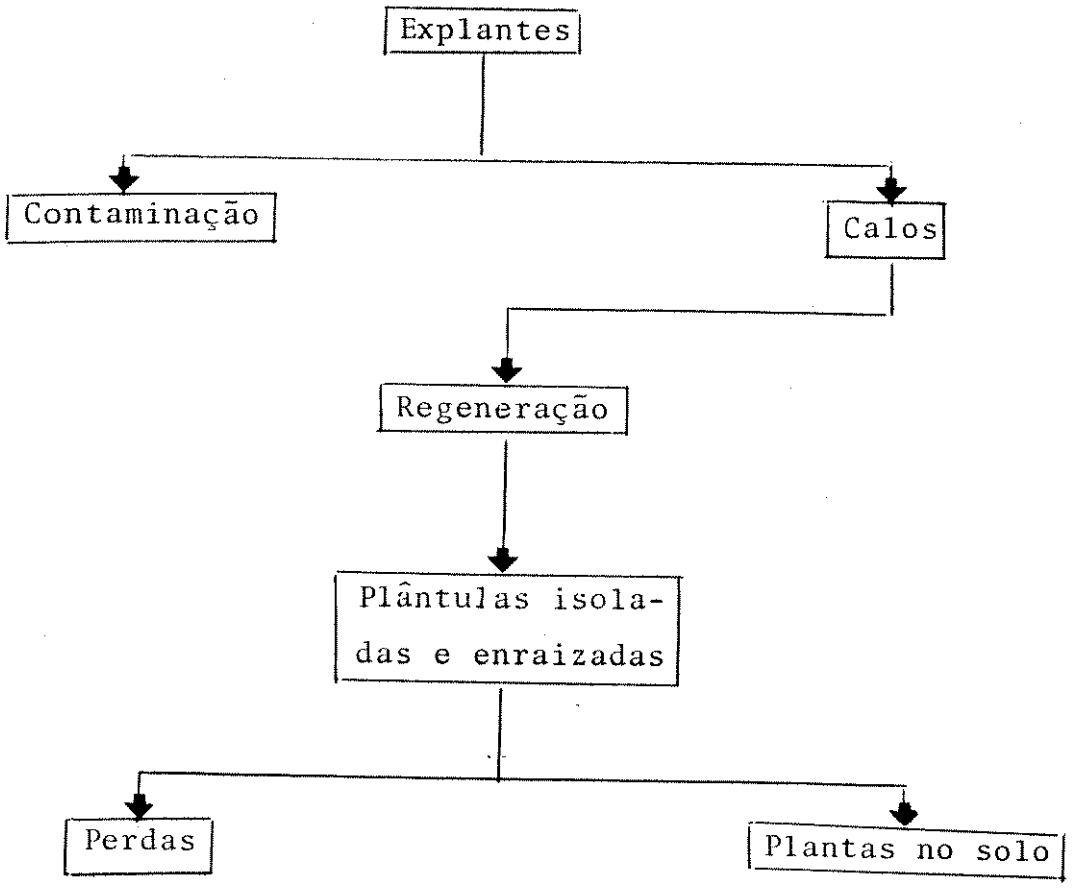


FIGURA 73 - Fluxograma das diferentes fases de cultura de tecidos de tomate com recuperação de plantas (variantes somaclonais).

Em linhas gerais, no estabelecimento da metodologia para obtenção de plantas a partir de submeristema (tecido predominantemente meristemático) observou-se que:

(1) - a composição do meio de cultura se assemelhou ao meio de cultura utilizado para obtenção de plantas de ervilha a partir de submeristema, ou seja, necessidade de pequena dosagem de reguladores de crescimento exógenos (Figura 28);

(2) - pode-se obter plantas perfeitamente desenvolvidas em tudo se assemelhando ao fenótipo da planta doadora, sem necessidade de adição extra de fitorreguladores ao meio de cultura (Figura 29). Este fato ocorreu, tanto para plantas do tomate selvagem, como para os cultivares de interesse economico. Mas, este fato, parece estar relacionado à procedência do material vegetal, pois, HOMEDAN (1982) observou que o desenvolvimento de cultura in vitro de meristemas do híbrido de tomate INRA H 63-4 necessita da presença de fitorreguladores no meio de cultura. Este autor verificou que foi necessário se adicionar essencialmente uma auxina e uma citocinina para se obter plantas completas, sendo que, a cultura de meristemas de plantas de tomate, segundo HOMEDAN (1982), não modificou na aparência o patrimônio genético;

(3) - condições de cultivo, principalmente intensidade luminosa alta e luz natural, favorecem o desenvolvimento de plantas de tomate a partir de submeristema; e

(4) - as plantinhas obtidas passam as fases de enraizamento, aclimatação, plantio no solo, chegando a produzir flores e frutos normais, dos quais podem se coletar sementes (Figura 31).

Quanto a produção de plantas provindas de regeneração a partir de tecido somático diferenciado, não meristemático:

(a) - a origem da fonte de explante (cotilédone x folha definitiva), embora implique em prováveis diferenças de balanço hormonal e nutritivo, não afetou qualitativamente a respostas morfogenética (Figura 30);

(b) - a interação de auxinas e citocininas necessária para a morfogênese foi específica. Quanto ao efeito das interações de auxinas e citocininas testadas no crescimento de calo (Figuras 33 a 37), a única diferença estatisticamente significativa foi AIAx6-BA. Em relação à textura dos calos e rizogênese (Tabelas 11 a 15), a concentração de 10μM da citocinina (6-BA) resultou em melhor textura de calo (de ligeiramente friável a bem friável) e ausência de raízes, tanto para cotilédone como para folha definitiva (Tabela 11), em relação a auxina (AIA).

Como citocinina, 6-BA foi mais efetiva em obtenção de calos friáveis que cinetina (Tabela 12). A auxina natural foi, também, a mais efetiva, pois, a interação 6-BA com a auxina sintética (ANA) não produziu calos friáveis, independente do material vegetal testado (1 ou 2). E, novamente, também, em relação a ANA, a presença de cinetina como fonte de citocinina no meio resultou em calos com piores texturas (duros) do que 6-BA. A presença de 6-BA, a partir da concentração de 2,5μM favoreceu o aspecto dos calos. Este fato foi observado, também, em relação a auxina sintética, usada como herbicida (2,4-D), embora, com esta auxina, a interação (dialélico V) resultou em calos com pequeno crescimento (Figura 36). Quanto à textura de calos os melhores resultados foram obtidos com a auxina natural, pois, mesmo que tenha havido grande rizogênese em presença desta, principalmente quando se utilizou cotilédone como explante inicial, a interação desta com a citocinina (6-BA), principalmente na concentração de 10μM, resultou em calos friáveis e sem diferencia-

ção radicular, tanto para cotilédone como para folha definitiva, como explantes iniciais. A concentração de 10μM de 6-BA resultou em calos, pelo menos ligeiramente friáveis, com todas as auxinas testadas, e, assim, a concentração de 10μM de 6-BA se tornou padrão de fonte de citocinina para o meio de cultura dos explantes e foi, então, utilizada nos estudos da etapa seguinte: regeneração (organogênese);

(c) - a comparação entre auxina natural e sintética, em presença de 6-BA 10μM, em regeneração de *L. esculentum* (Tabela 16) revelou que apenas a presença de AIA ou ANA no meio de cultura resultou em formação de novas plantas, não havendo diferença estatisticamente significativa do ponto de vista quantitativo. Entretanto, a auxina natural (AIA) revelou-se superior à auxina sintética em relação ao aspecto qualitativo da diferenciação (classe de regeneração), obtendo-se, em presença de AIA, regenerações diferenciadas como folhas e, principalmente, como plantas com ápice.

Este efeito promotor da auxina natural verificou-se na concentração de 20μM. Foi testada a concentração de AIA de 25 μM, que resultou igualmente em calos bem friáveis e sem rizogênese e com regeneração. Assim, podemos dizer que nos materiais vegetais testados, o melhor crescimento do calo em meio primário e a melhor regeneração, no mesmo meio de cultura, ocorreram na combinação de AIA 25μM e 6-BA 10μM, a combinação ótima de fitorreguladores no meio de cultura, no presente trabalho. Esta combinação foi utilizada como meio de cultura padrão em todos os demais experimentos, incluindo meio de pré-seleção com filtrado de cultura de fungo, e

(d) mesmo em presença de combinação ótima de fitorreguladores no meio de cultura, a expressão desta combinação foi influenciada por condições do ambiente, notadamente intensidade luminosa. Assim , intensidades luminosas mais altas, principalmente, resultaram em melhor regeneração, do ponto de vista quantitativo (menor freqüência de regeneração) e principalmente do

ponto de vista qualitativo, pois, obtiveram-se plantas vigorosas com ápice, as quais não apresentam praticamente problemas nas fases seguintes de enraizamento, aclimatação, plantio e sobrevivência no solo (Figura 38).

2. Produção de plantas por variação somaclonal em tomate

Por muitos anos, tem-se reconhecido que a manutenção de células e tecidos vegetais em cultura, resulta em mudanças genéticas. Estas alterações genéticas têm sido recuperadas nas plantas regeneradas obtidas a partir de cultura de células e tecidos. Mas, recentemente, tem-se reconhecido que este método de introduzir mudanças genéticas, em plantas de interesse comercial,poderia desenvolver novas linhas de cruzamentos. A tecnologia de introduzir variação genética, pelo uso de cultura de células e tecidos, foi denominada de variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981), e se constitui em novo instrumental para geneticistas e melhoristas na redução do período de tempo para o desenvolvimento de um novo cultivar e em permitir acesso a novas classes de variação genética.

Para ORTON (1984) em relação à variação somaclonal podemos fazer as seguintes generalizações:

(i) tecidos somáticos de plantas cultivadas in vitro exibem variação cromossômica/genética mais frequentemente e em grau maior que os tecidos não cultivados in vitro;

(ii) todas as unidades de hereditariedade (ou seja, genes, cromossomos, genomas citoplasmáticos) estudados até agora mostraram variabilidade em cultura, com a possível excessão do genoma de cloroplasto;

(iii) o estudo genético ou fisiológico do tecido do explante pode afetar os tipos e proporções de células aberrantes na cultura, ou seja, a variação tende a ser diretamente pro-

porcional à ploidia;

(iv) o modo de crescimento do tecido (isto é, organizado vs. desorganizado) in vitro tem um impacto significativo na variabilidade genética/cromossômica, a variação aumentando com a diminuição da organização;

(v) fatores físicos (isto é, meio, idade) podem influenciar a variabilidade cromossômica/genética in vitro;

(vi) variabilidade cromossômica/genética está associada com, e pode ser a causa subterrânea da perda da capacidade de rediferenciação em plantas inteiras;

(vii) quando células anormais participam com sucesso na regeneração e persistem nas plantas inteiras, estão, geralmente, associadas com viabilidade diminuída, esterilidade e anormalidades morfológicas.

3 - RELAÇÃO ENTRE METABÓLITOS PRODUZIDOS PELO FILTRADO DE CULTURA DE *A. solani* E PATOGENICIDADE

Neste trabalho, reafirma-se que o filtrado do fungo obtido através de cultura de colônia micelial de *A. solani* em meio líquido, permanece tóxico mesmo na ausência do fungo, o que evidencia ser a ação patogênica de *A. solani* mediada por metabólitos tóxicos (toxinas) executadas pelo agente causal (TABELA 39).

Tanto os elementos primários como os secundários da patogenicidade, são encontrados entre as substâncias tóxicas produzidas por espécies de *Alternaria* em cultura artificial (TEMPLETON, 1972).

A teoria toxínica de doença de plantas envolve duas observações básicas: (1) toxinas são produzidas pelos microorganismos fitopatogênicos quando crescidos em meio sintétito e (2) estas toxinas incitam uma parte ou todos os sintomas característicos da doença iniciada pelo patógeno (LUKE & GRACEN, JR. 1972b).

LUKE & GRACEN, JR. (1972a), distinguem vivotoxina de patotoxina (ver REVISÃO DA LITERATURA) através da abrangência dos sintomas produzidos pelas toxinas em plantas sadias. Segundo estes autores, a vivotoxina reproduz, em parte, alguns dos sintomas, mas não é o agente incitador "inicial" da doença que, neste caso, é o próprio patógeno. Para LUKE & GRACEN, JR. (1972a), patotoxina é a toxina que causa a doença, existindo uma correlação positiva entre a produção de toxina e patogenicidade. Neste caso, a patotoxina é a toxina que incita a doença.

A indução de síndrome total da doença Pinta-Preta pelo filtrado de cultura do agente causal (TABELA 40), encaixa-se num dos principais critérios utilizados para definir toxinas de *A. solani*, como fatores de patogênese (YODER, 1980 - ver REVISÃO DA LITERATURA).

Outra prova que reforça a teoria toxínica da doença Pinta-preta é o trabalho feito por HANDA et al. (1982). Estes autores fizeram testes do filtrado de cultura de *A.solani* utilizando, neste caso, células em suspensão, com relação à produção de toxina(s) específica(s). Os resultados mostraram que as preparações de filtrados de cultura de *A.solani* foram mais tóxicas às suspensões de células das espécies vegetais que são hospedeiras de *A.solani* do que suspensões de células de espécies que não são hospedeiras deste patógeno.

Os resultados de HANDA et al (1982) também mostraram que as suspensões de células das espécies hospedeiras podem ser usadas como bioensaios, pois, as mesmas podem ser utilizadas para quantificar de maneira reproduzivel a quantidade de atividade fitotoxica extracelular do PTA (preparação tóxica de *Alternaria*) produzida pelo fungo durante o crescimento em cultura.

Ponto a ser considerado é se o fungo apresenta atividade fitopatogênica durante todo o crescimento, ou se a produção dos metabólitos tóxicos, se restringe a uma determinada fase de crescimento do patógeno. Para se responder esta pergunta deve-se correlacionar as fases de crescimento do fungo em meio líquido (Figura 52 A), tanto com a qualidade da resposta fitotóxica avaliada através do teste de fluxo de transpiração, por estacas do hospedeiro (Figura 52.B) como com a produção de metabólitos fitotóxicos (Figura51) Teriamos, então, :

FASE I (lag) = sem produção de metabólitos de efeito estatisticamente significativo. Murcha é o sintoma mais predominante dos metabólitos produzido nesta fase.

FASE II (log) = a partir da metade desta fase o efeito fitotóxico passa a ser estatisticamente significativo , juntamente com o aparecimento da necrose como sintoma fitotóxico nesta fase o sintoma inicial ainda é a murcha que foi visualizada em períodos cada vez menores conforme o crescimento do fungo em meio líquido de Czapek-Dox.

FASE III = a produção de metabólitos nestas 2 fases foi muito semelhante, pois, após o término destas fases foi que ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa do efeito fitopatogênico. A murcha nestas fases, foi um sintoma que perdeu a força, parecendo ser nestes fases em "efeito residual " dos metabólitos produzidos na fase II.

FASE IV = a parte final da fase autolítica de crescimento da colônia de A.solani se caracterizou por um aumento estatisticamente significativo de fitotoxicidade . Este aumento se deveu tanto ao fortalecimento da necrose (aumento de área atacada) como ao aparecimento de clorose, em forma de halo clorótico, característico , correspondente à infestação no campo (ver Revisão de Literatura).

Resumindo, podemos dizer que:

FASE I	- (até 14 dias de permanência em meio líquido) →	não se observou qualquer relação entre o período de crescimento do fungo e a fitotoxicidade do filtrado.
FASE II	- (do 14º até o 27º dia de permanência em meio líquido) →	produção de metabólitos causadores de sintomas de murcha.
FASE III e início da FASE IV	- (do 28º ao 45º dia de permanência em meio líquido) →	produção de metabólitos causadores de necrose.
final da FASE IV	- (ao redor do 60º dia de permanência em meio líquido) →	produção de metabólitos de clorose (halos cloróticos ao redor das manchas necróticas circulares, característicos da doença).

Atenção especial deve ser data a esta espécie de *Alternaria*, pois HENNING & ALEXANDER (1959) relatam que nas culturas de *A. solani* cultivadas pelos autores, encontraram *A. tenuis* como contaminante. A tentotoxina produzida por *A. tenuis* (ver Revisão da Literatura - Tabela 3) unicamente produzida em cultura estacionária, aparece como um produto de autólise (Fase IV de crescimento), sendo produzida somente após o fungo ter atingido o crescimento máximo, quando não há mais disponibilidade de açucar (RUDOLPH, 1976).

Nos testes de seleção in vitro, utilizamos filtrados de cultura obtidos após 45 dias de inoculação do fungo em meio líquido. A escolha deste período de crescimento do fungo em meio líquido para testes posteriores se deve a dois fatores: 1) após a fase estacionária de crescimento (III), diferentes patógenos podem se comportar diferentemente (DURBIN, 1983) e 2) liberação de toxinas não comprometidas com a patogênese. A fase estacionária ou de equilíbrio, nos fungos, é geralmente iniciada pela produção de venenos ou "compostos de deterioração", os quais podem ser simplesmente subprodutos metabólicos que, contudo, inibem o crescimento posterior (STEVENSON, 1974). Estes "compostos de deterioração" marcariam o efeito de toxinas e poderiam ter, talvez, inclusive, efeito fitotóxico. Aumento do efeito fitotóxico, tanto em qualidade (visualização de manchas necróticas em período progressivamente menor e a formação de clorose), como em quantidade (aumento na sintomatologia após o 45º dia, como indicado nas curvas dos efeitos fitopatogênicos filtrados) poderia ser atribuída, talvez, a estes compostos. Este aumento da patogenicidade observado a partir do 45º dia (FIGURA 40) de permanência do fungo em meio líquido, independente dos tratamentos sofridos pelos filtrados, poderia ser atribuído ao segundo fato: produção de toxinas a partir do 45º dia mas, toxinas estas que, como RUDOLP (1976) frisa, não teriam importância primária durante a patogênese, como é o caso da tentotoxina, a toxina produzida por *Alternaria tenuis*, que induz clorose.

A produção de metabólitos fitotóxicos após 45 dias de crescimento em meio líquido seria, então, considerada como um produto de autólise, "compostos de deterioração", nos quais se encaixaraia até a liberação de uma possível toxina, como é o caso da tentotoxina. Um composto deste tipo de *A.solani* não pode, então, ser de importância primá

ria durante a patogênese de produção de metabólitos em períodos de até 45 dias de permanência em meio líquido. Assim, focalizamos o nosso trabalho nos períodos de permanência de 19,21(fase II), 30 (faseIII) e 45 dias (fase IV) dias.

As curvas de produção de toxina são diferentes conforme a toxina, a toxina A-MI (Figura 2 - ver Revisão de Literatura), uma toxina especifica de *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* tem a produção restrita nas fases II e III de crescimento. O pico de produção da toxina ocorre no início da fase III de crescimento do referido fungo.Já a licomarasmina, uma toxina derivada de aminoácido que causa manchas foliares necróticas no tomateiro como A.*solani* e que foi isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*(Sacc) Snyder & Hansen (RUDOLPH 1976) é produzida somente na fase IV de crescimento do respectivo fungo, sendo que o pico de produção ocorre ao término desta fase (DURBIN 1983).

O sintoma de murcha observado pela produção de metabólitos , principalmente na fase II de crescimento de *A.solani* no presente trabalho evidencia que no caso em questão a murcha foi um sintoma que se encaixaria na teoria toxínica, como nas doenças de murcha (Murcha de Fusarium e Murcha de Verticillium) do tomateiro.

Vários trabalhos mostram que preparações de enzimas pécticas podem produzir em estacas de tomateiro alguns dos sintomas característicos da doença de murcha. Além disto, foi obtida a metil esterase - pectinica (MEP) da seiva vascular de plantas infectadas de tomateiro e *Fusarium* produz rapidamente MEP e poligalacturonase e enzimas de maceração em cultura axênica. Uma situação "ideal" foi relatada na qual a formação de enzima péctica no tecido vivo do caule de de tomateiro foi menor nas variedades resistentes do que nas sucetíveis, embora, os fungos agressores (*Fusarium* e *Verticillium*) cresceram igualmente bem em ambos os tipos de variedades. Por outro lado, outros trabalhos mostraram que em várias linhagens de *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* a patogenicidade no tomateiro esteve pouco relacionada com a produção de enzimas pécticas in vitro, pois mutantes que não produziram enzimas pectolíticas foram também capazes de incitar sintomas típicos de murcha. ZAITLIN (1967) estudou exaustivamente este aspecto concluindo que faltam dados substanciais para se determinar se as enzimas pectícas estão de fato envolvidas na patogênese das murchas vasculares.

