

Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro

Carlos Eduardo Marchi¹, Mirian de Freitas Borges² & Eduardo Seiti Gomide Mizubuti¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, fax: (31) 3899-2629. e-mail: cemarchi@cnpqg.embrapa.br; mizubuti@ufv.br ²Superintendência Federal de Agricultura-MS, CEP 79002-182, Campo Grande, MS. e-mail: mirianborges@agricultura.gov.br

Data de chegada: 09/05/2005. Aceito para publicação em: 17/10/2005.

1203

ABSTRACT

Marchi, C.E.; Borges, M. de F.; Mizubuti, E.S.G. Amilolytic and pectinolytic activities of *Alternaria solani* and aggressiveness in tomato plants. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.4, p.345-352, 2006.

Amilolytic and pectinolytic activities of 45 isolates of *Alternaria solani* from distinct hosts were investigated. Enzyme secretion was evaluated in glucose-free medium amended with pectin or starch as carbon source. All isolates degraded pectin. Only 17 isolates had amilolytic activity, and nine of these isolates were isolated from potato. Only AS18 had good amilolytic and pectinolytic activities. The role of pectinases produced by *A. solani* in its aggressiveness on tomato was examined. Five isolates showing substantial differences regarding the ability to produce pectic enzymes were selected, two from eggplant, two from tomato plants, and one from potato plant. Four isolates (AS6, AS7,

AS12, and AS26) were inoculated on detached leaflets of tomato and pectinolytic activity was correlated with lesion size ($r = 0.963$; $P = 0.087$). Pathogenicity test with five isolates (AS6, AS7, AS12, AS25, and AS26) was conducted in tomato plants. Variation in the number of lesions per cm^2 of leaf area was not detected, but isolates varied in aggressiveness. Pectinolytic activity and aggressiveness were correlated ($r = 0.916$; $P = 0.042$). In general, pectinases-producing isolates caused larger lesions on tomato plants. It is possible that enzymatic profile differences are associated with the host origin. The results contribute to cumulative evidences of host specificity in populations of *A. solani*.

Additional keywords: Early blight, enzymes, amylases, pectinases, pathogenic variability, tomato.

RESUMO

Marchi, C.E.; Borges, M. de F.; Mizubuti, E.S.G. Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.4, p.345-352, 2006.

As atividades amilolítica e pectinolítica de 45 isolados de *Alternaria solani*, provenientes de diferentes hospedeiros, foram estimadas por meio da difusão enzimática em meio sólido específico e mensuração do halo de degradação do substrato. Todos os isolados degradaram pectina. Apenas 17 isolados apresentaram atividade amilolítica, sendo nove isolados provenientes de batateira. Somente o isolado AS18 se destacou como bom produtor de ambas as enzimas. Uma vez que a atividade pectinolítica foi mais evidente, avaliou-se a influência de pectinases na agressividade de *A. solani* ao tomateiro. Para isso, cinco isolados (2 de berinjela, 2 de tomateiro e 1 de batateira) contrastantes quanto à produção de pectinases foram selecionados para testes em folíolos destacados e plantas inteiras. Quatro isolados foram utilizados no teste em folíolos

destacados (AS6, AS7, AS12 e AS26), e constatou-se haver variabilidade patogênica. A correlação obtida entre o tamanho das lesões e a atividade pectinolítica foi de $r = 0,963$ ($P = 0,087$). Cinco isolados (AS6, AS7, AS12, AS25 e AS26) foram inoculados em plantas inteiras de tomate. Os isolados não diferiram quanto ao número de lesões/ cm^2 de área foliar, porém variaram em agressividade. Houve correlação ($r = 0,916$; $P = 0,042$) entre a atividade de pectinases e o índice de doença, sugerindo possível papel para as enzimas pécicas durante a infecção de *A. solani* em tomateiro. É provável que as diferenças no perfil enzimático dos isolados estejam associadas ao hospedeiro original de onde os mesmos foram obtidos. Os resultados reforçaram evidências de especificidade por hospedeiro em populações de *A. solani*.

Palavras-chave adicionais: Pinta preta, enzimas, amilases, pectinases, variabilidade patogênica, tomate.

Fungos fitopatogênicos são capazes de produzir grande número de enzimas hidrolíticas extracelulares. Contudo, o perfil enzimático é inter ou intraespecificamente variável (18), o que constitui ferramenta alternativa, simples e rápida, para auxiliar na diferenciação de espécies ou entre isolados de uma mesma espécie fúngica (5).

Durante a infecção, as enzimas extracelulares parecem favorecer a penetração, a colonização, a obtenção de nutrientes e/ou contribuir para interferir nas reações de defesa da planta (2, 20).