O fato de que o filtrado autoclavado de *A.solani* produziu sintomas de murcha torna improvável que, neste caso, a produção de enzimas pécticas in vitro tenha sido responsável pelo aparecimento deste sintoma. Os metabólitos de *A.solani* produzidos predominantemente na fase II do crescimento do fungo e causadores de murcha provavelmente não são de origem proteíca, como ocorre em outra doença fúngica do tomateiro, o tombamento ("dumping-off") causado no Brasil principalmente pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, correspondente a fase imperfeita de um basidiomiceto primitivo, *Thanatephonus cucumeris* (Frank) Donk e que sobrevive utilizando-se de ervas daninhas como plantas hospedeiras (JAGER et al 1982). A ação tóxica de *A.solani* é devida principalmente à poligalacturonase produzida pelo fungo (ZAITLIN, 1967).

Possível candidato ao metabólito responsável pela murchidão causada por filtrados de cultura de *A.solani* correspondente a faseII do crescimento do fungo, seria o ácido alternárico, o primeiro metabólito isolado de filtrados de cultura de *A.solani* (BRIAN et al.1949 1951).

O ácido alternárico, com ponto de fusão de 138°C, causa em plantas superiores, forte murchidão seguida de morte de plântulas - quando aplicado em solução nutritiva nas concentrações de 5-10mg/ ml em plântulas de rabanete, repolho, mostarda e cenoura, mas não foi efetivo, pelo menos após 7 a 10 dias, em tomate, ervilha e beterraba (BRIAN et al, 1952), o que descredita, em parte, o ácido alternárico como o principal metabólito tóxico causador do sintoma de murcha.

BRIAN et al (1952) verificaram que a patogenicidade de vários isolados não foi correlacionada com a produção de ácido alternárico e, por isso, TEMPLETON (1972) considera este metabólito como determinante secundário da patogenicidade.

Os isolados utilizados no presente trabalho foram todos fitopatogênicos (Figura 42) evidenciando, pois, que em todos houve produção de metabólitos que foram a causa primária de patogenicidade de *A.solani*. Não se observou, assim isolados de *A.solani* agindo diferencialmente em relação a patogenicidade, alguns patogênicos, outros - não. A ação diferencial de alguns isolados de *A.solani* em relação a patogenicidade, é citada na literatura (BONDE, 1929; HENNING & ALEXANDER, 1959).

HENNING & ALEXANDER (1959) encontraram 7 raças fisiológicas de *A.solani* a partir de 10 isolados usados por estes autores. Mais recentemente, MAFFIA & MATSUOKA (1980) confirmam que o patógeno apresenta 7 raças fisiológicas claramente distintas, das quais 4 são idênticas as raças patogênicas as plantas de batata e 3 raças são específicas para plantas de tomate.

O ácido alternárico causa além da murchidão, necrose e clorose em plantas superiores a inibição de germinação de esporos de fungos (Ver Revisão de Literatura). Este ácido quando introduzido nos sintomas vasculares de estacas de tomateiro e de batata em concentrações de 2-20 mg/ml causou lesões necróticas no caule,pecíolos e lâminas foliares, muito semelhante na aparência às lesões associadas com algumas fases da patogenicidade causada por *A.solani* (BRIAN et al. 1952).

O fato da necrose como sintoma provocado pelo filtrado de cultura de A.solani evoluir em etapas (v e r MÉTODOS - Figura 23 e 24) sugere que a reação defensiva da planta à presença do filtrado tóxico não é o tipo de reação necrótica denominada hiper - sensibilidade por GÄUMANN em 1946 (apud ROBERTS & BOOTHROYD, 1984). Neste tipo de reação defensiva, a necrose é tão rápida e completa - nas vizinhanças do agente agressor que o patógeno, por não ter mais condições de sobreviver pela falta de células vivas, sucumbe. O rápido escurecimento e morte do tecido hipersensível contribui para o isolamento do patógeno dentro da área afetada, sem possibilidade de adquirir alimento.

A teoria da fitoalexina explica a reação da resposta defensiva de hipersensibilidade nas plantas e estabelece, segundo ROBERTS & BOOTHROYD (1984), que nas células vivas dos hospedeiros hipersensíveis, as substâncias formadas em resposta ao ataque do parasita inibem o desenvolvimento posterior do parasita, não só pela produção de fitoalexinas pelas plantas, mas, também, pelo aumento da atividade de enzimas, como polifenol oxidase causada pelo patógeno,dentro das células das plantas hospedeiras atacadas.

WHEELER (1981) tece considerações sobre a relação entre as toxinas e a resposta hipersensível nas plantas. Segundo este autor, embora a hipótese que os metabólitos tóxicos dos patógenos ativem as respostas nas plantas tenha sido anunciada em 1949 por LITZENBERGER (apud WHEELER, 1981), pesquisas realizadas pelo próprio WHEELER

não sustentaram esta hipótese. Esta hipótese foi formulada para explicar porque certas raças de aveia apresentavam suscetibilidade à *Helminthosporum victoriae* e resistência ao fungo da ferrugem. Foi postilado, no caso, que ambos os patógenos produzem uma toxina semelhante, cujos efeitos letais promoveriam o crescimento de *H. victoriae*, mas inibiriam o crescimento do fungo de ferrugem resultando, assim, numa resposta hipersensível.

Existem evidências de que substâncias tóxicas podem induzir reações hipersensíveis em folhas de cevada suscetíveis ao míldio. Foi relatado que o extrato bruto das folhas infectadas, aplicado às folhas suscetíveis imediatamente anterior à inoculação, causou um colapso celular e inibição do crescimento do fungo. Não foi, porém, determinada a natureza do material do extrato e sua origem, se foi um produto da planta ou do patógeno.

Outro ponto focalizado por WHEELER (1981) é a interpretação alternativa de que os tratamentos com toxina sobrepujam os tecidos lesados. O autor verificou que, embora o tratamento com victorina tenha suprimido completamente as lesões necróticas locais hipersensíveis, em folhas de feijão inoculadas com o vírus do tabaco e da alfafa, a supressão da hipersensibilidade não induz suscetibilidade. O que ocorreu foi o contrário: as folhas tratadas com victorina, inoculadas com o vírus, apresentaram-se sem síntomas.

O tema fascinante e complexo da reação defensiva das plantas sucetíveis às atividades patogênicas do agente agressor, através de fitoalexinas, tem sido submetido a várias reviões: em 1959, 1964 e, mais recentemente, em 1980 (apud ROBERTS & BOOTHROYD,1984).

O material vegetal teste do tomateiro estudado, não apresentou a necrose correspondente ao tipo de resistência ao patógeno mencionada (hipersensibilidade). Poderia argumentar-se que *A. solani* não é um fungo biotrófico, que vive exclusivamente de material vivo, como ferrugens, por exemplo, mas, sim, um elemento necrotrófico, que rapidamente mata parte de ou todo o hospedeiro, crescendo intercelularmente, produzindo enzimas citolíticas ou toxinas patógenas necrotróficas, usam os tecidos mortos do hospedeiro, podendo crescer saprofiticamente longe do hospedeiro.

A produção de matéria morte (necrose) no hospedeiro, parece ser um evento fundamental para o desenvolvimento de *A. solani*. Vários fatos apontam para considerarmos a necrose como síntoma principal a ser considerado:

1) o aparecimento da necrose corresponde ao filtrado da fase de crescimento do fungo relacionado à doença (Fig.41);

2) necrose é um sintoma que tem relação real com patogenicidade. No teste de fitotoxicidade do fungo crescendo in vitro (Fig.21. - ver MÉTODOS) , a inoculação do agente causal em plantas sadias resultou em aspecto encharcado (aspecto que conceituou a nota 2 neste teste) no limbo foliar dos folíolos testados. Este aspecto encharcado é devido à passagem do suco celular para os espaços intercelulares, o que é um sintoma inicial de muitas doenças necróticas (KIRÁLY, 1967b). O teste de patogenicidade de *A.solani* mencionado engloba 4 regras dos postulados de KOCH (apud DICKINSON & LUCAS, 1982)que determinam a correlação entre o agente causal e a doença a saber:

a) o organismo foi isolado em cultura, longe do hospedeiro;
b) o organismo foi reinoculado em hospedeiro sadio;
c) os sintomas desenvolvidos foram idênticos aos observados na eclosão da doença e
d) o agente causal foi reisolado do teste com o hospedeiro para cultura pura e se mostrou idêntico ao microorganismo inicialmente isolado,

Dados de literatura (DURBIN, 1983) confirmam a relação real entre necrose e patogenicidade;

3) o fato da necrose não ser um dos síntomas iniciais provocados pelo filtrado do fungo, não invalida a teoria toxínica da Mancha de Alternaria, pois, há evidências para toxinas agindo em fases não iniciais do ciclo da doença, como no caso da ferrugem do trigo causado por *Puccinia graminnis* f. sp. *tritici* (DURBIN, 1983);

4) *A.solani* como um fungo necrotrófico cresce intercelularmente, produzindo enzimas citolíticas e toxinas e o patógeno usa,então, os tecidos mortos do hospedeiro como substrato. Como DICKINSON & LUCAS (1982) chamam à atenção, a produção de enzimas citolíticas e toxinas é uma característica cuja presença ou ausência configura um fungo em necrotrófico ou biotrófico. O conceito de que os patógenos produtores de toxinas (necrotóficos) são essencialmente saprófitas, incapazes de invadir os tecidos do hospedeiro antes que estes estejam mortos,foi revisado por WHEELER (1981). Estudando os vários casos citados na literatura, o autor concluiu que não há evidências que as toxinas funcionam como "quimiopatógenos" necessários para matar as células antes que os patógenos que produzim estas substâncias possam invadir e

colonizar. Por outro lado, há pouca dûvida, que as toxinas atuam como "quimiopatógenos" direta ou indiretamente, na indução de sintomas em áreas não ocupadas pelo próprio patógeno;

5) o fungo teria necessidade de material morto para colonização completa do hospedeiro. As toxinas indutoras da necrose podem ser particularmente ûteis imediatamente antes que o patógeno esporule.Nesta fase ocorre um aumento intenso da atividade metabólica associada com a reprodução, atividade esta, que se realiza a custa de todas as outras atividades do patógeno. Também, neste período, o patógeno torna-se menos dependente das células vivas como alimento e a maioria do material translocado para as estruturas reprodutivas vem muito mais diretamente do micélio do que do hospedeiro (DURBIN, 1983);

6) o estabelecimento da necrose pode ser um "sinal" metabólico para início da esporulação. Desta maneira, necrose pode ser significante para muitas estruturas reprodutivas dos fungos que se forman em tecidos necrôticos (DURBIN, 1983):

7) toxinas além de ter vários papéis na patogenicidade, podem ser importantes na fase saprofítica dos patógenos, como enfatiza DURBIN(1983) atuaram, nesta fase, como antibióticos clássicos poderiam, assim, minimizar a competição de outros componentes da microflora para o mesmo microsítio;

8) pode-se argumentar que necrose é um sintoma pouco distintivo desde que morte das células, tecidos, orgãos ou plantas internas ocorre na maioria das doenças vegetais. Como frisa WHEELER (1981), embora todos os patógenos produtores de toxina causem necrose em alguma concentração, a maioria dos quais com o papel causal estabelecido na patogenicidade estes patógenos não matam rapdamente as células da planta nas concentrações de toxinas que se esperam ocorrentes na natureza, o gênero *Alternaria* é uma excessão a este fato toxinas produzidas por 4 espécies de *Alternaria*, *A.kikuchiana*, *A,mali*, *A. citri* e *A. Alternata* f. sp. *lycopersici* que atacam respectivamente peras, maças, citros e tomates, rapidamente causam necrose em concentrações baixas (GILCHRIST & GROCAN 1976; NISHIMURA & KOHMOTO, 1983 b);

9) clorose foi um sintoma, cujo aparecimento se restringiu ao filtrado correspondente ao filtrado do período de crescimento autolítico (parte final da fase IV). Portanto, clorose não deve provavelmente estar relacionada com os disturbios primários da patogenicidade Em muitas doenças, as toxinas são responsáveis por ao menos alguns dos

sintomas, mas não parecem ser os determinantes exclusivos da patogenicidade. Estes composto são talvez melhor correlacionados como fatores que contribuem para a virulência do patógeno (DICKINSON & LUCAS,1982).

Como frisa DURBIN (1983) clorose não é um sintoma específico, mas sim induzido por várias toxinas, quer de origem fúngica , quer de origem bacteriana, clorose pode ocorrer por 2 fatores :

a) Como um efeito comum e inicial nos tecidos expostos às toxinas, a clorose indica perdas na produção da energia do sistema de fotofosforilação que ocorrem durante a patogênese. A clorose pode resultar, no caso das toxinas fúngicas de : efeito em um componente específico no sistema, por exemplo, tentotoxina se liga ao fator I acoplado de cloroplasto (DURBIN & STEELE, 1979); ou de ruptura da função da membrana, no caso de victorina, com a qual ocorre a perda da recuperação dependente de luz do potencial da membrana (apud WHEELER, 1981).

Toxinas de bactérias, como tabtoxina e tagetitoxina, tambem causam clorose pelo mesmo motivo. A tabtoxina (ver fig.1 III - Revisão da Literatura), em baixa, mas não em altas concentrações inibiu a enzima carboxilase de ribulose bisfofato a partir da proteina da fração 1 do tabaco(apud WHEELER, 1981). A tabtoxina é citada por WHEELER, 1981 como o exemplo de uma toxina que produz um único sintoma característico, a clorose, mas que o próprio autor considera como um determinante secundário da doença contribuindo para a virulência. A tagetitoxina interfere em alguma etapa inicial no desenvolvimento do cloroplasto, etapa esta dependente da luz(DURBIN,1983).

b) interferência com a síntese de aminoácidos. É o que ocorre com 2 toxinas de origem fúngica: faseolotoxina e rizobitoxina. A rizobitoxina (ver fig. 1 IX - Revisão de Literatura) atua por inibir formação de aminoácidos ou etileno (DURBIN, 1983).

A clorose, nos testes de fitotoxicidade empregados e na infestação de *A.solani* no campo, aparece na doença Pinta-preta (ou - Mancha de Alternaria) como um halo clorótico circundando a mancha necrótica.

Vamos considerar a ocorrência do sintoma de halo clorótico

nas doenças produzidas por espécies de Alternaria. Este sintoma ocorre em 3 ocasiões: na mancha preta da pera japonesa var.Nijisseiki causada por A.Kikuchiana em pera japonesa (ver Tabela 2-Revisão de Literatura); na mancha foliar causada por A.zinniae em parasitando espécie de compostas, como zínia, girassol e margarida e na Mancha de Alternaria causada por A.solani em espécies de solanacéas (batata, tomate).

No caso de A.Kikuchiana verificou-se que a toxina não específica liberada por A.Kikuchiana (sign.A.tenuis), o ácido tenuazônico (ver Revisão da Literatura- Tabela 3, Fig.1 IV), pode causar o halo clorótico. O ácido tenuazônico, obtido também dos fungos A.longipes e A.mali (ver patótipos de A.alternata-Tabela 4) é praticamente uma excessão dentro dos metabólitos encontrados no gênero Alternaria pois, tem o ponto de ebulição abaixo de 120°C, mais precisamente 117 °C (TEMPLETON, 1972). A manutenção do efeito fitotóxico do filtrado de cultura de A.solani após 20 minutos a 120°C descrita a possibilidade de atuação do ácido tenuazônico, termolábel, na sintomatologia da doença da Mancha de Alternaria. É interessante, neste ponto, lembrar que tanto A.Kikuchiana, A.longipes como A.mali produzem toxinas específicas ao hospedeiro, respectivamente toxina = AK, toxina-AL , toxina-AM (ver fig.2 a,b,c,).

Muitas toxinas não especificas além do ácido tenuazônico foram isoladas da mesma cultura de A.kikuchiana : fitoalterninas, além de altenina, alternariol e correspondentes eter monometil e tentotoxina, ver Tabela 3 - Revisão de Literatura (TEMPLETON, 1972, KONO et al. 1981, NISHIMURA & KOHMOTO, 1983b).

Em 1954 foram isoladas 3 substâncias de natureza peptídica, as fitoalterninas A,B,C (apud TEMPLETON, 1972), que apesar da natureza peptídica, no caso da fitoalternina C, apresentam alto ponto de fusão: 235°C (TEMPLETON, 1972). Os estudos feitos com fitoalterninas partiram de culturas de 30 dias de idade, em meio estacionário,a partir de áreas micelias (TEMPLETON, 1972). Condições semelhantes foram feitas com A.solani (ver experimento nº 4). A fitoalternina A foi específica ao hospedeiro e as fitoalternina B e C foram tóxicas as variedades sucetíveis (TEMPLETON, 1972). Embora pela ação as fitoalterninas e correspondência com o período de crescimento do agente cau

sal, as fitoalterninas como quaisquer outros composto de origem peptídica não foram isoladas de A.solani até agora (ver Fig.3 - Revisão de Literatura). Em um espécie que tem sido estudada, do ponto de vista químico, exaustivamente no Canadá (grupo de STOESSL) e no Japão , 3 grupos distintos que trabalham em colaboração: grupo liberado por NISHIMURA, KOHMOTO na Universidade de Nagoya; grupo liderado por OTANI E HAYAMI na Universidade de Totton e o grupo liderado por OMURA,NOMURA na Universidade Kyoto, cujos resultados tem sido publicados recentemente em revisões), a probabilidade de tais substâncias existirem, mas, não terem sido ainda isoladas é muito pequena.

Como foi dito anteriormente, uma outra substância foi isolada de A.Kikuchiana, substância esta derivada de carboidrato, a altenina, que causa necrose (ver Tabela 3- Revisão de Literatura) A altenina, não é uma toxina que possa estar relacionada à patogenicidade da Pinta-preta por 2 motivos (a) esta toxina foi isolada de filtrados de cultura crescendo por 8 a 9 dias. Esta fase de incubação de A. solani em meio de Czapek-Dox não produziu fitotoxicidade (ver Fig.51) e (b) a altenina é termolábel, sendo perdida após ser submetida por 10 minutos a 80 °C (TEMPLETON, 1972).

A utilização do ponto de fusão das substâncias citadas é um ponto importante, pois, discrimina os metabólitos que estão possivelmente envolvidos com a patogenicidade, dos outros, que do ponto de vista químico não tem possibilidades de estarem envolvidas.

Devemos considerar tambem que dentro do grupo de substâncias, cujo ponto de fusão se situa acima da temperatura do processo de autoclavagem, algumas estão mais relacionadas, dependendo da ação fitotóxica mas condizente ou não com o síndrome da doença.

O alternariol e correspondente eter monometil, com pontos de fusão de 350 e 267°C foram encontrados 3 espécies de Alternaria, além de A.kikuchiana; A.tenuis, A.cucumerina e A.dauci (TEMPLETON, 1972) . O eter monometil alternariol é um metabólito que causa lesões marrons e necrose na pera japonesa e tabaco (apud STROBEL, 1974).

A tentotoxina isolado primeiramente de A.tenuis após o cultivo do fungo por 28 dias é estável à autoclavagem mesmo sendo um tetrapeptides cíclico, (C_{22} N_4 O_4 com peso molecular = 414,5), pois, tem o ponto de fusão de 172-175°C (TEMPLETON, 1972). Verificou-se que isolados de 2 espécies de Alternaria que produzem toxinas específicas, - produzem em cultura em adição às toxinas especificas, a tentotoxina .

Estas espécies são A.Kikuchiana que produz a toxina especifica AK (Fig.2a, Tabela 4) e A.mali, que produz a toxina especifica AM (Fig. 2c, Tabela 4). Em verdade, a tentotoxina que causa clorose em plantas é o caso clássico de toxina não específica,pois apresenta amplo aspecto com atividade contra gimnosperna, pteridófita, musgos e algas verdes, bem como uma ampla faixa de plantas superiores. Em todos os casos, a sensibilidade à tentotoxina é correlacionada com a fração de cloroplasto e inibição de fotofosforilação, as espécies insensíveis perderam evolucionamente o sítio de ligação de toxina com o cloroplasto (DURBIN & STEELE, 1979).

O fato da distribuição taxonômica de insensibilidade à tentotoxina refletir meramente o caminho da evolução das plantas,a resposta da tentotoxina, sendo útil em certos casos para se determinar o caminho de evolução em casos especificos (DURBIN & STEELE, 1979) não encoraja um possível papel da toxina na patogenicidade da doença questão. Além do mais, o síntoma característico causado pela tentotoxina, clorose, não nos parece ser, como dissemos anteriormente, o síntoma primário de patogenicidade, descartando, pois, esta substância como possível determinante primário de patogenicidade.

Ênfase maior deve ser dada à comparação entre a sintomatologia causada por A.solani e A.zinniae, pois, verificou-se que a toxina ziniol (ver Tabela 3 - Revisão de Literatura), também é excretado por A.solani (Fig.49 B). TEMPLETON (1972) descreve os meios de cultivo, testes de fitotoxicidade e possíveis papeis desempenhados por esta toxina, e a partir disso, vários pontos são convergentes entre A.solani e ziniol:

1º) a mancha foliar de zinia apresenta sintomatologia extremamente semelhante a Pinta preta: pontos marrons pequenos característicos que se iniciam como manchas necróticas, geralmente circundado por halos cloróticos, manchas estas que posteriormente progridem, e coalescem,

2º) toxina foi detectada em filtrados de cultura não diluídos pela imersão de plântulas intactas ou estacas em alíquotas do filtrado, tendo como controle o meio não metabolizado esterilizado. A visualização do teste foi feita dentro de 24 horas, na luz a 27°C.A

montagem do teste foi muito semelhante à feita para o fluxo de estacas em relação a A.solani,

3º)toxina foi produzida pela incubação do fungo em cultura estacionária por 17-21 dias a 26°C, condições e período de incubação que resultaram em filtrados comprovadamente tóxicos de A.solani.

Outros pontos afastam a possibilidade de toxina ziniol estar envolvida na patogenicidade:

1) embora a montagem do teste de toxicidade e o período para avaliação tenham sido semelhantes aos empregados em nosso trabalho,sintomatologia observada no teste foi diferente, pois se observou como sintoma mais característico do ziniol o escurecimento nas nervuras que ficaram marrons, tipo de necrose que não foi encontrado no nosso trabalho (ver Figura 23 - MÉTODOS).

2) embora as condições de cultivo do fungo tenham sido semelhantes, o meio de cultivo em si não o foi. Assim A.ziniae foi cultivada em meio de sacarose com hidrolizado de caseína. O hidrolizado de caseína, neste caso, foi um substrato diferente ao empregado em nossos estudos e provavelmente deve ter resultado em produção de compostos diferentes aos produzidos no meio de Czapek-Dox por nós empregado.

Embora o ziniol pura na concentração de 500ppm tenha causado vários sintomas na planta hospedeira, como clorose, murchidão e enrolamento das pontas das folhas no bioensaio de estacas, também inibiu a germinação de várias espécies como zinia, tomate, alface, melão e cenoura (TEMPLETON, 1972). Assim, a aparente falta de especificidade para as plantas hospedeiras, as concentrações necessárias para a expressão dos síntomas e a natureza do composto, sugerem que ziniol seria melhor considerado como um determinante secundário do que um determinante primário, de patogenicidade.

Metabólito produzido por A.solani em meio de Czapek-Dox quando o fungo atinge o máximo de crescimento micelial é o ácido alternárico (TEMPLETON, 1972).

O ácido alternárico está tão relacionado com A.solani,principalmente nos textos mais antigos, que na descrição do gênero Alternaria, AINSWORTH & BIXBY (1961) frisam que esta espécie produz o ácido alternárico, um antibiótico fortemente fitotóxico, baseando-se nos trabalhos do grupo de pesquisadores britânicos que isolaram esta substân

cia (BRIAN et al. 1951, 1952). AINSWORTH & BIXBY (1961) indexaram o ácido alternárico no dicionário de fungos por eles compilado, sendo que, esta toxina é um dos pouquíssimos metabólitos fitotóxicos que constam no referido dicionário.

Embora se saiba que o ácido alternárico causa os síntomas observados no teste de fluxo de transpiração (ver TABELA 3 - REVISÃO DA LITERATURA), especialmente em relação às manchas necróticas, é considerado um determinante secundário na literatura (TEMPLETON, 1972), junto com tabtoxina, ácido fumárico e giberelinas (WHEELER, 1981). Isto se deve a vários fatos:

1) é um exemplo de que o papel preciso das toxinas não específicas na doença, é sujeito a controvérsias. Por exemplo, a correlação entre produção de toxina e virulência pode ser questionável; o ácido alternárico foi detectado em lesões de folhas de batata, lesões essas causadas por *A. solani*, mas raças do patógeno que produzem grandes quantidades deste composto, in vitro, não são necessariamente de alta virulência (BRIAN et al., 1952);

2) produz lesões necróticas, além da faixa de plantas hospedeiras de *A. solani*, plantas tais como: *Atropa belladona* L., *Solanum dulcamnra* L., *Urtica dioica* L. e *Chamaenerion angustifolium* (L) Scop, conforme verificado através de bioensaios realizados por BRIAN et al., 1952;

3) BRIAN et al. (1952) observaram que a ação do ácido alternárico não é específica e que este, obtido a partir de filtrados de cultura, produz somente manchas necróticas nas margens dos folíolos, fato que também foi observado por POUND & STAHMANN (1951). Este tipo de mancha necrótica, também verificado nos testes de fitotoxicidade utilizados neste trabalho (ver Figura 23 - MÉTODOS), foi um dos tipos de manchas necróticas expressas em presença do filtrado de cultura, mas não o único. Como dito anteriormente, outros tipos de manchas, como o tipo E (ver Figura 24 - MÉTODOS), não são citados nos trabalhos clássicos como conseqüência da ação do ácido alternárico.

Assim este metabólito deveria ser enquadrado como fitotoxina como vem sido até agora, podendo, talvez, ser considerado como reservas como vivotoxina, já que por dados de literatura causa em determinado tipo de síntoma (manchas necróticas tipo b e às vezes tipo c) e não outros síntomas, até mais característicos dentro do síndrome da doença. Só para fazermos um paralelismo com os sintomas causados pela inoculação do próprio fungo em plantas de tomate, voltemos nossa atenção ao trabalho de HENNING & ALEXANDER (1959). Estes autores testaram a ação fitopatogênica de 10 isolados do fungo através de inoculação de áreas miceliais em folíolos de tomateiro. Observaram a expressão de 3 tipos de manchas necróticas pelo patógeno nos ensaios realizados: a) pequenas manchas restritas; b) manchas maiores alongadas e c) manchas intercostais, restritas, algumas vezes com destruição completa do mesófilo, sendo que o patógeno (*A.solani*) foi isolado de todos os 3 tipos de lesões. Estes tipos de manchas necróticas foram igualmente encontradas no presente trabalho com o filtrado de cultura. É interessante lembrar neste ponto que DALY (1976) relaciona os efeitos tóxicos do patógeno como resultados, geralmente, de produtos difusíveis deste, após o estabelecimento e a ocorrência de um aumento significativo de massa do patógeno. Este autor observa que as doenças de plantas superiores são mais que simples atos de parasitismo, sendo mais na verdade um desvio deletérico de processos bioquímicos e fisiológicos , processos estes necessários para a função celular normal, diferenciação celular das plantas hospederias. Assim em muitos aspectos bioquímicos, as células doentes assemelham-se aquelas sob estresse ambiental ou células injuriadas mecanicamente;

4) o ácido alternárico é produzido na fase de equilibrio do fungo (TEMPLETON,1972), portanto, posterior a penetração e colonização da planta hospedeira pelo fungo. O patógeno pode ser usualmente isolado das lesões pretas , mas, em certas ocasiões, mais particularmente quando a infecção primária é do tipo de podridão do calo, na base do caule de plantas jovens, verificou-se que tanto as lesões do caule como as folhas não contêm o fungo. Foi sugerido no início da década de 40 que em tais casos o fungo produziu a toxina se deslocou ascendentemente dentro da planta, causando lesões na dianteira da difusão verdadeira do fungo. Assim, *A.solani* produz - toxina difusível nos tecidos hospedeiros, a qual causa a síntoma de murcha e colapso dos tecidos anteriores à infecção real. POUND

& STAHMANN em 1951 forneceram evidências substanciais de que a produção de toxinas na planta hospedeira é característica do ataque por A.solani

5) trabalho mais recente com estudo de substâncias fitotóxicas produzidas por A.solani e testadas in vivo, no caso em plantas regeneradas de batata cv. Burbank a partir de protoplastos, trabalho este realizado por MATERN et al em 1978, mostrou que as substâncias que expressaram seletividade ao hospedeiro em A.solani no trabalho mencionado não estão nem relacionadas, nem são idênticas ao ácido alternárico. Os autores verificaram que as substâncias isoladas por eles podiam ser efetivamente usadas para selecionar clones de batata sensíveis e insensíveis à toxina, sendo que tanto a sensibilidade como resistência nestes clones estão bem correlacionadas com a sensibilidade ou resistência ao proprio fungo, sendo que o tipo de reação (sucetibilidade x resistência) a estas toxinas fungícas foram mantidas por ao menos 2 gerações de propagação vegetativa. Os autores mencionados encontraram 2 substâncias ainda não caracterizadas envolvidas no aparecimento dos síntomas em plantas atacadas por Mancha de Alternaria. Estas substâncias são especifícas, é interessante ressaltar que nenhuma destas substâncias sozinha produz reações cloróticas ou necróticas nas plantas afetadas. Ambas as substâncias isoladas no bioensaio de folha destacada de batata resultaram na expressão de mancha necrótica com halo clorótico (que no nosso trabalho convencionamos como resposta fitotóxica igual a 7), tipo de mancha necrótica não observada como resposta característica do ácido alternárico como frisado por BRIAN et al 1952. MATERN et al (1978) obtiveram este síntoma a partir de culturas do patógeno incubadas por 56 dias, em meio de Czapek-Dox, cultura estacionária a 20°C, período de incubação - que no presente trabalho resultou igualmente no mesmo sintoma nos testes de respostas fitotóxicas aqui empregados (Tabela 40). As estruturas químicas das 2 substâncias isoladas por MATERN et al (1978) não foram estabelecidas, embora, as propriedades de solubilidade, cromatográficas e de espectro NMR sugerem que estas substâncias são semelhantes ao lipídeos. Devemos, no entanto, chamar à atenção ao fato de que no trabalho - de MATERN et al não se observeu manchas necróticas nas bordas dos folíolos (tipo b) que ocorreu no presente estudo e nos estudos de BRIAN et al (1952). O trabalho de MATERN et al (1978) testando a resistência de plantas de batata obtidas por variação somaclonal chegou à conclusão de que haveria na expressão da doença Pinta-preta causada por A.solani a atuação de um complexo de toxina.

A comparação entre os 2 tipos de testes de atividade do filtrado de cultura através da sequência dos sintomas de toxicidade do filtrado (método de estacas e método de discos), obtidos em nossos resultados, como está esquematizada na TABELA 49, mostra que realmente parece que o ácido alternárico esta restrito a determinada fase de crescimento do fungo em cultura fluída.

Assim, após o período de incubação do patógeno no meio de Czapek-Dox após 30 dias (correspondente a fase III do crescimento do fungo) observamos manchas necróticas nas estacas do tipo descritas como características da ação fitotóxica deste metabólito (POUND & STAHMANN, 1951; BRIAN et al. 1952) e nos discos não se observa sintomatologia após 5 dias de permanência nos filtrados (FIGURA 74), nem com 6 dias, período de permanência em que as estacas permaneceram nos testes realizados no trabalho pormenorizado de BRIAN et al. 1952, em estacas. Este mesmo resultado foi observado quando se utilizaram discos de plantas de tomate de "Petomech", cultivar que se mostrou mais sensível ao filtrado de cultura do patógeno não diluído do que "Ângela" (Figura 58,c). Aos 30 dias de idade em meio líquido de Czapek - Dox, o fungo comprovadamente libera o ácido alternárico (BRIAN etal, 1951), sendo que, plantas de tomate se constituim em material vegetal muito sensível a este metabólito, pois BRIAN et al (1952) verificaram que este material foi consideravelmente mais sensível que plantas de batata, sendo que, uma concentração de 0,25µg/ml do ácido alternárico foi suficiente para dessecar e matar as folhas em estacas de plantas de tomate (cv. Potentate).

Já após o período de incubação de 45 dias (fase IV do crescimento do fungo) a sintomatologia tanto do teste de estacas como do método de discos foi mais acentuada, principalmente em relação ao sintoma de necrose. Mas, esta progressão da intensidade da necrose não corresponde aos efeitos fitotóxicos descritos previamente (POUND & STAHMANN, 1951 ; BRIAN et al 1952)que em estacas, se restritiziram apenas as manchas necróticas do tipo a, b, e c (ver Fig. 23 - MÉTODOS) . A progressão da necrose em grau (tipo e) e em área foliar afetada em estacas, método utilizado pelos autores anteriores, após o período de 45 dias de crescimento do agente causal em meio de Czapek-Dox (igualmente utilizado por estes autores a partir de áreas miceliais),o ácido alternático não seria o responsável pelo efeito fitotóxico do filtrado, pois, este não produziria o alto grau de fitotoxicidade observado em filtrados de culturas mais velha (ver Fig.50j).

TABELA 49 - Comparação dos testes de fitotoxicidade empregados (estacas x discos) em relação à necrose como sintoma e ao período de incubação do fungo em meio líquido de Czapek-Dox. Utilizou-se filtrado não diluído (concentração 100% v/v). Material vegetal: cv. Ângela.

Dias em meio líquido	Aspecto do sintoma em: estacas	discos
30 dias fase III de crescimento	Manchas necróticas após cerca de 24 horas (tipos a,b)	Praticamente não há formação de áreas necróticas após 5 dias de contacto permanente com os filtrados
45 dias fase IV de crescimento	Manchas tipos a,b após 4 horas. Progressão das manchas após 24 horas para o tipo e, 1/4 da superfície do limbo foliar	De 50 a 90% da área dos discos se encontra necrosada após 5 dias de contacto permanente com o filtrado

FIGURA 74 - Efeito na sintomatologia do período de cultivo do fungo em meio líquido. Sintomatologia avaliada através de área de necrose em discos de folhas de plantas de tomate (teste de discos). Material vegetal testado: discos de folhas de plantas obtidas de sementes de "Petomech". Avaliação, em ambos os períodos, de crescimento de fungo considerados, após 5 dias de contato permanente com os filtrados. Notas dadas em escala semi-quantitativa, em grau crescente, conforme a área necrosada do disco foliar: nota 1 - 0% de área necrosada, até nota 5 - 100% de área foliar necrosada.

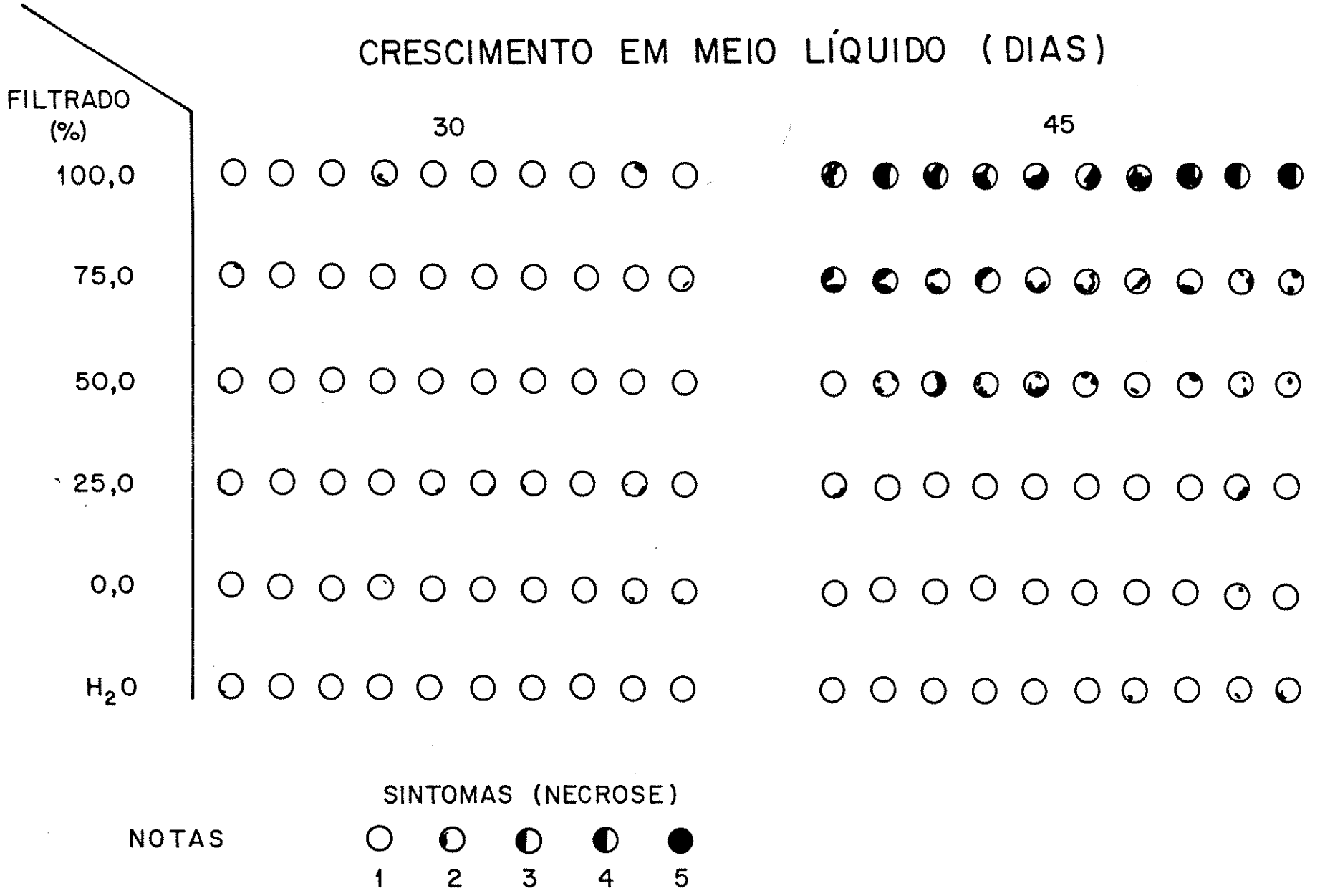

CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO (DIAS)
FILTRADO (%)
30
45
100,0
75,0
50,0
25,0
0,0
H_2O
SINTOMAS (NECROSE)
NOTAS
1
2
3
4
5

FIGURA 74

Poderiamos levantar várias hipóteses para explicar o fato de que, provavelmente, o ácido alternárico não é o responsável pelo efeito fitotóxico de filtrados de culturas correspondente a fase IV do crescimento do fungo:

a) nas culturas, não houve produção de ácido alternárico em qualquer fase de crescimento do fungo;

b) se houve produção de ácido alternárico nas culturas, este não é mais metabolizado no período correspondente a 45 dias de incubação em meio líquido de Czapek-Dox;

c) houve produção de ácido alternárico na fase de crescimento considerada, mas ocorreu, concomitantemente, a liberação de outros metabólitos fitotóxicos mais potentes e ou em maior concentração do que o ácido alternárico e como resultado a ação do ácido alternárico ficou encoberta nos testes de fitotoxicidade realizados.