Apesar de freqüentes no arsenal enzimático fúngico, as enzimas amilolíticas ou amilases têm recebido pouca atenção, e por isso, pouco se sabe sobre seu papel na patogênese (6). As amilases promovem a degradação do amido, principal polissacarídeo de reserva nas células vegetais, o qual pode ser utilizado como fonte de energia durante o crescimento e/ou esporulação (11, 20).

Ao contrário das amilases, as enzimas pectinolíticas ou pectinases são objetos de intensas pesquisas, por se acreditar que constituem importantes fatores de patogenicidade e/ou virulência (2). As pectinases degradam a pectina, principal componente da parede celular primária e da lamela média, e representam o único grupo de enzimas degradadoras de parede celular a levar à maceração dos tecidos da planta (14).

Outras enzimas extracelulares secretadas por espécies fitopatogênicas, e que também podem ser importantes na patogênese, incluem: cutinases, celulases, hemicelulases, proteases, lipases, xilanases, glucanases, manases, xilosidases e arabinosidases (5, 7, 17, 26, 27, 29, 33, 37).

Atividade enzimática extracelular tem sido detectada em *Alternaria solani* Sorauer, agente etiológico da pinta preta em solanáceas, especialmente o tomateiro e a batateira. Atividades amilolíticas (9), pectinolíticas e celulolíticas (25) já foram relatadas, contudo, como na maioria dos patossistemas, o real papel das enzimas extracelulares na patogenicidade de *A. solani* não está elucidado. Acredita-se que, em adição ao possível envolvimento na patogênese, as diferenças na atividade enzimática extracelular de *A. solani* contribuam para especificidade de hospedeiro. Fancelli (9), por exemplo, evidenciou variações na atividade amilolítica de isolados de *A. solani* obtidos de tomateiro e de batateira, sendo que os primeiros apresentaram menor capacidade de hidrólise do amido. A análise molecular de populações de *A. solani*, provenientes de tomateiro e de batateira, têm corroborado com a hipótese de especificidade de hospedeiro (19, 30, 35).

A atividade patogênica de alguns fungos, conforme Hancock & Millar (12), está diretamente relacionada com a sua capacidade enzimática. Em certos casos, correlações entre a presença de certas atividades enzimáticas e o desenvolvimento de sintomas de doenças têm sido encontradas (5, 7, 16, 17, 22). Estudos dessa natureza são importantes porque podem estimular a obtenção de mutantes tipo perda-de-função, gerando assim informações consistentes acerca do papel das exoenzimas. Por isso, objetivou-se caracterizar isolados de *A. solani*, provenientes de diferentes hospedeiros e regiões do Brasil, quanto às atividades amilolítica e pectinolítica e, em seguida, verificar se a maior produção de enzimas extracelulares resulta em maiores níveis de severidade em folíolos destacados e plantas de tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados do fungo

Foram utilizados 45 isolados de *A. solani*, pertencentes à coleção do Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, UFV-MG. Os isolados, designados pelo prefixo AS, foram coletados a partir de três espécies de solanáceas em diferentes localidades do país (Tabela 1). Os isolados foram

cultivados em meio batata-dextrose-água (BDA), e mantidos a 25-28°C sob luz fluorescente. Para preservação, discos de micélio foram mantidos em frascos de penicilina contendo água destilada esterilizada, à temperatura ambiente (4).

Atividade amilolítica *in vitro*

Foram analisados 44 isolados, 24 oriundos de tomateiro, 16 de batateira e 4 de plantas de berinjela. Discos (9 mm de diâmetro) de BDA contendo micélio dos isolados fúngicos foram transferidos para placas de Petri com 25 mL de meio mínimo (MMA), o qual teve a glucose substituída por amido (6 g de NaNO₃; 1,5 g de KH₂PO₄; 0,5 g de KCl; 0,5 g de MgSO₄·7H₂O; 0,01 g de FeSO₄; 0,01 g de ZnSO₄; 10

Tabela 1. Codificação e origem dos isolados de *Alternaria solani*.