BRIAN et al 1951 observaram que os filtrados de cultura de A. solani produziram diferentes níveis de atividade e correspondentes produção de ácido alternárico, conforme a composição de meio de cultura empregado. A mesma raça de A.solani apresentava atividade intermediária e produção de 5-10 mg/ℓ de ácido alternárico quando o fungo foi cultivado em glicose + meio de nitrato. A mudança de fonte de energia do meio de cultura fluída para sacarose, (que foi superior a glicose, galactose e glicerol como fonte de carbono) mantendo-se o mesmo fonte de nitrogênio (nitrato) resultou em alta atividade com produção de cerca de 236 mg/l de ácido alternárico. Os autores verificaram que além da mudança na fonte de carbono de monossacarideo para polissacarídeos, a concentração empregada de sacarose influiu no crescimento máximo do fungo e conseqüentemente da produção do ácido alternárico. A concentração mais alta testada da sacarose (15g/l) produziu 13,1 vezes mais ácido alternárico que a menor concentração de sacarose empregada (1g/l).

Em nosso trabalho usamos o meio de cultura com a composição de cultura mais favorável e alta produção de ácido alternárico, segundo POUND & STAHMANN, 1951 e principalmente BRIAN et al.1951: meio de nitrato + sacarose na concentração de 15g/l), portanto, nas condições de meio de cultura utilizados e de isolados de fungo comprovadamente fitotóxicos, altas produções de ácido alternárico deveriam ter sido metabolizadas, e conseqüente, deveriam estar presentes nos filtrados de cultura por nós obtidos, e, portanto, a hipótese da não produção de ácido alternárico nas culturas de fungos cultivadas é pouco prová-

vel, mesmo porque, características fitotóxicas típicas deste metabólito foram observadas, evidenciando indiretamente a presença de ácido alternárico. Quanto as outras duas hipóteses, não temos evidências, no momento, nem para aceitá-las, nem para desconsiderá-las. Ambas poderiam explicar a relação entre o período de crescimento do fungo a atividade do filtrado de cultura em relação à seqüência de sintomas (necrose) da toxicidade do filtrado de cultura e a possível participação como ator principal do ácido alternárico.

As principais conclusões obtidas dos resultados de BRIAN et al (1952) são:

a) o ácido alternárico não é produzido em meio de cultura sintético ou em frutos de tomate por todas as raças de *A.solani*;

b) outras substâncias fitotóxicas estão certamente envolvidas;

c) a capacidade de produzir ácido alternárico ou outras substâncias fitotóxicas não está diretamente com a patogenicidade de uma dada raça. Estes autores a partir deste trabalho (1952) e de anteriores (1949,1951) se posicionaram em relação a importância da produção do ácido alternárico por *A.solani* para a etiologia da doença vegetal, Pinta-Preta.

As evidências a favor da importância do ácido alternárico segundo BRIAN et al. (1949;1951;1952) são:

1) o ácido alternárico, se introduzido sistematicamente nas plantas, produz lesões muitos semelhantes àquelas encontradas em certas fases da doença produzida pela infecção com *A.solani*;

2) o ácido alternárico é produzido por certas raças de *A. solani* em meio de cultura e há forte evidência que é produzido no tecido do junto do tomate maduro e, desta maneira, muito possivelmente em outros tecidos vegetais;

3) há pouca dúvida, especialmente em vista das evidências mostradas por POUND & STAHMANN (1951) que *A.solani* produz a toxina nos tecidos das plantas hospedeiras.

As evidências que estão contra a suposição que a produção do ácido alternárico é importante para a etiologia das doenças causadas por *A.solani* são:

1) das 12 raças de *A.solani* que foram estudadas pelo grupo de BRIAN (BRIAN et al.,1951,1952) apenas duas raças efetivamente produziram ácido alternárico. Entretanto, raças produtoras de ácido alternárico foram encontradas por vários autores: POUND & STAHMANN (1951) trabalhando em Wisconsin, EUA, também isolaram ácido alternárico de filtrados de culturas altamente fitotóxicos, e conferiram a este metabólito um papel importante no desenvolvimento dos sintomas da Pinta-preta. Um grupo francês em 1950 (DARPOUX et al. apud BRIAN et al.,1952) também isolou uma substância que é provavelmente ácido alternárico de raças francesas de *A.solani* Fato interessante é que este mesmo grupo francês também isolou ergosterol e dehidro-coenzima Q de *A.solani* (apud STOESSL,1969);

2) as duas raças produtoras de ácido alternárico,segundo BRIAN et al. (1952) foram as menos patogênicas das onze raças estudadas por este grupo; e

3) há evidências, tanto dos trabalhos do grupo britânico(BRIAN et al, 1951, 1952) como do grupo americano (POUND & STAHMANN, 1951) que, em relação à doença considerada (Pinta Preta) outras substâncias fitotóxicas, além do ácido alternárico , estão envolvidas.

GÄUMANN, em 1951 (apud BRIAN et al.,1952) relata uma situação semelhante nas murchas do tomateiro produzidas pelo fungo *Fusarium lycopersici*. Este autor trabalhou com duas raças de *F.lycopersici*: uma, que é praticamente não patogênica, produz grandes quantidades do fator de murcha, licomarasmina ; enquanto a outra, altamente patogênica,produz pouco do fator. O pesquisador sugeriu como explicação que o metabolismo do fungo pode ser muito diferente nos tecidos da planta hospedeira, e que nesta circunstância a raça patogênica pode estar capacitada para produzir mais licomarasmina que a raça não patogênica.

BRIAN et al. (1952) conferiram a hipótese de GÄUMANN em relação a ácido alternárico e a doença (Mancha de alternária) mantendo o crescimento do agente fitopatogênico na própria planta hospedeira

(fruto). Estes concluiram dos resultados que, mesmo o patógeno crescendo na planta hospedeira, não se poderia explicar a aparente falta de correlação entre patogenicidade e a capacidade de sintetizar o ácido alternárico. Além do mais, estes mesmos autores observaram não haver evidências diretas que o ácido alternárico seja a toxina produzida naturalmente nas plantas doentes. GÄUMANN, em 1951 (apud BRIAN et al.,1952) observou que qualificações semelhantes se aplicam quando este autor discute o papel da licomarasmina na etiologia da murcha do tomateiro produzida pelo infecção com *Fusarium*.

Como vimos, há vários pontos de contacto no estudo do papel dos metabólitos envolvidos em doenças do tomateiro, como Murcha do *Fusarium* e Mancha de Alternaria. Assim, estudos realizados com Murcha do *Fusarium* documentados na literatura poderiam trazer subsídios importantes no presente trabalho.

Na literatura fez-se um estudo extenso na procura da causa primária das murchas vasculares em plantas de tomate. No caso de doenças de murcha vascular, GÄUMANN (apud MANNERS,1982) consideram que o sintoma de murcha é devido primeiramente à atividade de certas toxinas de baixo peso molecular. A primeira destas toxinas a ser estudada foi a licomarasmina, uma fitoxina derivada de aminoácido,dipeptídio com peso molecular de 277 a fórmula empírica $C_9H_5O_2N_3$ (STROBEL,1974) obtido de culturas velhas (após 6 semanas) na quantidade de 200-300 mg/l do parasita , *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici* (STROBEL,1974). Foi a primeira das denominadas toxinas de murcha isoladas e identificadas (STROBEL,1974) e verificou-se que : causava deficiência de estrepogenina;tinha o poder de quelar F+++ livre e ligado , e injuriar a permeabilidade de células da folha (MEHROTRA,1983).

Em testes de fitotoxicidade e posteriormente tentativas de isolamento da licomarasmina das plantas doentes mostraram que esta substância não é importante em relação à murcha. Considera-se que no desenvolvimento normal da doença (Murcha de Fusarium) dificilmente aparecem manchas necróticas antes da murcha do pecíolo e que a licomarasmina, ao contrário, primeiramente induz manchas necróticas e os pecíolos não murcham (STROBEL,1974). Mas, como este autor salienta, embora o papel da licomarasmina esteja em dúvida na sintomatologia da doença, o fato de que esta toxina não específica apresente atividade biológica mantém o interesse no estudo da substância citada.

Foi sugerido mais tarde, também pelo grupo de GÄUMANN(apud MANNERS,1982) que o ácido fusárico (ver Fig. 1 VIII - Revisão de Literatura) seria a toxina operativa da doença Murcha de Fusarium em plantas de tomate (apud MANNERS,1982). Esta substância também derivada de aminoácido,teria maior probabilidade de ser responsável

pela sintomatologia, pois: em primeiro lugar, é produzido por culturas jovens jovens do patôgeno e, em segundo lugar, tem sido detectada dentro de plantas infectadas.

Ponto contra a candidatura do ácido fusárico como a causa primária de patogênese é o de que os sintomas obtidos quando se colocam plantas de tomate em soluções de ácido fusárico não correspondem aos sintomas da Murcha de Fusarium. Para o grupo de trabalho pesquisando a causa primária na Murcha de Fusarium esta discrepância se deve a que outras toxinas do patôgeno podem afetar os sintomas nas plantas doentes (apud MANNERS, 1982).

MANNERS (1982) concluiu que as evidências sugerem que o ácido fusárico desempenha algum papel no sintoma de murcha dentro do contexto da doença, mas não é a causa principal.

Acredita-se que, tanto a licomarasmina como o ácido fusárico desarrajam o metabolismo do hospedeiro (no caso, o tomateiro) pela alteração da membrana das células. Tanto nas plantas tratadas com a licomarasmina como com o ácido fusárico, houve um vazamento substancial de sais (MANNERS, 1982).

É interessante comentar que o ácido fusárico é uma toxina, na verdade, uma vivotoxina não específica, que ocorre em 3 outras espécies e outra *forma specialis* do gênero *Fusarium*, que atacam como hospedeiros: o algodão, banana e arroz, além da *forma specialis* já mencionada que ataca as plantas de tomate. A identidade química do ácido fusárico é ácido 5-n-butilpiridina e esta toxina afeta vários aspectos do metabolismo das plantas infectadas: 1) permeabilidade das membranas vegetais; 2) balanço hídrico; 3) absorção d'água não osmôtica; 4) respiração, através da diminuição da polifenol oxidase; 5) a fosforilação oxidativa é perturbada; 6) as oxidases Fe-porfirinas são inibidas e 7) o balanço dos íons orgânicos é desarranjado nas plantas doentes (MEHTROTRA, 1983).

Outro sintoma dentro do síndrome da Murcha de Fusarium é a epinastia. Epinastia também foi verificada nos testes de fitotoxicidade dos filtrados de cultura de *A. solani* em estacas de plantas de tomate, relacionada principalmente às culturas jovens (período de crescimento até em torno de 30 dias - TABELA 40).

Dados de literatura mostram que a epinastia em doenças de murcha de tomateiro estaria associada: a) ao etileno em doenças causa

das por fungos (Murcha de Fusarium) e b) a um aumento de níveis de AIA em doença causada por bactéria (murcha bacteriana), sendo que neste último caso se desconhece a causa do aumento dos níveis de auxina (MANNERS, 1982). Ácido indol-acético é produzido em cultura , conforme constatado por WOOD em 1967 (apud MANNERS, 1982).

O caso das toxinas descritas (licomarasmina e ácido fusárico) no síndrome de Murcha de Fusarium parece estar correlacionado , talvez melhor, com fatores que contribuem para a virulência do patógeno. Este fato ocorre em muitas doenças, onde as toxinas são responsáveis por, ao menos, alguns dos sintomas, mas não parecem ser os determinantes exclusivos da patogenicidade.

Síndrome da Murcha de Fusarium, que é caracterizada por epinastia, entupimento e escurecimento de vasos do xilema, necrose e murchidão pode ser considerado como um resultado de interação complexa de vivotoxinas (KIRÁLY, 1976b). Cada uma destas toxinas é capaz de reproduzir apenas uma parte do síndrome da doença. Não são, entretanto, específicas, e causam algumas mudanças fisiológicas não atribuídas ao patógeno. Por exemplo, ácido fusárico (Fig. 1 VIII - REVISÃO DA LITERATURA), uma das mais extensivamente estudadas toxinas de murcha, diminui a atividade respiratória dos tecidos do caule de tomate, enquanto tecidos naturalmente infectados com o fungo exibem um aumento marcante na respiração (apud KIRÁLY, 1967b).

O ácido fusárico é apenas uma das 3 substâncias tóxicas que contribuem para síndrome da Murcha de Verticillium. NISHIMURA (1962) sugere que a primeira substância (fitoniveina), produz a murchidão; a segunda substância (conjunto de enzimas pécticas) produz a flacidez do caule e a terceira substância (ácido fusárico) produz necrose nas folhas. Todas estas três substâncias devem estar presentes para reproduzir o síndrome completo da doença de Murcha.

Se considerarmos, como KIRÁLY (1967b) o faz, que o ácido fusárico causa apenas necrose das folhas, entende-se melhor a influência depressora desta toxina na respiração do tecido. É sabido que a respiração patológica, das plantas infectadas em estádios tardios da doença necrótica, gradualmente torna-se subnormal e, em particular, a atividade respiratória do tecido necrótico é diminuida se comparada com a planta sadia. A ação primária do ácido fusárico *in vivo* é na permeabilidade celular e, em consequência há o distúrbio

do balanço de íons inorgânicos nas plantas doentes.

Aumento da permeabilidade celular é causada por outras toxinas além do ácido fusárico, como por exemplo, o ácido alternárico, mas o papel *in vivo* destas ações tem sido questionado (KIRÁLY, 1967a).

As espécies do gênero *Helminthosporium* (gênero próximo a *Alternaria*) produzem duas classes gerais de compostos toxigênicos - peptídeos e terpenóides. Os peptídeos são específicos e os terpenóides não são específicos no caso do gênero *Helminthosporium*. Os peptídeos parecem engatilhar os distúrbios fisiológicos primários no síndrome da doença. Desta maneira, os terpenóides podem ser as toxinas necessárias para induzir um dado conjunto de sintomas, mas não os correspondentes à causa primária da patogenicidade (LUKE & GRACEN,JR. 1972b).

No gênero *Alternaria* são produzidos peptídeos que atuam como toxinas não específicas, como a tentotoxina e o alternariolide (ver REVISÃO DE LITERATURA - TABELA 3). Mas, o fato de que após a autoclavagem se manteve o efeito tóxico sugere fortemente que os metabólitos tóxicos não são de origem protéica, nem enzimática e, provavelmente,não são os peptídeos. Assim, em *Alternaria solani* os peptídeos não parecem ser engatilhadores específicos dos distúrbios fisiológicos primários, como ocorre em síndrome de doenças provocadas por fungos do gênero *Helminthosporium*.

Em *A. solani* encontramos três classes gerais de compostos (ver FIGURA 3 - REVISÃO DE LITERATURA): terpenoides, antraquinonas e solanopironas, compostos, de modo geral, recentemente descobertos e cuja toxigenicidade ainda não foi estabelecida. Recentemente, sob este aspecto estudou-se a ação de duas substâncias encontradas no fungo mencionado em relação à indução de necrose: o pigmento altersolanol (ver Fig. 49A - RESULTADOS E DISCUSSÃO) e a solanopirona A (ver Fig. 3 C.1 - REVISÃO DE LITERATURA).

O altersolanol A causou necrose em folhas, mas a ação não foi específica, pois, esta substância foi fitotóxica para batata e erv lha, além do tomate (HOLENSTEIN & STOESSL, 1983). Além de não apresentar especificidade, o pigmento foi encontrado em quantidade diminuta; o que levanta dúvidas quanto ao papel que o altersolanol A desempenha na patogenicidade.

Quanto à solanopirona testada (A=C18H2204) esta induziu lesões necróticas em folha de batata em concentração de 100 µg/100 ml (ICHINARA et al., 1983). Bostricinina, um metabólito de origem antraquinônica (ver Fig. 3 B, id) de *A. solani*, metabólito isolado inicialmente de *Bostryconema alpestri* Cesati e *Alternaria eichhorniae* é correlacionado quimicamente com altersolanol B (GORDON et al. 1972) e verificou-se ser uma fitotoxina não específica (CHARUDATTAN & RAO, 1982 apud HOLENSTEIN & STOESSL, 1983).

Dentro dos metabólitos isolados recentemente de *A. solani* se destacam os pigmentos, de origem antraquinônica e policetídea, pigmentos estes isolados e estudados, do ponto de vista químico, pelo grupo de SOTESSL no Canadá. Os pigmentos são estáveis, tem absorção no espectro de luz ultravioleta e se mostram candidatos em potencial a possíveis papéis relevantes na indução da patogenicidade na doença Pinta-preta do tomateiro causada pelo fungo *A. solani*.

4. Utilização da técnica de cultura de tecidos para obtenção de plantas resistentes à doença Pinta-preta causada por A. solani com o emprego do filtrado de cultura do fungo como pressão de seleção.

As várias fases de utilização de cultura de tecidos, com a utilização do filtrado do fungo comprovadamente fitotóxico contendo a(s) toxina(s) para recuperação de variantes somaclonais, são mostradas na FIGURA 75.

Segundo ORTON (1984) resistência a doenças é um dos mais conspícuos fenótipos caracterizados pela fenologia predominante de variação somaclonal. A observação geral é que células ou tecidos de uma planta suscetível, quando colocadas em cultura, originam populações de plantas regeneradas que exibem respostas que variam de suscetíveis a níveis de resistência consistentemente maiores que aqueles característicos da planta original (ou cultivar). A base genética de modo geral, não foi separada das fontes potencialmente não genéticas da variação, mas, resistência é geralmente estável através de um número de ciclos vegetativos, nos casos de resistência as doenças obtidas por variação somaclonal.

Variação somaclonal é uma característica conspícua entre as plantas regeneradas de calos de culturas de cana-de-açucar. Características tais como produção de cana; produção de sacarose; perfilhamento; conteúdo de fibra, estolões e outras numerosas características morfológicas finas, todas contribuem para a variação total, sendo que a resistência da doença foi um componente marcante observado neste conjunto (dados resumidos por LARKIN & SCOWCROFT, 1981). Foi verificado tanto um aumento como uma diminuição da resistência com respeito a um clone ori

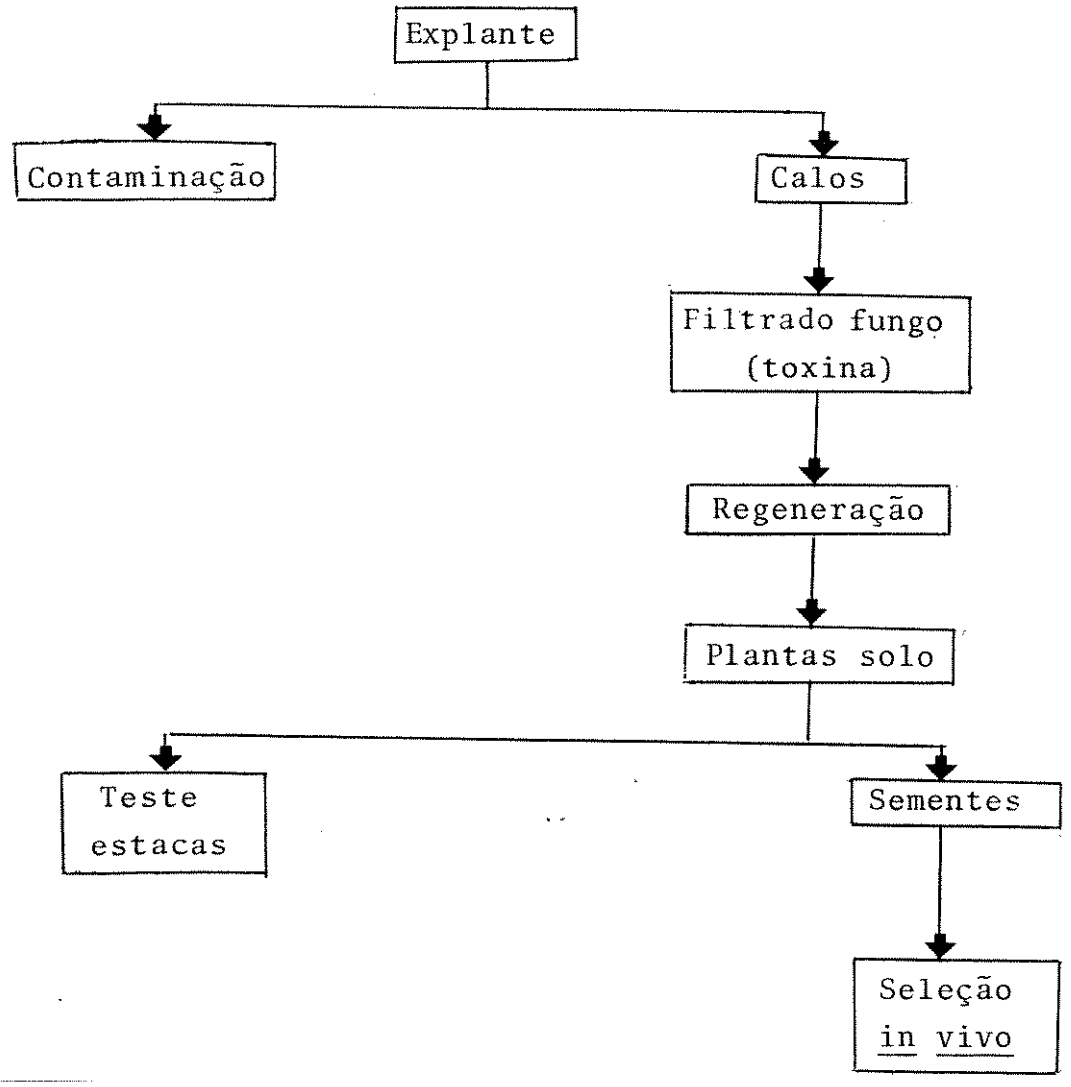


FIGURA 75 . Fluxograma das diferentes fases da cultura de tecidos, em pré-seleção com toxina de fungo para recuperação de variantes somaclonais e teste de seleção *in vivo*.

ginal, para um número de doenças: doença de Fiji (viral), mildío (*Sclerospora sacchari*) e doença de mancha ocular (*Helminthosporium sacchari*). Todas estas características foram altamente estáveis durante o curso de propagação vegetativa. A freqüência de regenerantes a *H. sacchari* não foi afetada por agentes mutagênicos tais como radiação ionizante ou etil-metano sulfonato, EMS (HEINZ et al 1977, apud ORTON, 1984).

No presente trabalho de utilização da técnica de cultura de tecidos para obtenção de plantas resistentes a doença Pinta-preta, com o emprego do filtrado do fungo como pressão de seleção, vários pontos podem ser destacados:

4.1. *em relação ao filtrado de cultura empregado*

4.1.1. *método de esterilização*

Filtragem por sistemas de membranas foi feito nos estudos *in vitro* com filtrados de cultura dos fungos *Phytophthora infestans* (BENKHE, 1979) e *Phoma lingam* (SACRISTAN, 1982). TOYODA et al *et al* 1984 utilizaram 2 métodos de esterilização para filtrados de cultura do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente causal da murcha do tomateiro: filtragem por membrana de Millipore (poro = 0,30µm) e autoclavagem. Os autores obtiveram calos de tomate selecionados para filtrado autoclavado, mas, não foram bem sucedidos em selecionar cabos de tomate que eram resistentes ao filtrado passado por Millipore. Para TOYODA *et al* 1984 este fato pode ser devido parcialmente ao efeito letal do filtrado esterilizado por Millipore. Na cultura de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* são produzidas muitas substâncias associadas com a

murcha e esta resulta da combinação da interação entre estes,por exemplo, ácido fusárico, licomarasmina, etileno e enzimas termol (TOYODA *et al* 1984). Parece que as enzimas termolábeis contidas no filtrado de cultura seriam inativadas ou decompostas por autoclavagem, o que poderia ser creditado para o resultado do efeito letal ou a habilidade de induzir murcha ser menor no filtrado autoclavado do que no filtrado passado por Millipore. Se é assim, os calos de tomate, segundo TOYODA *et al* (1984) deveriam ter adquirido a resistência àquelas enzimas degradadoras de parede celular, assim como às toxinas, para expressar resistência ao filtrado passado por Millipore. Os resultados apresentados por TOYODA *et al* (1984) com calos de tomate, nos quais os calos resistentes ao filtrado autoclavado não foram resistentes ao filtrado passado por Millipore, reforçam a especulação mencionada para o caso de *F. oxysporum*.

No presente trabalho não houve diferença estatística, em nenhuma fase, desde crescimento dos calos; regeneração até sobrevivência das plantas regeneradas no solo, entre o filtrado autoclavado e o filtrado esterilizado por sistemas de membranas de Millipore, como mostrado na TABELA 45. Para *A. solani* o tratamento pelo calor não afetou o efeito do filtrado de cultura , nem *in vitro*, nem *in vivo*, o que reforça a idéia de que enzimas não estariam ligadas à doença da Pinta-preta,como parecem estar envolvidas na doença da murcha do tomateiro.

4.1.2. *efeito da concentração do filtrado*

Para seleção efetiva de células resistentes, STRAUSS *et al* 1980 (*apud* TOYODA *et al* 1984) mostraram que é muito importante se estabelecer uma concentração adequada de substancias tó

xicas, porque nas concentrações muito baixas, as células que escaparam por razões puramente fisiológicas poderiam sobrepujar em número os mutantes verdadeiros e em concentrações muito altas, os variantes potencialmente resistentes seriam incapazes de crescer. Este fato é especialmente importante, quando são usadas grandes massas de células, tais como pedaços grandes de calo; pois, a infiltração de substâncias tóxicas nas células da camada mais profunda pode ser crítica para se determinar a dose-resposta das células.

Observou-se, no presente trabalho, efeito da concentração do filtrado. Quanto à inibição de crescimento de calos, nenhuma concentração testada (10, 25, 50 e 75% v/v) inibiu significativamente o crescimento de calos, quando se utilizou calos como explante inicial. As menores concentrações testadas (10 e 25% v/v) não foram efetivas *in vitro* (ver experimentos nº 1 e nº 3), embora, o fossem *in vivo* quando a fitotoxicidade do filtrado foi avaliada pelo método de estacas (*ver* FIGURA 58a). Em relação a promoção de crescimento, fato surpreendente ocorrido na utilização do filtrado de cultura de *A. solani in vitro*, verificou-se que a concentração de 75% v/v foi muito alta, tendo o ótimo se situado, para a promoção, tanto no crescimento, como regeneração e enraizamento na concentração de 50% v/v.

4.2. *em relação a composição do meio tóxico seletivo*

4.2.1. *Composição do meio seletivo proveniente da cultura do fungo*

Tanto no 1º como no 4º experimento utilizou-se o isolado Santa Eliza, do fungo, diferindo, porém, na composição química

do meio de cultura do fungo. No 1º experimento utilizou-se meio líquido natural e no 4º experimento foi utilizado meio líquido de natureza química conhecida (Czapek-Dox) como feito em todos os demais experimentos. Tanto no 1º como no 4º experimentos foram empregados calos de 12-15 dias de idade, como explantes iniciais. No caso do 4º experimento, quando se utilizou o meio de cultura de Czapek-Dox, o calo que foi mantido em presença do filtrado de cultura de 33 dias de idade apresentou-se friável, enquanto que os calos controle, no mesmo experimento, sem filtrado de cultura, não apresentaram esta característica.

Outro aspecto influenciado pela composição do meio de cultura do fungo foi a promoção de crescimento observada *in vitro* com o meio seletivo. Com a utilização do meio de cultura natural houve perda da promoção após a autoclavagem, apenas na fase de indução de calos, (experimento nº 1) com o filtrado de 19 dias, o que não ocorreu quando se utilizou meio de cultura de natureza química conhecida (experimento nº 4 - filtrado de 33 dias) também na fase de indução de calos. É interessante lembrar que este foi o período de cultura do fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizado por TOYODA et al 1984 para selecionar calos de tomate *in vitro*, com o qual ocorreu alta inibição, não tendo se obtido, inclusive, regeneração, mesmo tendo-se usado, no trabalho citado, filtrados diluídos (filtrado autoclavado, 2 vezes diluição e filtrado esterilizado por membranas de Millipore, 20 vezes diluido).

A perda de promoção por autoclavagem, apenas no 1º experimento, parece indicar a possível depredação das substâncias que compõem o suco de legumes natural, degradação cujo produto pode alterar a resposta *in vitro* dos calos à presença do filtrado de cultura de *A. solani*, no caso, em questão, isolado Santa

Eliza. Este resultado enfatiza mais a idéia, que mesmo em estudos com cultura de fungo, torna-se mais conveniente o uso de meio de cultura de natureza química conhecida, pois, o emprego em *A. solani* deste tipo de meio de cultura (Czapek-Dox) posteriormente, *in vitro*, não teve efeito estatisticamente significativo.

4.2.2. *Composição do meio seletivo proveniente do meio de cultura padrão (To-M_3)*

Com o meio de cultura do fungo de natureza química conhecida (Czapek-Dox), verificou-se que a concentração salina do meio de cultura padrão de regeneração (MS) não afetou a fase de formação de calo, nem em presença do filtrado (FIGURA 57A - fase 1) nem na ausência do filtrado (FIGURA 57-B - fase 1). Quanto a fase de regeneração, a concentração de 75% v/v do meio MS se destacou das demais (FIGURA 57A - fase 2), enquanto que na ausência do filtrado (FIGURA 57B - fase 2) a concentração de 50% v/v do meio MS foi ligeiramente superior as demais. Devemos nos lembrar de 2 aspectos: a composição hormonal é a mesma em todos os casos (padrão = AIA 25µM e 6-BA 10µM), assim como o foram os explantes iniciais, calos. Podemos, pois, comparar os resultados citados (experimento nº 3) com experimento nº 2, experimento este que nas mesmas condições apresenta nível mais alto de concentração de MS (diluído a metade do original). Verificamos que a concentração do meio MS empregada parece influenciar a regenera-

ção, pois, a regeneração foi melnor com a concentração salina mais alta (diluída à metade do original no experimento nº 2) do que na concentração salina menor (diluida a 1/4 do original) no experimento nº 3.

4.2.3. reguladores de crescimento empregados

SHEPARD (1981) verificou que auxinas usadas para estimular o crescimento das células obtidas a partir de protoplastos de batata tiveram um efeito aparente na freqüência de variantes assim como na eficiência de plaqueamento e na freqüência de regeneração da parte aérea. Para ORTON (1984) esta evidência, embora usada para reforçar a noção que a variação surge durante o curto período de crescimento do calo, período este intercalado entre o plaqueamento dos protoplastos e organogênese, não é ainda conclusiva.

BENKHE (1979) selecionando calos de batata para resistência a filtrados de cultura de *Phytophthora infestans* e procurando, inclusive, regeneração de plantas resistentes, não utilizou no meio de indução de calo, citocininas, apenas auxina, no calo a sintética ANA.

No presente trabalho, para melhor regeneração foi necessária a presença de auxina, conjuntamente com a citocinina. Em nossos experimentos, a presença de citocinina, mesmo em baixa concentração foi benéfica ao cultivo *in vitro* do tomateiro, mesmo para submeristema (ver FIGURA 28), o que parece se constituir em fato, de modo geral, no tomateiro, pois, ILLG & SIQUEIRA (1984) obtiveram alta freqüência de plantas, em cultivares de mesa de tomate, por nós não utilizados, submetendo os calos morfogenéticos a uma concentração de 10µM de BA, sem auxina. Caso semelhante ocorre em outra espécie de interesse comercial, o café, no qual a dife

renciação só ocorre no meio secundário ou de indução no qual a auxina empregada anteriormente (no caso 2,4-D) é removida (SÖNDAHL et al 1979).

4.3. Efeito do explante inicial

4.3.1. idade do explante

Em estudos de pressão de seleção *in vitro* foram utilizados calos como explantes iniciais, tanto para tomate em relação a filtrados de patógenos (TOYODA et al 1984) como para várias espécies em relação a substâncias tóxicas em geral (incluindo 2,4-D) trabalho extenso realizado por ZILKAH & GREISSEL , 1977 e ZILKAH et al 1977.

No presente trabalho, o efeito inibidor do filtrado foi observado apenas quando se utilizou o explante recém-excisado. Com a concentração de 75% v/v houve inibição praticamente total, havendo pequenissima proliferação de calo,pouquíssima divisão celular, inviabilizando, pois, qualquer regeneração e conseqüente seleção *in vitro* (FIGURA 57B).

Com a utilização de calos como explante inicial houve o efeito surpreendente de promoção, tanto na fase de formação de calos, como nas etapas subseqüentes; em todos os ensaios realizados, mas, este efeito esteve ligado intrinsicamente ao período de crescimento do fungo em meio líquido de Czakek-Dox (experimento nº 4) e conseqüentemente à liberação de metabólitos pelo próprio fungo.

4.3.2. origem do explante

O efeito da origem do explante não foi único, pois ,

houve interação de vários fatores conjugados:

4.3.2.1. Fitorreguladores

Em presença de auxina, destaca-se nitidamente a maior regeneração com a utilização de folha definitiva como explante inicial, independente da composição do meio seletivo (ver FIGURA 56). Em ausência de auxina, o quadro de regeneração se altera completamente em relação a melhor origem do explante. Mas, a mais alta freqüência de regeneração observada em presença de auxina e citocinina, recomenda a presença de auxina, com folha definitiva como explante inicial, do que sem auxina, com o uso de cotilédone como explante inicial.

4.3.2.2. Composição do meio salino, mesma combinação de fitorreguladores

Na composição do meio salino MS deluído a 1/4 da composição original, pode-se observar regeneração com explante originado de caule e nenhuma com explante originado de cotilédone, já com composição mais alta, do meio MS, houve regeneração, utilizando-se cotilédone como explante inicial, mesmo na ausência de auxina, apenas com BA 10μM (FIGURA 57).

4.3.2.3. material vegetal

Parece haver influência do material vegetal empregado, mas, a grande variação observada do mesmo material em todos os tratamentos, e em cada tratamento a diversidade de comportamento apresentada pelos diversos materiais vegetais testados, não nos permite qualquer conclusão definitiva.

4.4. Efeito promotor do filtrado de cultura de *A. solani* em culturas de tomate *in vitro*

De todos os experimentos realizados com pressão de seleção, o fato que mais se destaca é a surpreendente promoção de crescimento observada, quer com o isolado Santa Eliza (experimentos nºs 1 e 4), quer com o isolado Mococa (experimentos nºs 2 e 3). Na avaliação do crescimento dos calos após 15 dias, observou se promoção de crescimento dos calos e em alguns experimentos até promoção de regeneração. Esta promoção, devida a presença do filtrado de cultura do fungo poderia ser devida, talvez, a liberação por *A. solani* de hormônios vegetais como já foi dito, ou então, promoção devido a presença de oligossacarídeos que segundo ALBERSHEIM & DARVILL (1985) controlariam funções como crescimento, desenvolvimento, reprodução, defesa contra doenças e inclusive em morfogênese *in vitro*.

O trabalho de KIEM TRAN THANH VAN e colaboradores,1985, relatado por ALBERSHEIM & DARVILL (1985) com explantes de tabaco e vários oligossacarídeos, utilizou 20 explantes por tratamento , número também utilizado por nós no 4º experimento (com excessão , do controle recém-excisado no qual foram utilizados 276 explantes). No trabalho citado foram obtidos calos não diferenciados, raízes, folhas e partes aéreas vegetativas e partes florais, nas mesmas combinações e concentrações de fitorreguladores, variando-se apenas os oligossacarídeos. ALBERSHEIM & DARVILL (1985) lançam a hipótese de que o efeito verdadeiro da auxina, citocinina e nível de acidez é influenciar a liberação e modificação na ordem de mensageiros químicos, cada um deles regulando reações bioquímicas responsáveis por um programa de desenvolvimento particular. Oligossacarídeos são fragmentos de parede celular os quais são libera-

dos da parede celular por enzimas, sendo que enzimas diferentes liberam oligossacarídeos diferentes. Há indicações que hormônios vegetais pleiotrópicos, tais como auxinas e giberelinas, poderiam funcionar verdadeiramente pela ativação de enzimas que liberam estes oligossacarídeos ou mensageiros químicos mais específicos da parede celular. O fungo (*A. solani*) poderia liberar durante o crescimento ou os hormônios vegetais, que por sua vez ativariam os oligossacarídeos, ou então, liberaria diretamente os oligossacarídeos como exsudato. Em ambos os casos, o resultado *in vitro* seria a promoção de crescimento e/ou morfogênese, nas várias fases do desenvolvimento.

Esta hipótese explicaria, talvez, o efeito promotor encontrado tanto na fase de formação de calo, como nas fases subseqüentes: de regeneração (qualitativa e quantitativamente) e enraizamento, promoções estes observadas para ambos os isolados de fungo testados em pressão de seleção: Santa Eliza (1º e 4º experimentos) e Mococa (2º e 3º experimentos). Também, para ambos os isolados cultivados em meio sintético de natureza química conhecida (Czapek-Dox) o tratamento de calor aumentou estatisticamente a promoção de crescimento de calos, em presença do filtrado do isolado Mococa (3º experimento) e do filtrado do isolado Santa Eliza (4º experimento). É interessante lembrar que esta promoção se ateve a determinadas fases de crescimento do fungo (fases II e III - experimentos nºs 1, 2, 3 e 4 - 19, 21 e 33 dias respectivamente) e não ocorreu na fase final do crescimento do fungo (fase IV - 60 dias - experimento nº 4), com a utilização do calo como explante inicial.

Quanto a interação entre o período de crescimento do fungo em meio líquido e o processo de autoclavagem, verifica-se que para o período de incubação do fungo de 33 dias, o efeito

fitotóxico dos filtrados *in vitro* não é afetado pela autoclavagem, mas, com o filtrado de cultura correspondente a 60 dias de incubação do fungo a autoclavagem acentuou o efeito fitotóxico *in vivo* (FIGURA 51).

Na literatura, em relação ao estudo patógeno-hospedeiro com técnicas de cultura de tecidos podemos citar o estudo do efeito do filtrado de cultura do patógeno da murcha do tomateiro. TOYODA et al 1984 usaram calos de tecidos organizados de sementes germinadas e gemas axilares. Nos testes *in vivo* os autores verificaram que plantas tratadas com filtrado bruto e filtrado esterilizado com filtros de membranas com tamanho padronizado de poros (Millipore) o grau e o tempo de ocorrência de murcha nas plantas foi semelhante, enquanto que o filtrado autoclavado teve efeito em grau semelhante, mas, retardado em relação aos demais filtrados. TOYODA et al (1984) não foram bem sucedidos em isolar calos de tomate que fossem resistentes ao filtrado esterilizado por membranas de Millipore, embora, conseguissem calos resistentes ao filtrado autoclavado. Mas, como frisado pelos autores, para indução de plantas resistentes às doenças, com o uso de células cultivadas das plantas hospedeiras, a seleção de células resistentes deveria ser seguida por regeneração destas células e a resistência adquirida deveria ser re-examinada nas plantas regeneradas, regeneração esta que não foi obtida pelos autores citados.

No presente trabalho, em relação a indução de plantas resistentes a *A. solani*, usando-se as células cultivadas de plantas de tomate, a seleção das células resistentes foi seguida de regeneração das células submetidas a pressão de seleção. Mas, para esta regeneração houve um emaranhado de efeitos, alguns conflitantes entre si. Foram feitos dezenas de experimentos para

se tentar desenrolar o nó deste emaranhado com as várias variáveis incluídas: 1) período de incubação do fungo em meio líquido de Czapek-Dox; 2) esterilização do filtrado de cultura; 3) composição salina do meio seletivo; 4) combinação e tipo de reguladores de crescimento utilizados no meio seletivo; 5) material vegetal da planta hospedeira empregado; 6) origem de explante; 7) tipo de explante inicial; 8) período de permanência dos explantes no meio seletivo; 9) melhor período para avaliação do efeito de pressão de seleção; 10) quantidade e qualidade de regeneração observada durante a pressão de seleção e 11) sobrevivência das plantas selecionadas. Entretanto, os dados obtidos foram tão ou até mais conflitantes que os apresentados no presente trabalho o que confirma que o aspecto de regeneração em meio de pressão de seleção é um aspecto complexo no qual vários fatores atuam e se interagem.