ISOLADO	HOSPEDEIRO	LOCAL DE COLETA
AS1	Batata	Teixeiras-MG
AS2	Batata	Teixeiras-MG
AS3	Tomate	Muniz Freire-ES
AS4	Tomate	MG
AS5	Batata	São Mateus Sul-PR
AS6	Batata	São Mateus Sul-PR
AS7	Tomate	Ponta Grossa-PR
AS9	Batata	Ponta Grossa-PR
AS10	Tomate	Ponta Grossa-PR
AS11	Tomate	Capão Bonito-SP
AS12	Tomate	Viçosa-MG
AS13	Tomate	Poços de Caldas-MG
AS14	Batata	Poços de Caldas-MG
AS15	Tomate	Coimbra-MG
AS16	Tomate	Coimbra-MG
AS18	Tomate	Viçosa-MG
AS19	Batata	Viçosa-MG
AS20	Batata	Viçosa-MG
AS24	Batata	Viçosa-MG
AS25	Berinjela	Viçosa-MG
AS26	Berinjela	Viçosa-MG
AS27	Berinjela	Teixeiras-MG
AS28	Tomate	Viçosa-MG
AS29	Batata	Carandaí-MG
AS30	Batata	Carandaí-MG
AS31	Tomate	Vassouras-RJ
AS33	Tomate	Bom Jardim-RJ
AS35	Tomate	Cordeiro-RJ
AS37	Tomate	Cordeiro-RJ
AS39	Tomate	Cordeiro-RJ
AS40	Tomate	Cordeiro-RJ
AS42	Tomate	Itaperuna-RJ
AS43	Tomate	Itaperuna-RJ
AS44	Tomate	Tocantins-MG
AS45	Tomate	Tocantins-MG
AS46	Tomate	Tocantins-MG
AS47	Berinjela	Piraúba-MG
AS48	Batata	Viçosa-MG
AS49	Batata	Teixeiras-MG
AS50	Batata	Teixeiras-MG
AS51	Batata	Teixeiras-MG
AS52	Tomate	Cajuri-MG
AS53	Tomate	Cajuri-MG
AS54	Tomate	Paulínia-SP
AS55	Batata	Paulínia-SP

g de amido; 15 g de ágar; 1 L de H₂O destilada; pH = 6,8). Foram preparadas quatro réplicas (placas) por isolado, as quais permaneceram a 25-28°C sob luz fluorescente.

Decorridos cinco dias de cultivo em MMA, procedeu-se à revelação do halo de degradação do amido. Para isso, foram vertidos 2 mL de solução lugol (5 g de KI; 1 g de iodo; 100 mL de H₂O) sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução lugol foi descartada e a atividade amilolítica detectada pela formação de halo amarelado circundando zona azulada. Com o auxílio de paquímetro, mensuraram-se os diâmetros perpendiculares do crescimento micelial e do crescimento micelial mais o halo de degradação do substrato para cálculo de áreas. A área de degradação do amido (ADA) foi obtida subtraindo-se a área do crescimento micelial.

Atividade pectinolítica *in vitro*

A atividade pectinolítica de *A. solani*, estimada em ensaios de difusão em meio sólido contendo pectina, foi determinada em 45 isolados, sendo 25 provenientes de tomateiro, 16 de batateira e 4 de plantas de berinjela. Discos (5 mm de diâmetro) de BDA contendo micélio dos isolados fúngicos foram transferidos para placas de Petri com 25 mL de meio mineral tamponado (MMT) [2 g de KH₂PO₄; 7 g de K₂HPO₄; 1 g de (NH₄)₂SO₄; 3 g de pectina; 1 g de MgSO₄·7H₂O; 0,6 g de extrato de levedura; 13 g de ágar; 1 L de H₂O destilada; pH = 7,2]. Foram preparadas quatro réplicas (placas) por isolado, as quais permaneceram a 25-28°C sob luz fluorescente.

Para definir o tempo de crescimento de *A. solani* em MMT, foi determinada a atividade de pectina liase (PL) de três isolados selecionados ao acaso (AS12, AS39 e AS49). Todos os isolados apresentaram o pico da atividade de PL, determinado por análise espectrofotométrica (A₂₃₅), no sétimo dia de incubação em meio contendo pectina (dados não apresentados). Por essa razão, os isolados foram cultivados por sete dias em MMT. Em seguida, a partir de cada repetição, foi transferido disco (9 mm de diâmetro) de MMT com micélio para placa de Petri com 25 mL de meio Mac Ilvaine (7,74 g de ácido cítrico; 17,93 g de Na₂HPO₄; 2,5 g de pectina cítrica; 13 g de ágar; 1 L de H₂O destilada; pH = 6,0), o qual permitiu a difusão das pectinases para o meio circundante. Essas placas foram mantidas a 40°C por 48 h. Decorrido o período de incubação, verteram-se 2 mL de solução lugol sobre a superfície do meio de cultura, os quais foram descartados após 10 minutos de repouso. As zonas de substrato degradado foram visualizadas, conforme previamente descrito para pectinases (13), e tiveram os diâmetros perpendiculares mensurados. Em seguida procedeu-se o cálculo da área de degradação da pectina (ADP).