Pelo presente trabalho, porém, verificou-se que para regeneração em meio seletivo com o filtrado de cultura de *A. solani*, vários aspectos se sobressairam:

1) a composição salina do meio seletivo - não pode ser muito diluída (no máximo, metade da concentração MS original;

2) o filtrado de cultura pode ser empregado após autoclavagem e diluído à metade (50% v/v);

3) o meio seletivo deve conter, de preferência, auxina e citocinina;

4) explante inicial calo de 12-15 dias de idade, incubado no escuro, como também feito por BENKHE (1979), no caso de calos de batata em relação ao filtrado de *P. infestans*;

5) calos originados de folha definitiva de plântulas crescidas assepticamente.

Empregando-se os fatores descritos verificou-se que há maior probabilidade de se obter plantas no meio de pressão de sele

ção com os filtrados de cultura de *A. solani* (isolados Santa Eliza e Mococa), utilizando-se a variação natural da espécie (tomate) sem o emprego de agentes mutagênicos. Trabalhos anteriores de regeneração com meio seletivo com metabólitos tóxicos de fungos ou bactérias, citados na literatura, utilizaram indução de mutação, não apenas a variabilidade normal; com mutação química, CARLSON (1973) com EMS 0,25% por 1 hora; TOYODA et al (1984) com N-metil-N'nitro-N-nitroso guanidina ou mutação física, empregada por BENKHE (1979) com raios X (0,516 coulomb/kg = 2.000R). Mas, o emprego de mutagênicos é opcional, pois, em outros trabalhos como o de GENGENBACH et al (1978) que utilizaram calos de milho e toxina HMT como sistema experimental, foi se capaz de selecionar calos resistentes à toxina HMT, sem o uso de mutagênicos.

Numa revisão publicada em 1978 sobre o uso de fitotoxinas, em cultura de células e protoplastos, para obtenção de plantas resistentes às doenças, plantas estas úteis do ponto de vista agronômico, EARLE propôs 8 etapas que estariam envolvidas no processo:

1) culturas mutagênicas (opcional)
2) exposição das culturas à fitotoxina produzida pelo patógeno
3) seleção de material resistente
4) plantas regeneradas
5) teste de plantas resistentes para resistência à toxina
6) testes das plantas para resistência ao patógeno
7) estudo da herança da resistência em cruzamentos sexuais ou estabilidade da resistência durante a propagação vegetativa
8) material resistente colocado em programa de melhoramento.

EARLE (1978) frisa que a etapa 2) de exposição à toxina provavelmente não é essencial: segundo a autora é possível, também, se selecionar calos resistentes às toxinas a partir de calos sensíveis transferidos diretamente ao meio com altas concentrações de toxina, como foi feito no presente trabalho. As etapas 2), 3) e 4) do esquema proposto por EARLE (1978) foram realizadas no presente trabalho de seleção à(s) toxina(s) de *A.solani* com utilização da técnica de cultura de tecidos e estão agrupadas no item 4 do presente trabalho (ver MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO, DISCUSSÃO GERAL) A etapa 5) do esquema proposto foi, também, por nós realizada e está descrita no item 5 do presente trabalho (ver MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO, DISCUSSÃO GERAL). As etapas 6), 7) e 8) do esquema proposto por EARLE (1978) se relacionariam mais com a área de melhoramento vegetal. Estas etapas, na seleção de plantas resistentes a *A. solani*, serão desenvolvidas na Secção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas, sob a supervisão do Engº Agrº Walter José Siqueira.

5. Testes de resistência/suscetibilidade em plantas regeneradas (gerações R_0 e R_1) através da utilização das técnicas de cultura de tecidos com o emprego do filtrado de cultura do fungo como pressão de seleção

Embora em trabalhos anteriores com *A. solani* e fitotoxidade de filtrado tenham utilizado medidas quantitativas das lesões resultantes do teste de toxina (MATERN et al 1978), as notas e os índices de notas por nós coletados, como coletados por outros autores (exemplo, LAWSON & SUMMERS, 1984 na reação de plantas de tomate a bactéria *Xanthomonas campestris* (Doidge) Downson mostraram ser adequados, como pode ser visto na FIGURA 62, onde se observa a

linearidade da resposta fitotóxica e concentração do filtrado, e aumento paralelo da fitotoxicidade com período mais prolongado de incubação do fungo em meio líquido de Czapek-Dox (FIGURA 52B).

Testes de resistência/suscetibilidade com filtrados de cultura de fungos do gênero *Alternaria* foram feitos em relação ao sintoma de necrose. De *A. kikuchiana* foi isolada 1 toxina específica chamada AK (ver FIGURA 2 e Tabela 4. REVISÃO DA LITERATURA) em 1973 por grupos japoneses. Posteriormente verificou-se que pelo menos 3 toxinas específicas ao hospedeiro são produzidas em cultura de *A. kikuchiana*. Dois produtos purificados produziram necrose venal nas concentrações de 0,01 e 0,1mg/ml em folhas suscetíveis, mas, não afetaram as variedades resistentes em concentrações acima de 100mg/ml. Muitas toxinas não específicas (ácido tenuazônico, tentotoxina, alternariol e o correspondente eter monoeil-ver Tabela 3 - REVISÃO DA LITERATURA) foram isoladas da mesma cultura e poderiam talvez, ter efeito em necrose (KONO et al 1981; NISHIMURA & KOHMOTO, 1983b). Verificou-se, que tanto os isolados de *A. kikuchiana* como de *A. mali* produzem em cultura tentotoxina, em adição as toxinas específicas ao hospedeiro (NISHIMURA , 1979 apud DURBIN & STEELE, 1979). No caso de *A. mali* a toxina específica é a toxina - AM, ver FIGURA 2c, Tabela 4 - REVISÃO DA LITERATURA).

Nos bioensaios que utilizam necrose como sintoma fundamental verificou-se que a concentração limiar da toxina AK para causar necrose venal foi de 0,2 mg/ml para a linha sensível e 1,0mg/ml para a linha resistente (KONO et al 1981). Estes autores verificaram que a toxina - AM é relativamente estável e apresenta um dos estudos mais completos de estrutura de toxinas específicas ao hospedeiro que foi adequadamente documentada do ponto de vista de estrutura.

Em relação a testes de resistência/suscetibilidade empregando testes de germinação, são relatados casos na literatura, tanto para resistência a filtrados de fungos, como a substâncias tóxicas, por exemplo, herbicidas. No caso do herbicida picloram (ácido 4 - amino - 3, 5, 6 - tricloropicolimeo) foi obtida resistência de 4 linhas celulares de tabaco utilizando-se a técnica de cultura de tecidos e verificou-se que a resistência foi herdada como um calo mendeliano simples dominante. Utilizou-se, neste caso, explantes obtidos de plântulas estéreis; como o foi também no presente trabalho, entre outros, e a seleção foi feita ao nível de germinação em presença do herbicida e também ao nível de calo (CHALEFF & PARSONS, 1978).

No teste de germinação, verificou-se que a mesma toxina pode ter efeito oposto, conforme os órgãos envolvidos, por exemplo, a toxina helmintosporal é promotora de crescimento para caules e toxigênica para raízes de arroz (LUKE & GRACEN JR. 1972). O helmintosporal é uma toxina fitotóxica, produzida por *H. sativum*, toxina cuja estrutura é de cem terpenóide cíclico, semelhante às giberelinas (LUKE & GRACEN JR. 1972).

Plantas obtidas de variação somaclonal também foram testadas. A planta D1 testada nas 2a. e 3a. montagem do teste dos discos foliares e no teste de folíolos foi a progênie de planta regenerada (Ro) que mostrou crescimento vigoroso no campo (sigla Si-70/F/13 - ver histórico e Fig. 39). Em ambos os tipos de testes de resistência/suscetibilidade utilizados (discos e folíolos), a planta D1 mostrou-se ser significativamente mais sucetível que a planta controle regenerada em presença apenas do filtrado de cultura ($p \leq 0.05$). Assim, embora esta planta tenha se destacado, nas avaliações de características morfológicas obtidas por variação somaclonal, pelo vigor apresentado (ver Fig. 39a), em relação à resistência ao filtrado de cultura do agente causal da doença Pinta-

preta, apresentou-se inclusive, mais suscetível que as plantas controle e, não diferindo estatisticamente ($p \geq 0.05$) da outra planta obtida por variação somaclonal (D18 = Si-119-2/H/01a na geração Ro) que não se notabilizou por qualquer característica morfológica especial, tendo se revelado suscetível ao filtrado de cultura pelo teste de estacas na planta Ro (ver TABELA 48).

No caso da planta D18, pois, houve concordância entre o resultado do teste de resistência utilizado na planta Ro (método de estacas) com o resultado do teste de resistência utilizado na planta R1 (método de discos foliares), ambos os testes revelando a suscetibilidade do variante somaclonal, sendo que na geração R1 (D18) este variante se mostrou mais suscetível que a planta regenerada com pressão de seleção em meio de cultura do fungo per si.

Mas, o outro variante somaclonal testado nas 2 gerações apresentou resultado oposto nos 2 tipos de testes de resistência empregados: na geração Ro apresentou-se muito suscetível no teste de estacas (ver resultado da planta A-2/IIa/05a na TABELA 47) e na geração R1 apresentou-se como a mais resistente das plantas testadas, diferença altamente significativa ($p \leq 0.001$) em 2 tipos de testes de resistência utilizados nas plantas R1: de discos e de folíolos, sendo que os testes de discos com esta planta (B3) foram realizados em 3 ocasiões diferentes para se confirmar a resistência encontrada na planta B3. Nas 3 ocasiões, as diferenças de resistência foram estatisticamente significativas ($p \leq 0.001$), conforme discutido no ítem 5.2 de RESULTADOS E DISCUSSÃO. Indiscutivelmente, o material B3 teve a característica de resistência ao filtrado de cultura de *A. solani* (no caso, resistência aos metabólitos tóxicos excretados pelo fungo) incorporado ao genótipo, mas, esta resistência não se expressou no teste de estacas. Pode-se argumentar 2 pontos: 1º) o teste de estacas foi feito apenas 1 vez e, portanto, o resultado pode não ter expressado a verda

de e 2º) se o resultado do teste de estacas expressou a verdade, o método de estacas não é inteiramente adequado para inferir resistência . Pode ter ocorrido ambos os casos, mas, é inegável que os resultados dos testes de discos, por sua acurácia, por resposta de ação mais específica e pela excelência já demonstrada no caso de testes de resistência em genótipos de cafeeiro, deve ser usado preferivelmente para nortear o rumo dos resultados e, assim, a conclusão que nos parece inegável pelos resultados obtidos com os testes de resistência utilizando discos, é a de que o material vegetal B3 apresentou a característica de resistência incorporada ao genótipo, sendo que esta característica altamente desejável, foi decorrência de utilização do filtrado de cultura de *A. solani in vitro*. Plantas obtidas por variação somaclonal , por sua vez, apresentaram-se mais suscetíveis, nos mesmos testes de resistência empregados, que as plantas S originadas de sementes.

SACRISTAN (1985) após ter tratado células de *Brassica napus* com mutagênico, colocou-as no meio seletivo com o filtrado de cultura do patógeno *Phoma lingam* e observou que, enquanto 22% dos regenerantes das culturas seletivas apresentam resposta de resistência ou tolerância à infecção, somente 4% das plantas regeneradas das culturas controle mostrou aumento de tolerância. As progênies de regenerantes mostraram que as resistências adquiridas foram parcialmente herdadas. A segregação observada em algumas progênies - geralmente correlacionadas com variabilidade morfológica - é provavelmente devida à variabilidade cromossômica. O sistema de seleção foi em relação à fitotoxina produzida pelo fungo que tem efeito inibitório em plântulas e não é estritamente específica, atacando todas as plantas não-hospedeiras. A autora testou um total de 30 plantas e verificou que, embora nem todos os regenerantes das culturas selecionadas mostraram resistência aumentada, e a proporção de plantas resistentes ou tolerantes foi significativamente maior entre os regenerantes de culturas selecionadas do que

entre as culturas controle.

Os dados de SÁCRISTAN (1985) e do presente trabalho mostram claramente que a utilização da técnica de cultura de tecidos, com pressão de seleção é um caminho viável e efetivo para se obter resistência rápida em materiais suscetíveis às doenças fúngicas, notadamente as que atuam através de metabolítos tóxicos, por exemplo, toxinas.

VII - BIBLIOGRAFIA

AINSWORTH, G.C. & BISBY, G.R. 1971. Dictionary of the fungi. 6a. edição. 663 pp. Commonwealth Mycological Institute. Kew.

ALBERSHEIM, P. & ANDERSON-PROUTY, A. 1975. Carbohydrates, proteins, cell surfaces and the biochemistry of pathogenisis. Ann. Rev. Plant Physiol. 26: 31-52.

ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. 1985. Oligosacharins. Scientific American. 253(3): 44-50.

ALEXOPOULOS, C.J. & MIMS, C.W. 1972. Introductory mycology. 3a. ed. 632 pp. John Wiley & Sons, Inc. New York, EUA.

AMMATI, M., MURASHIGE, T. & THOMASON, I.J. 1984. Retention of resistance to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* by *Lycopersicon* plants reproduced through tissue culture. Plant Science Letters 35: 247-250.

ANDERLINI, R. 1982. A cultura do tomate. Litexa. Portugal. 164 pp.

ANIOL, A. 1983. Aluminium uptake by roots of two winter wheat varieties of different tolerance to aluminium. Biochem. Physiol. Pflanzen. 178: 11-20.

ANTONOVICS, J. 1971. The effects of a heterogeneous environment on the genetics of natural populations. American Scientist 59(5): 593-599.

AVRDC Progress Report '78. Asian Vegetable Research and Development Center. 1979. Progress Report for 1978 - Tomato - pp. 7-21. Shanhua, Taiwan, Republic of China.

ARNASON, T.J. & SALPATHY, D. 1971. "Induction of Mutations in Barley during a Post-Treatment Period of 24 Hours after EMS Treatment". *in* R.A.Nilan (edl.) *Barley Genetics*, 119-126 -

Proc. 2nd Int. Barley Genetics Symp., State Univ. Press, Pullman.

BAJAJ, Y.P.S. & SAETTLER, A.W. 1970. Effect of halotoxin containing filtrates of *Pseudomonas phaseolicola* on the growth of beam callus tissue. Phytopathol. 60: 1065-1067.

BARBIER, M. & DULIEU, H.L. 1980. Effets génétiques observés sur des plantes de Tabac regénérées à partir de cotylédons por culture *in vitro*. Ann. Amélior. Plant. 30: 321-344.

BARKSDALE, T.H. & STONER, A.K. 1973. Segregation for horizontal resistance to tomato early blight. Plant Disease Report 57 (11): 964-965.

BARRASS, R. 1977. Alimento e Povo. A importância econômica da Biologia E. Malavolta, trad. 243 pp. Edições Melhoramentos, Editora da Universidade de São Paulo, SP.

BARTELS-KEITH, J.R. & GROVE, J.F. 1952. The structure of alternaric acid. Proceedings of the Chemical Society 4056, 398-399.

BASU, P.K. 1974. Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomato cultures. Can. Plant Dis. Surv. 54(2): 45-51.

BATISTA ALVES, S. 1984. Controle biológico de pragas: Fungos. Palestra realizada no II Seminários de Biotecnologia Agrícola (SEBIAGRI II), 30 de agosto de 1984. Piracicaba, SP.

BEHKI, R.M. & LESLEY, S.M. 1976. *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Lycopersicum esculentum* (tomato). Can. J. Bot. 54(21): 2409-2414.

BEHNKE, M. 1979. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophtora infestans* and regeneration of resistant plants. Theor. Appli. Genet. 55: 60-71.

BERGAMIN FILHO, A. & CARDOSO, C.O.N. 1980. Doenças de seringueira - *Hevea brasiliensis* L. *In* "Manual de Fitopatologia - Volu

me II - Doenças das plantas cultivadas" (F. Gelli, coord.) . Capítulo 32, pp. 459-474. Editora Agronômica CERES Ltda., São Paulo, SP.

BICKEL, P.J. & DOKSUM, K.A. 1977. Mathematical statistics. Basic ideas and selected topics. Holden-Day Inc., San Francisco.

BICKFORD, E.D. & DUNN, S. 1972. Lighting for plant growth. 221 pp. The Kent State University Press.

BONDE, R. 1929. Physiological strains of *Alternaria solani*. Phytopathology 19. 553-548.

BORTOLETO, E.E. & UENO, L.H. 1980. Tomate. Inf. Econ. São Paulo, v. 10, nº 1, pp. 35-40.

BOX, G.E.P. & HUNTER, W.E. & HUNTER, J.S. 1978. Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building. 652 pp. John Wiley & Sons, New York.

BRANCÃO, N.; RIBEIRO, A.S. & PORTO, M.P. 1984. Reações de cultivares de beterraba açucareira às principais doenças fúngicas . *In* "Beterraba Açucareira" - Anais da II Reunião Técnica Anual. Pelotas, RS, de 02 a 04 de agosto de 1983, pp. 67-76. EMBRAPA, VEPAE Pelotas, RS.

BRIAN, P.W.; CURTIS, P.J.; HEMMING, H.G.; UNWIN, C.H. & WRIGHT, J. 1949. Alternaric acid, a biologically active metabolic product of the fungus *Alternaria solani*. Nature (London) 164: 534.

BRIAN, P.W.; CURTIS, P.J.; HEMMING, H.G.; JEFFREYS, E.G.; UNWIN, C.H. & WRIGHT, J.M. 1951. Alternaric acid: a biologically active metabolic product of *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Jones and Grout. Production, isolation and antifungal properties. Journal of General Microbiology 5: 619-632.

BROCK, R.D. 1950. A search for resistance to defoliation by *A. solani* in the genus *Lycopersicon*. J. Australian Inst. Agr. Sc. 16: 90-94.

CAMPACI, C.A. 1982. Normas para controle de doenças do tomateiro. Dirigente Rural XXIII (12), 35-38.

CHARUDATTAN, R. & WALKER, H.L. (eds.). 1982. Biological control of weeds with plant pathogens, 293 pp. A Wiley - Interscience Publication - John Wiley & Sons, New York, USA.

CARLSON, N.P.S. 1973. Methionine sulfomixine resistant mutants of tobacco. Science 180: 1366-1368.

CARRIJO, I.V. 1982. Recomendações para amenizar a deficiência de cálcio em tomate. Agroceres, Dezembro, pág. 8.

CARVALHO, P.C.T. 1978. Importância das doenças das plantas. *In* Manual de Fitopatologia. Volume I, pp. 15-25. Princípios e conceitos. F. Galli Coordenador, Editôra Agronômica CERES Ltda., São Paulo.

CARVALHO, P.C.T. & TOKESHI, H. 1980. Doenças do tomateiro. *In* Manual de Fitopatologia. Volume II, pp. 511-552. Doenças das plantas cultivadas. F. Galli Coordenador. Editôra Agronômica CERES Ltda., São Paulo

CHALEFF, R.S. 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. Science 219: 676-682.

CHALEFF, R.S. & PARSONS, M.F. 1978. Direct selection *in vitro* for herbicide-resistant mutants of *Nicotiana tabacum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (10): 5104-5107.

CHERFAS, J. 1985. When is a tree more than a tree? New Scientist No. 1461, 42-45.

COSTA, W.M.; ESKES, A.B. & RIBEIRO, I.J.A. 1978. Avaliação do nível de resistência do cafeeiro à *H. vastatrix*. Bragantia 37 (nota nº 4): XXIII-XXIX.

COSTA, W.M. da; BRAGHINI, M.T.; CARVALHO, A.; ESKES, A. B. & HOOGSTRATEN, J.G.J. 1983. Resistência horizontal do cafeeiro à *Hemileia vastratix*. Biológico, São Paulo, 49 (11/12) : 10-11.

CUANTERO, J. & CUBERO, J.I. 1982. Genotype-environment interaction in tomato. Theor. Appl. Genet. 61: 273-277.

CHUPP, C.S. & SHERF, A.F. 1980. Vegetable diseases and their control. The Ronald Press Company. New York. 693 pp.

DALY, J.M. & DEVERALL, B.J. 1983. Toxins and Plant Pathogenesis 181 pp. Academic Press, Australia.

DALY, J.M. 1976. Some aspects of host-pathogen interactions. *In* "Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 4 Physiological Plant Pathology". (R. Heitefuss & P. H. Williams eds.), pp. 27-50, Pringer-Verlag, Berlin.

D'AMATO, F. 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. *In* "Frontiers of Plant Tissue Culture". (T.A.Thorpe, ed.) pp. 287-295. IAPTC/University of Calgary, Calgary, Canada.

DEBERGH, P. & NITSCH, C. 1973. Histophysiologie Végétale. Premiers résultats sur la culture *in vitro* de grains de pollen isolés chez la tomate. C.R. Acad. Sci. Paris 276:1281-1284.

DEBKNUIJZEN, H.M. 1976. Endogenous cytokinins in healthy and diseased plants. *In* "Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, vol. 4, Physiological Plant Pathology" (R. Heitefus & P.H.Williams eds.), pp. 526-599, Springer-Verlag, Berlin.

DEGAN, K. & TAL, M. 1978. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato responses of *Solanum pennellii* to high salinity. Irrig. Sci. 1: 71-76.

DEHAN, K. & HEIKIN, H. 1977. Morphogenetic potential of cultured leaf sections of cultivated and wild species of tomato. Ann. Bot. 41: 937-941.

DE LANGHE, E. & DE BRUYNE, E. 1976. Continuous propagation of tomato plants by means of callus cultures. Scientia Hort. 4: 221-227.

DE WIT, P.J.G.M. 1976. Isolation and culture of tomato mesophyll protoplasts. Acta Bot. Neerl. 25(6): 475-480.

DHRUVA, B.; RAMAKRISHNAN, T.S. & VAIDIANATHAN, C.S. 1978. Regeneration of hybrid tomato plants from leaf callus. Am. Sci. 47: 458-468.

DICKINSON, C.H. & LUCAS, J.A. 1982. Plant Pathology & Plant Pathogens 229 p. Basic Microbiology (p:F.Wilsinson, ed.) volume 6 - 2a. edição - Blackwell Scientific Publications, GB

DUARTE, M.L.R.; NUNES, A.M.L. & ALBUQUERQUE, F.C. de. 1982. Influência de meios de cultura, pH e do regime luminoso no crescimento e esporulação de *Colletotrichum coichorum* Ikala & Tana. Boletim de Pesquisa nº 48, Dezembro, EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido (CPATU), 19 p., Belém, PA.

DURBIN, R.D. 1983. The biochemistry of fungal and bacterial toxins and their modes of action. *In* "Biochemical Plant Pathology" (J.A.Callow, ed.) Chapter 8 p. 137-162. John Wiley & Sons Ltd.

DURBIN, R.D. & STEELE, J.A. 1979. What art thou, o specificity? *In* "Recognition and specificity in host-parasite interactions" (J.M.Daly & J.A.Uritani, eds.) pp. 115-131, Japan Scientific Society Press, Tokyo.

DUTRECQ, A.J.E. 1977. *In vitro* selecion of plants resistant or tolerant to pathogenic fungi. *In* "International Symposium on the use of induced mutants for comprovement of disease resistance in crop plants" pp. 11, 31 January - 4 February, Vienna

EARLE, E.D. 1978. Phytotoxin studies with plant cells and protoplasts. *In* "Frontiers of Plant Tissue Culture" (T.A.Thorpe, ed.) pp. 363-372. Proceedings of the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Calgary, Alberta , Canada.

ENGLISH, J.E. & MAYNARD, D.N. 1981. Calcium efficiency among

tomato strains. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(5): 552-557.

EPSTEIN, E. 1971. The essential role of calcium in selective cation transport by plant cells. Plant Physiol. 36: 437-444.

EPSTEIN, E. 1975. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. Trad. E. Malavolta. 341 pp. Ed. da Universidade de São Paulo, SP

ESKES, A.B. 1977. Uso de discos de folhas para avaliar a resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix* : efeito da luminosidade e concentração do inóculo. Resumos do V Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, pp. 85-87, Guarapari, ES.

ESKES, A.B. 1978. Avaliação do uso de discos de folhas para medir o nível de resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*: Resumos do VI Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras , pp. 114-115, Ribeirão Preto, SP.

ESKES, A.B. 1982. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Neth., J. Pl. Path. 88: 127-141.

ESKES, A.B. 1983. Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Doctoral Thesis, 140 p., Wageninnen, Holanda.

ESKES, A.B. & TOMA-BRAGHINI, M. 1981a. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. et Ber.). Pl. Prot. Bull. F.A.O. 29: 56-66.

ESKES, A.B. & TOMA-BRAGHINI, M. 1981b. Comparação da resistência à *Hemileia vastatrix* do cultivar Kouillon observada em condições de campo, viveiro, estufa e de laboratório. Resumos do IX Congresso Brasileiro de Pesquisa Cafeeira, p. 189-191, São Lourenço, MG.

EVANS, D.A. & SHARP, W.R. 1982. Gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. Science 221: 949-951.

EVANS, D.A. & SHARP, W.R. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. Science 221:949-951.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R. & MEDINA FILHO, H.P. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. Amer. J. Bot. 71: 759-774.

FLAWN, L.N. 1981. O cultivo do tomate. Título original "Tomato Growing", M.C.Cary tradutor - 142 pp. Editorial Presença Ltda. Lisboa, Portugal.

FRANKENBERGER, E.A.; HASEGAWA, P.M. & TIGCHELAR, E.C. 1981. Diallellic analysis of shoot-forming capacity among selected genotypes. Z. Planzenphysiol. 102: 233-242.

FOY, C.D.; GERLOFF, G.C. & GABELMAN, W.H. 1973. Differential effect of aluminum on the vegetative growth of tomato cultivars in acid soil and nutrient solution. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98(5): 427-432.

GALLI, F. & TOKESHI, H. 1979. Doenças do Tomateiro. *In*: "O Tomateiro", K. Minami & H.P.Haay (ed.), pp. 240-294.

GARCIA JR., O. 1979. Avaliação e análise genética da resposta do milho ao alumínio. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 53 pp.

GENGEBACK, B.G.; GREEN, C.E. & DONOVAN, C.M. 1978. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 74 : 5115-5117.

GILCHRIST, D.G. & GROGAN R.G. 1976. Production and nature of a host specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Phytopathology 66: 165-171.

GILCHRIST, D.G. & KEEN, N.T. 1982. Genetic disease resistance . California Agriculture, August, pp. 31-32.

GOODLAND, R. 1971. Oligotrofismo e alumínio no cerrado. *In* "II Simpósio sobre o Cerrado". Mário G. Ferri (Coord.), pp.44-60.

Editora Edgard Blucher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo.

GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, Z. & ZAITLIN, M. 1967. The biochemistry and physiology of infectious-plant-disease. 354 pp. D. van Nostrand Compny, Inc. USA.

GOODPASTURE, H.C.; CARLSON, T.; ELLIS, B. & RANDALL, G. 1983. *Alternaria* osthomyelitis Arch. Pathol. Lab. Med. 107: 528-530.

GORDON, M.; STOESSL, A. & STOTHERS, J.B. 1972. Stereochemistry of some altersolanol B derivates and their correlation with bostrycin. Can. J. Chem. 50(1): 122-124.

GRASMICK, M.E. & SLACK, S.A. 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature . Plant Disease 69(1): 49-51.

GRESSHOFF, P.M. & DOY, C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Plant (Berl.) 107: 161-170.

GUNAY, A.L. & RAO, P.S. 1980. *In vitro* propagation of hybrid tomato plants (*Lycopersicum esculentum*) using hypocotyl and cotyledon explants. Ann. Bot. 45: 205-207.

HAHN, M.G.; DARVIEL, A.G. & ALBERSHEIM, P. 1981. Host-pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccaride that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. Plant Physiol. 68: 1161-1169.

HANCHEY, P.; WHEELER, H. & LUKE, H.H. 1968. Pathological changes in ultrastructure effects of victorin on oat roots. Amer. J. Bot. 58, 62-69.

HANCHEY-BAUER, P. 1979. Physiological Plant Pathology *In* "Plant Phisiology" (F.B.Salisbury & C.W.Ross), Special Topic 23.2. p. 399-402.

HANDA, A.; BRESSAN, R.A.; PARK, M.C. & HASEGAWA, P.M. 1982. Use of plant cell cultures to study production and phytotoxicity of *Alternaria solani* toxin(s). Physiological Plant Pathology 21: 295-309.

HELGESON, J.P.; KEMP, J.D.; HABERLACH, G.T. & MAXWELL , D. P. 1972. A tissue culture system for studying disease resistant: the black shank disease in tobacco callus culture. Phytopathology 62: 1439-1443.

HELGESON, J.P.; HABERLACH, G.T. & UPPER, C.D. 1976. A dominant gene conferring disease resistance to tobacco plants is expressed in tissue cultures. Phytopathology 66: 91-96.

HERMAN, E.B. & HAAS, G.J. 1978. Shoot formation in tissue cultures of *Lycopersion esculentum* Mill. Z. Pflanzenphysiol Bd. 89:S 467-470.

HILDERING, G.J. 1962. The mutagenic effect of ethylene imine (EI) on the tomato. Euphytica 12: 113-119.

HILDERING, G.J. & VAN DER VEEN, J.H. 1966. The natural independence of M_1 fertility and mutant yield in EMS treated tomatoes. Euphytica 15: 412-424.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. Calif. Agr. Exph. Sta . Air., Berkeley, California 347.

HOLENSTEIN, J.E. & STOESSL, A. 1983. Metabolites of *Alternaria solani*, Part IX: Phytotoxicity of altersolanol. A. Phytopath. Z. 108: 143-147.

HOLENSTEIN, J.E.; KERN, H.; STOESSL, A. & STOTHERS, J.B. 1983 . The morticins: evidence for a mixed origin from the polyketide and tricarboxilic acid pathways by (2-13C1) and (1,2-13C2)-acetate incorporation experiments. Tetrahedron Letters 24 (38): 4059-4062.

HOMEDAN, M. 1982. Multiplication vegetative *in vitro* de la toma

te (*Lycopersicon esculentum* Mill.) incidence sur la croissance, la production en série et les modifications physiologiques. These à l'U.E.R. de Sciences et Techniques de l'Université d' Anjours, F. por obtenir le grade de Docteur en Sciences Biologiques, 148 pp., France.

HORSTFALL, J.C. 1979. Iatrogenic disease: mechanism of action.*In* "Plant Disease - An Advanced Treatise vol. IV How Pathogens Induce Disease" (J.G.Horstfall & E.B.Cowlery, eds.) Chapter 19 pp. 343-355. Academic Press, New York.

ICHIHARA, A.; TAZAKI, H. & SAKAMURA, S. 1983. Solanapyrones A, B, and C, phytotoxic metabolites from the fungus *Alternaria solani*. Tetrahedron Letters, 24(48): 5373-5376.

ILLG, R.D. & SIQUEIRA, W.J. 1984. High frequency of plant regeneration from leaf explants in six *Lycopersicon esculentum* Mill. cultivars. Revta. Brasil. Bot. 7(1): 1-4.

INGRAM, D.S. 1977. Applications in Plant Pathology *In* : "Plant Tissue and Cell Culture". H.E.Street (ed.), pp. 463-500. Blackwell Sci., Publ.

JAGER, G.; HECKMAN, W. & DEENENG, A. 1982. The occurrence of *Rhizotomia solani* on subterranean parts of wild plants in potato fields. Neth. J. Pl. Path. 88: 155-161.

KARTHA, K.K. & GAMBORG, O.L. 1975. Elimination of cassava - mosaic disease by meristem culture. Phytopathology 65(7): 826-828.

KARTHA, K.K.; GAMBORG, O.L.; SHYLUK, J.P. & CONSTABEL, F. 1976. Morphogenetic investigations on *in vitro* leaf culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 77:S. - 292-301.

KARTHA, K.K.; CHAMPOUX, S.; GAMBORG, O.L. & PAHL, K. 1977. *In vitro* propagation of tomato by shoot apical meristem culture . J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102(3): 346-349.

KARTHA, K.K.; LEUNG, N.L. & GAMBORG, O.L. 1979. Freeze-preservation of pea meristem in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. Plant Sci. Lett. 15: 7-15.

KIRÁLY, Z. 1976a. Vascular transport. *In* "Biochemistry and Infectious Plant Disease" (R.N.Goodman, Z.Kinâly & M.Zallin eds.) Chapter 8, pp. 281-307. D. van Nostrand Company, Inc., USA.

KIRÁLY, Z. 1976b. Toxins *In* "The biochemistry and physiology of infectious plant disease". (R.N.Goodman, Z.Kirâly & M. Zaitlin, eds.); Chapter 9. pp. 308-331, D. van Nostrand Company, Inc., USA

KLEINHOPS, A.; WARNER, R.L.; MUEHLBAUER, F.J. & NILAN, R.A. 1978. Induction and selection of specific gene mutation in *Hordeum* and *Pisum*. Mutation Res. 51: 29-35.

KOBLITZ, H. & KOBLITZ, D. 1982. Experiments on Tissue Culture in the genus *Lycopersion* Miller. Shoot formation from protoplasts of tomato long-term cell culture. Plant cell reports 1: 147-150.

KONO, Y.,; KNOCKE, H.N. & DALY, J.M. 1981. Structure: fungal-host-specific. *In* "Toxins in Plant Disease" (R.D.Durbin,ed.), Chapter 6, pp. 221-257. Academic Press Inc., New York, USA.

KUMAGAI, T. 1982. Blue and near-ultraviolet reversible photoreaction in the induction of fungal conidiation. Photochemistry and Photobiology 35: 123-125.

KUMAGAI, T. 1983. Action spectra for the blue and near- ultraviolet reversible photoreaction in the induction of fungal conidiation. Physiol. Plant 57: 468-471.

KUT, S.A.; BRAVO, J.E. & EVANS, D.A. 1984. Tomato. *In* "Handbook of Plant Cell Culture vol. 3 Crop Species". (P.V.Ammnato, D. A.Evans, W.R.Sharp & Y.Yameda, eds.) Chapter 10, pp.247-289. MacMillan Publishing.

LAEMMLEN, F.F. & MAYBERRY, K.S. 1984. Brocoli resistance t o

downy mildew. California Agriculture 38(11-12): 17.

LARKIN, P.J. & SLOWCROFT, N.R. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.

LAWSON, V.F. & SUMMERS, W.L. 1984. Disease reaction of diverse sources of *Lycopersicon* to *Xanthomonas campestris* pr. *vesicatoria* pepper sham Race 2. Plant Disease 68: 117-119.

LEACH, C. 1971. A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi. *In* "Methods in Microbiology" (C. Booth, ed.) vol. 4 Chapter XXIII, pp. 609-664, Academic Press Ltd., London.

LEACH, J.; TEGTMEIER, K.J.; DALY, J.M. & YODER, O.C. 1982. Dominance at the toxi locus controlling T-toxin production by *Cochliobolus heterostrophus*. Physiological Plant Pathology 21: 327-333.

LEME, W.D.; LOONEY, N.E. & MAGL, F. 1982. Selective tissue culture medium for growth of compact (dwarf) mutants of apple. Theor. Appl. Genet. 61: 219-223.

LIN WU & ANTONOVICS, J. 1978. Zinc and copper tolerance of *Agrostis stolonifera* L. in tissue culture. Amer. J. Bot. 65 (3): 268-271.

LOCKE, S.B. 1948. A method for measuring resistance to defoliation diseases in tomato and other *Lycopersicon* species. Phytopathology 38: 937-942.

LUKE, H.H. & GRACEN, JR., V.E. 1972a. Phytopathogenic toxins. *In* "Microbial Toxins vol. VIII Fungal Toxins". (S.Kadis, A.Gregler & S.J.Ajl, eds.) Chapter 5, pp. 131-137. Academic Press, New York.

LUKE, H.H. & GRACEN, JR., V.E. 1972b. *Helminthosporium* toxins. *In* "Microbial Toxins vol. VIII Fungal Toxins" (S.Kadis, A. Gre-

gler & S.J.Ajl, eds.) Chapter 6, pp.139-168. Academic Press, New York.

LUKE, H.H.; MURPHY, H.C. & PETR, F.C. 1966. Inheritance of spontaneous mutations of the Victoria locus in oats. Phytopathology 56: 210-212.

LUKE, H.H. & WHEELER, H.E. 1955. Toxin production by *Helminthosporium victoriae*. Phytopathology 45: 453-458.

LUKENS, R.F. 1963. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. Amer. J. Bot. 50: 720-724.

MALAVOLTA, E.; SARRUGE, J.R. & BITTENCOURT, V.C. 1977. Toxidez de alumínio e manganês. *In*: "IV Simpósio sobre o Cerrado" . Mário G. Ferri (Coord.), pp. 172-301. Editora Edgard Blucher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo.

MALIGA, P. 1984. Isolation and characterization of mutants i n plant cell culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 519-542.

MALUF, N.R.; MIRANDA, J.E.C. & BITTENCOURT, C. 1985. Avaliação de resistência a septoriose em acessões de *Lycopersicon* spp. Hort. Bras. 3(1): 9-11.

MANNERS, J.G. 1982. Principles of Plant Pathology. 264 pp. Cambridge University Press, GB.

MARANCA, G. 1981. "Tomate - Variedades, cultivo, pragas e doenças. Comercialização." 158 pp. Livraria Nobel, S.A., São Paulo, SP.

MASS, E.V. & LEGGETT, J.E. 1968. Uptake of ^{86}Rb and K by excised maize roots. Plant Physiol. 43: 2054-2056.

MATERN, V.; STROBEL, G. & SHEPARD, J. 1978. Reaction to phytotoxins in a potato population derived from mesophyll protoplasts. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 75: 4935-4939.

MATTHEWS, D.E.; GREGORY, P.; GRACEN, V.E. 1979. *Helminthosporium maydis* race T toxin induces leakage of NAD+ from T cytoplasm on mitochondria. Plant. Physiol. 63: 1149-1153.

MEHROTRA, J.G. 1980. Plant Pathology, 771 pp. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited.

MEREDITH, C.P. 1978 a. Response of cultured tomato cells to aluminum. Plant Science Letters 12: 17-24.

MEREDITH, C.P. 1978 b. Selection and characterization of aluminum resistant variants from tomato cell cultures. Plant Science Letters 12: 29-34.

MILLER, P.M. 1955. V_8 juice agar as a proposed medium for fungi and bacteria. Phytopathology, 45: 461-462.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1960. Levantamento e reconhecimento dos solos do Estado de São Paulo.

MOREL, G. & MULLER, J.F. 1964. La culture *in vitro* du méristéme apical de la pomme de terre. Compt. Rend. 258: 5250-5252.

MORGAN, A. & COCKING, E.C. 1982. Plant regeneration from protoplasts of *Lycopersicon esculentum* Mill. Z. Pfl. Physiol. 106 (2): 97-104.

MULBÄCH, H.P. 1980. Different regeneration potential of mesophyll protoplasts from a cultivated and a wild species of tomato. Planta 148: 89-96.

MULBACH, H.P. & THIELE, H. 1981. Response to chilling of tomato mesophyll protoplasts. Planta 151: 399-401.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-essays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473-497.

MURASHIGE, M. 1974. Plant propagation through tissue cultures . Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.

NAKASHIMA, T.; UENO, H. & FURAMI, H. 1982. Tetrahedron Lett. 23: 4469.

NISHIMURA, S. 1962. Relation between the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. *niveum* to watermelon plant and the production of toxic metabolites *in vitro*. Trans Tottori Soc.Agr. Sci. 14: 4-7.

NISHIMURA, S. & KOHMOTO, K. 1983a. Roles of toxin in Pathogene - sis. *In* "Toxins and Plant Pathogens" (J.M.Daly & B.J.Deverall, eds.) Chapter 4, pp. 135-137. Academic Press, Australia.

NISHIMURA, S. & KOHMOTO, K. 1983b. Host specific toxins and chemical structures from *Alternaria solani* . Ann. Rev. Phytopathol. 21: 87-116.

NORTON, J.P. & BOLL, W.G. 1954. Callus and shoot formation from tomato roots *in vitro* . Science, 119: 220-221.

NOVÁK, F.J. 1977. *In vitro* techniques in garlic (*Allium sativum* L.) breeding, pp. 165-181. *In*: Use of tissue cultures in plant breeding. Proc. Intern. Symp. Czechoslovak Acad. Sci., Prague.

OGIHARA, Y. 1981. Tissue culture in *in vitro*. Part 4. Genetic characterization of plants regenerated from cells. Theor. Appl. Genet. 60: 353-363.

OHKI, S.; BIGOT & MOUSSEAU, J. 1978. Analysis of shoot - forming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids. Plant Cell Physiol.19:27-42.

OJIMA, K. & OHIRA, K. 1982. Characterization and regeneration of an aluminium-tolerant variant from carrot cell cultures. Plant Tissue Culture, Proc. 5th Int'l Cong. Plant Tissue and Cell Culture, pp. 475-476.

OJIMA, K. & OHIRA, K. 1983. Characterization of aluminium and manganese tolerant cell lines selected from carrot cell cultures. Plant & Cell Physiol. 24(5): 789-797.

ORTON, T.J. 1984. Genetic variation in somatic tissues: Method or madness ? *In* "Advances in Plant Pathology" vol. 2 (D. S. Ingram & P.H.Williams, eds.) Chapter 3, pp. 153-189. Academic Press, London.

PADMANABHAN, V.; PADDOCK, E.F. & SHARP, W.R. 1974. Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. Canad.J. Bot. 52(6): 1429-1432.

PATTERSON, R.D.; PAULL, R.M. & SMILLIE, R.M., 1978. Chilling resistance in *Lycopersicon hirsutum* Humb & Bonpl., a wild tomato with a wide altitudinal distribution. Aust. J. Plant Physiol. 5: 609-617.

PELCZAR, JR., M. & CHAN, E.C.S. 1972. Laboratory exercises in microbiology. 3a. edição, 475 pp. McGraw-Hill Book Company , N.Y.

PERO, R.W. & MAIN, C.E., 1970. Chlorosis of tobacco induced by alternarial monomethyl ether produced by *Alternaria tenuis*. Phytopathology 60: 1570-1573.

PIMENTEL GOMES, F. 1976. Curso de Estatística Experimental. 6a. ed. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP - Piracicaba, SP, Livraria Nobel S.A., 430 pp. + 35 ii.

PONTE, J.J. da, 1980. Fitopatologia - Princípios e Aplicações, 250 pp., 2a. edição, Livraria Nobel S.A., São Paulo.

POWELL, N.T. 1979. Internal synergisms among organisms inducing disease. *In* "Plant Disease. An Advanced Treatise, vol. IV , How Pathogens Induce Disease" (J.G.Horstfall & E.B.Cowlery , eds.) Chapter 6, pp. 113-133. Academic Press Inc., EUA.

POUND, G.S. & STAHMANN, M.A. 1951. The production of a toxic

material by *Alternaria solani* and its relation to the early blight disease of tomato. Phytopathology 41: 1104-1114.

PRINGLE, R.B. & SCHEFFER, R.P. 1964. Host-specific plant toxins. Ann. Rev. Plant Pathol. 2: 133-156.

PURSEGLOVE, J.W. 1976. Tropical crops. Dicotyledons , *Lycopersicon esculentum* pp. 531, 538. Longman Group Limited, 4th ed.

RAMOS, L.C.S. 1981. Estudo sobre a herança de tolerância ao alumínio em tomateiro. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 65 pp.

REID, D.A. 1971. "Genetic control of reaction to aluminium in winter barley", pp. 409-413. *In*: R.A.Nilan (ed.) Barley Genetics Symp., Wash. State Press, Pullman.

REISH, B. & BINGHAM, E.T. 1981. Plants from ethionine-resistant alfafa tissue cultures: variation in growth and morphological characteristics. Crop Science 5(21): 783-788.

REISCH, B.; DUKE, S.H. & BINGHAM, E.T. 1981. Selection and characterization of ethionine-resistant alfafa (*Medicago sativa* L.) cell lines. Theor. Appl. Genet. 59: 89-94.

RENEE SUNG, Z. 1976. Mutagenesis of cultured plant cells. Genetics 84: 51-57.

REY, L. 1972. Como redigir trabalhos científicos. Editora Edgard Blucher, Ed. Universidade de São Paulo, 128 pp.,S.Paulo.

RHUE, R.D.; GROGAN, C.O.; STOCKMEYER, E.W. & EVERETT, H.L. 1978. Genetic control of aluminium tolerance in corn. Crop Science 18: 1063-1067.

RIBEIRO, A.S. 1984. Métodos de avaliação de doenças em beterrabá açucareira. *In* "Beterraba Açucareira". Anais da II Reunião Técnica Anual. Pelotas, RS, de 02 a 04 de agosto de 1983, pp.

EMBRAPA, VEPAE, Pelotas, RS.

RICK, C.M. 1963. Biosystematic studies on Galapagos tomatoes . Occ. Papers Calif. Acad. Sci. 44: 59-77.

RICK, C.M. 1967. Fruit and pedicel characters derived from Galapagos tomatoes. Econ. Bot. 21: 171-184.

RICK, C.M.; ZOBEL, R.W. & FOBES, J.R. 1974. Four peroxidase loci in red-fruited tomato species: genetics and geographic distribution. Proc. Nat'l Acad. Sic. 71: 835-839.

RICK, C.M. & FOBES, J.F. 1975. Allozymes of Galapagos tomatoes polymorphism, geographic distribution, and affinities. Evolution. 29: 443-457.

RICK, C.M. 1976. Tomato. *In*: "Evolution of crop plants". (N. W. Simmonds, ed.), pp. 265-273. Longman Group Limited, London.

RICK, C.M. & HOLLE, M. 1977. Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*. Evidence of evolutionary changes in mating systems. Plant Sys. and Evol. 127: 139-170.

RICK, C.M. 1978. The Tomato. Scientific American 239(2): 66-76.

RICK, C.M. 1979. Tomato germplasm resources. *In*: "Proc. 1st Intern. Symp. Tropical Tomato" (R.Cowell, ed.), pp. 214-224 , Asian Vegetable Research and Development Center Pub.

ROBERTS, D.A. & BOOTHROYD, C.W. 1984. Fundamentals of Plant Pathology; 2nd. ed., 432 pp. N.H.Freeman & Co., New York.

RUDOLPH, K. 1976. Non-specific toxins. *In* "Encyclopedia of Plant Physiology - New Series - volume 4 - Physiological Plant Pathology" (R. Hertefuss & H.Williams, eds.) pp. 270-315,Springer-Verlag.

RUSH, D.W. & EPSTEIN, E. 1981. Breeding and selection for salt

tolerance by the incorporation of wild germplasm into a domestic tomato. Journal of the American Society for Horticultural Science 106: 699-703.

RUSSELL, G.E. 1978. Plant breeding for pest and disease resistance. Studies in the Agricultural and Food Sciences, 165 pp. BUTTERWORTHS - London, GB.

SÁCRISTAN, M.D. 1982. Resistance resposes to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*. Theor. Appl. Genet. 61: 193-200.

SÁCRISTAN, M.D. 1985. Selection for disease resistance in *Brassica* cultures. Hereditas Suppl. vol. 3: 57-63.

SAFTNER, R.A.; EVANS, M.C. & HOLLANDER, P.B. 1976. Specific binding of victorin and calcium: evidence for calcium binding on a mediator of victorin activity. Physiol. Pl. Path. 8 : 21-34.

SANDS, D.L. & LUKENS, R.L. 1974. Effect of glucose and adenosine phosphates on production of extracellular carbohydrates of *Alternaria solani*. Plant Physiol. 54: 666-669.

SCHAEFFER, G.W. 1979. Selection of biochemical variants from cell culture. *In* "*Nicotiana*: Procedures for Experimental Use" (R.D.Durbin, ed.) Chapter 10, pp. 74-78. Technical Bulletin number 1586, United States Department of Agriculture, EUA.

SCHEFFER, R.P. 1976. Host-specific toxins in relation to pathogenesis and disease resistance. *In* "Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Physiological Plant Pathology". vol. 4, pp. 247-269. Springer-Verlag, Berlin.

SCHEFFER, R.P. 1983. Toxin as chemical determinants of plant disease. *In* "Toxins and Plant Pathogenesis" (J.M.Daly & B.J. Deverall, eds.) Chapter 1, pp. 1-40, Academic Press, Australia.

SCHEFFER, R.P. & LIVINGSTON, R.S. 1984. Host-selective toxins and their role in plant diseases. Science 223(4631): 17-21 .

SCROWCROFT, W.R. 1977. Somatic cell genetics and plant improvement. Adv. Agronom. 29: 39-81.

SCHURING, F. & SALEMINK, C.A. 1972. A phytotoxin from *Didymella applanata* cultures. *In* "Microbial Toxins. vol. VIII Fungal Toxins" (S.Kadis, A.Gegler & S.J.Ajl, eds.) Chapter 8, pp. 193-209. Academic Press, New York.

SEYMOUR, A.B. 1929. Host index of the fungi of North America , 732 pp., Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.

SHAHIN, E.A. & SHEPARD, J.F. 1979. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. Phytopathology 69: 618-620.

SHARP, W.R.; RASKIN, R.S. & SOMMER, H.E. 1972. The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. Plant (Berl.) 104: 357-361.

SHARP, W.R.; CROCOMO, O.J. & CALDAS, L.S. 1975. Application of nuclear energy to the study of cellular and development biology. CENA, Piracicaba, pp. 13-30; 144-168.

SHEPARD, J.F. 1981. Protoplasts as sources of disease resistance in plants. Ann. Rev. Phytopathol. 19: 145-166.

SHEPARD, J.F.; BIDNEY, D. & SHAHIN, E. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. Science 208: 17-24.

SIQUEIRA, W.J.; SHEPHERD, S.L.K., CASTRO, C.D.; PRIOLI, A.J. & SONDAHL, M.R. 1983. Cultura de anteras de *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. Pesquisas em andamento - 1983, do Departamento de Fisiologia Vegetal p. xiii.

SKOOG, F. & LEONARD, N.S. 1968. Sources and structure activity relationships of cytokinins *In* "Biochemistry and Physiology

of Plant Growth Substances (F.Wightmon & G.Setterfield, eds.) pp. 1-18, The Runge Press Ltd., Ottawa, Canada.

SMILLIE, R.M. & NOTT, R. 1979. Assay of chilling injury in wild and domestic tomatoes based on photosystem activity of the chilled leaves. Plant Physiol. 63: 796-801.

SÖNDAHL, M.R. 1978. Cell culture of *Coffea* spp. and its application in research. PhD dissertation. The Ohio State University, Columbus, EUA.

SÖNDAHL, M.R.; SALISBURY, J.L. & SHARP, W.R. 1979. SEM characterization of embryonic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenisis in coffee callus cells. Z. Pflanzenphysiol. Bol. 945: 185-188.

STAVELY, J.R. 1979. Disease resistance in *Nicotiana*. Procedures for experimental use, Chapter 12, pp. 87-110. Durbin, ed. U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin 1586.

STEINER, G.W. & STROBEL, G.A. 1971. Helminthosporiside. a host-specific toxin from *Helminthosporium sacchari*. J.Biol.Chem. 246: 4350-4357.

STEVENSON, G.B. 1974. Biologia dos fungos, bactérias e virus . Tradução D.N.Pereira, 267 pp. Editora Polígono, Editora da Universidade de São Paulo, SP.

STOESSL, A. 1967. Altersolanol A, a novel tetrahydroanthraquinone Chemm. Commum. 307.

STOESSL, A. 1969. Some metabolites of *Alternaria solani* Can.J. Chem 47(5): 767-776.

STOESSL, A. 1982. Stress compound formation in the interaction of potato tubers with *Alternaria solani* and *A.* metabolites. Physiological Plant Pathology 20: 263-273.

STOESSL, A.; UNWIN, C.H. & STOTHERS, J.B. 1979. Metabolites of *Alternaria solani* V. Biosynthesis of altersolanol A and

incorporation of altersolanol A ^{13}Cx into altersolanol B and macrosporin. Tetrahedron Letters 27: 2481-2484.

STOESSL, A. & STOTHERS, J.B. 1983. Tetrahydroaltersolanol B, a hexahydroanthronol from *Alternaria solani*. Can. J. Chem. 61 (2): 378-382.

STOESSL, A.; UNWIN, C.H. & STOTHERS, J.B. 1983. In the biosynthesis of some polyketide metabolites in *Alternaria solani*: ^{13}C and ^{2}Hmr studies. Can. J. Chem. 61(2): 372-377.

STROBEL, G.A. 1974. Phytotoxins produced by plant parasites . Ann. Rev. of Phytopathology 2: 133-156.

STROBEL, G.A. 1975. A mechanism of disease resistance in plants. Scientific American 232(1): 80-88.

STROBEL, G.A. 1982. Phytotoxins. Ann. Rev. Biochem. 51: 309-333.

SUNG, R.Z. 1976. Mutagenisis of cultured plant cells. Genetics 84: 51-57.

STUBGE, H. 1972. Mutantent der kultur tomate *Lycopersicon esculentum* Miller VI. Kulturpflanze 19: 185-230.

SUMEGHY, J.B. 1979. Factors affecting the success of mechani - cally harvested tomatoes in NSW. Food Technol. Aust. 31(4): 168-173.

SUMEGHY, J.B.; MUTTON, R.L.L. & SINCLAIR, P.J. 1978a. Evalua - tion of tomatoes for processing and chemical harvesting in New South Wales . The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science, June, 135-138.

SUMEGHY, J.B.; MUTTON, R.L.L. & SINCLAIR, P.J. 1978b. Better tomatoes for mechanical harvesting. Agric. Gaz. NSW 89(5)

TAL, M. 1967. Genetic differentiation and stability of charac-

ters that distinguish *Lycopersicon esculentum* Mill. from *Solanum pennellii*. Gen. Evaluation 21: 316-333.

TAL, M. 1971. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato; responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* and *L. pennellii* to sodium chlorine solution. Australian J. Agr. Res. 22: 631-637.

TEMPLETON, G.E. 1972. *Alternaria* toxins related to pathogenisis in plants. *In* "Microbial Toxins vol. VIII Fungal Toxins" (S. Kadis, A. Gegler & S. J. Ajl, eds.) Chapter 7, pp. 169-192. Academic Press, New York.

THOMAS, B.R. & PRATT, D. 1981. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo callus. Theor. Appl. Genet. 59: 215-219.

THOMAS, B.R. & PRATT, D. 1982. Isolation of paraquat tolerant mutants from tomato cell cultures. Theor. Appl. Genet. 63: 215-219.

TOYODA, H.; TANAKA, N. & HIRAI, T. 1984. Effects of the culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato callus growth and the selection of resistant callus cells to the filtrate. Ann. Phytopath. Soc. Japan 50(1):53-62.

TULECKE, W.; TAGGART, R. & COLAVITO, L. 1965. Continuous Culture of higher plant cells in liquid media. Boyce Thompson Inst. 23: 33-46.

UENO, L.H. 1979. Tomate. *In*: Prognóstico 79/80. pp. 118-121 . Instituto de Economia Agrícola. Secretaria da Agricultura do Governo do Estado de São Paulo, SP.

VERBERK, K. 1959. Neutronic mutations in tomatoes. Euphytica 8: 216-222.

VILLAREAL, R.L. 1979. Tomato production in the tropics. Problems

and Progress *In* "Proceedings of the 1st. International Symposium on Tropical Tomato", Robert Cowell (ed.), pp. 6 - 21, Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan, Rep. of China.

VOSE, P.B. 1980. Utilization of genetic differences in plant nutrition. Palestra realizada no "International course on crop improvement of tropical species through tissue culture", proferida em 23/10/1980, no CENA, Piracicaba, SP.

VNUCHROVA, V.A. 1978. Development of a method for obtaining regenerated tomato plants under tissue culture conditions. Soviet Plant Physiol. 24: 884-889.

WALKER, H.L. 1980. *Alternaria macrospora* as a potential bio - control agent for spurred anoda: production of spores for field studies. U.S.Dep. Agric. Adv. Agric. Tech. South Series (issn 0193-3728-12) 5 pp.

WALKER, H.L. & TEMPLETON, G.E. 1978. *In vitro* production of a phytotoxic metabolite by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. Plant Science Letters 13: 91-96.

WEILER, E.W. & SPANIER, K. 1966. Phytohormones in the formation of crown gall tumors. Planta (Berl.) 153: 326-327.

WELLMAN, F.L. 1943. A technique to compare virulence of isolates of *Alternaria solani* on tomato leaflets. Phytopathology 33: 698-706.

WIDHOLM, J.M. 1974. Cultured carrot cell mutants: 5-Methyl Tryptophan Resistant carried from cell to plant and back. Plant Sci. Letters 3: 323-330.

WHEELER, H. 1981. Role in pathogenesis. *In* "Toxins in Plant Disease" (R.D.Durbin, ed.) Chapter 13, pp. 477-494. Academic Press, New York.

WHITE, P.R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol. 9: 585-600.

WOLPERT, T.J. & DUNKLE, L.D. 1983. Alterations in gene expression in sorghum induced by the host-specific toxins from *Peritonia circinata*. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 80: 6576-6580.

YAMAKAWA, T.; KURAKASHI, O.; ISHIDA, K.; KATO, S.; KODAMA, T. & MINODA, Y. 1979. Stability of indole-3-acetic acid to autoclaving, aeration, and light illumination. Agric. Biol. Chem. 43(4): 879-880.

YEOMAN, M.M. & MAXLEOD, A.J. 1977. Tissue callus cultures - Techniques, pp. 31-59. *In*: "Plant Tissue and Cell Culture" H.E.Street (ed.) Blackwell Sci. Publ., London.

YODER, O.C. 1980. Toxins in pathogenesis. Ann. Rev. of Phytopathology. 18: 103-129.

ZAGORSKA, N.; ABEDJIEVA, M., GEORGIEV, C. & GEORGIEVA, R. 1982. Morphogenesis and plant differentiation in anther cultures of the genus *Lycopersicon* Mill. Proc. 5th. Int'l Congress Plant Tissue & Cell Culture. 539-540.

ZÃITLIN, M. 1967. Cell wall composition and metabolism. *In* "Biochemistry and Infectious Plant Disease" (R.N.Goodman,Z. Kindly & M.Zãitlin, eds.) Chapter 4, pp. 107-150, D. van Nostrand Company, Inc., EUA.

ZAMIR, D.; JONES, R.A. & KEDAR, N. 1980. Anther culture of male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants. Plant Science Letters 17(3): 353-361.

ZAMIR, D.; TANKSLEY, S.D. & JONES, R. 1981. Genetic analysis of the origin of plants regenerated from anther tissues of *Lycopersicon esculentum* Mill. Plant Science Letters 21:223-227.

ZAPATA, F.J.; EVANS, P.K.; POWER, J.B. & COCKING, E.C. 1977. The effects of temperature on the division of leaf protoplasts of *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon peruvianum*. Plant Sci. Lett. 8: 119-127.

ZAPATA, F.J.; SINK, K.C. & COCKING, E.C. 1981. Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species: *L. esculentum* cv. Walter, *L. pimpinellifolium* and *L.hirsutum* f. *glabratum*. Plant Science Letters 23: 41-46.

ZILKAH, S. & GRESSEL, J. 1977. Cell culture vs. whole plants for measuring phytotoxicity. I. The establishment and growth of callus and suspension cultures, definition of factors affecting toxicity of calli. Plant and Cell Physiology 18:641-655.

ZILKAH, S.; BOCION, P. & GRESSEL, J. 1977. Cell culture vs. whole plant for measuring phytotoxicity. II. Correlation between phytotoxicity in seedlings and calli. Plant and Cell Physiology 18: 657-670.

ZIV, M.; HADARY, D. & KEDAR, N. 1982. Dihaploid plants regenerated from tomato anthers *in vitro*. Plant Tissue Culture 1982. Proc. 5th. Int'l Congr. Plant Tissue & Cell Culture, pp.549-550.