Testes de patogenicidade de *A. solani* em tomateiro

Utilizaram-se tomateiros cv. Kada com 80 dias de idade, os quais foram cultivados em casa de vegetação. Folíolos destacados e plantas inteiras foram inoculados com quatro (AS6, AS7, AS12 e AS26) e cinco (AS6, AS7, AS12, AS25 e AS26) isolados de *A. solani*, respectivamente. A escolha desses isolados foi baseada na atividade pectinolítica detectada no ensaio de difusão em meio sólido. Para a produção de inóculo, o patógeno foi crescido em BDA. Decorridos 10 dias de incubação a 25°C verteu-se água destilada sobre as colônias e, com o auxílio de pincel, removeu-se todo o micélio aéreo da cultura fúngica. Em seguida, esta foi lavada com água destilada e a placa invertida para a secagem. Por fim, a placa de cultivo permaneceu aberta sob fotoperíodo de 12 h a temperatura ambiente. A suspensão de conídios foi obtida pela adição de 15 mL de água destilada na placa de cultivo e posterior raspagem com alça de vidro. A concentração da

suspensão foi determinada em câmara de Neubauer e ajustada para 5,0 x 10³ conídios/mL.

A. Folíolos destacados

A suspensão de conídios foi inoculada em três folíolos destacados de tomateiro, os quais foram acondicionados em caixa plástica (11 x 11 x 3 cm) tipo Gerbox. Os folíolos foram representativos da parte basal, mediana e apical da folha. Estas foram coletadas dos terços inferior, médio e superior da planta. Com o auxílio de micropipeta, foi depositada uma gota de 50 µL da suspensão de inóculo em cada folíolo. Os Gerboxes permaneceram a 24°C com fotoperíodo de 12 h. Um Gerbox com três folíolos foi considerado uma unidade experimental. Foram preparadas quatro réplicas (Gerboxes) por isolado.

A cada seis horas foram realizadas leituras para estimar o período de incubação dos isolados (PI), o qual considerou-se completo quando três Gerboxes apresentaram todos os folíolos com sintomas. Diariamente, utilizando-se régua, mediram-se os diâmetros (Ø) perpendiculares das lesões, até o oitavo dia após inoculação. A área da lesão (AL) foi calculada ao longo do tempo, segundo a fórmula: $AL = \pi \cdot \frac{\text{Ø}^2}{4}$. Em seguida, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da AL (ACPAL) para cada isolado. Ajustou-se modelo de regressão linear simples entre os valores de AL em função do tempo. A estimativa do parâmetro de inclinação da curva (b) serviu de estimador da taxa de expansão da lesão (TEL).

B. Plantas inteiras

Para o teste de patogenicidade de *A. solani* em plantas inteiras, além dos quatro isolados listados acima, utilizou-se também o isolado AS25. As mesmas suspensões preparadas para o ensaio de patogenicidade em folíolos destacados foram utilizadas para inocular tomateiros. Com o auxílio de compressor e atomizador, foram inoculadas quatro plantas por isolado. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro a 25°C, por 72 h e, em seguida, transferidas para câmara de crescimento a 26°C com fotoperíodo de 12 h, onde permaneceram por sete dias.

A partir do sétimo dia após a inoculação, foram colhidas imagens de uma folha basal, duas medianas e uma apical, de cada planta, utilizando-se câmara digital. De cada folha foram amostrados três folíolos, representativos dos terços inferior, médio e superior da folha. Para cada isolado, foram quantificados o número de lesões/cm² (NL) e a área lesionada/cm² (AL), utilizando-se o programa *ImageTool* (UTHSCSA, University of Texas Health Science Center, San Antonio).

Influência da atividade enzimática de *A. solani* na agressividade ao tomateiro

Verificou-se a existência de correlação entre a atividade pectinolítica de *A. solani* e a agressividade em folíolos destacados e plantas de tomate. Para isso, foram utilizados os valores médios da produção pectínica, estimada pela área do halo de degradação do substrato específico, e das variáveis adotadas para a quantificação da doença.

Delineamento e análises dos dados

Todos os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado. As pressuposições da análise de variância foram verificadas por meio de teste de normalidade e padrão de distribuição de resíduos. Houve a necessidade de transformar os valores de ADA em LN (x + 1).

Os procedimentos estatísticos, incluindo as análises de variância, correlação de Pearson e regressão foram realizados com o programa SAS (28). Exceção feita ao teste de agrupamento de médias Scott-

Knott e ao cálculo dos valores de área abaixo da curva de progresso que foram realizados com o auxílio dos programas SAEG (8) e AVACPD (34), respectivamente.

RESULTADOS

Caracterização amilolítica e pectinolítica de *A. solani*

Embora todos os isolados tenham crescido em MMA, cerca de 62% não demonstraram atividade amilolítica por meio de halos de degradação de amido. Estes foram produzidos nas placas de cultura de 17 isolados, sendo 9 de batateira, 6 de tomateiro e 2 de plantas de berinjela (Figura 1 e Tabela 1).

De acordo com o teste de agrupamento Scott-Knott, os isolados de *A. solani* foram diferenciados em três grupos, os quais foram aqui definidos como bons (AS18, AS19, AS30 e AS44, com ADA de 1,79 a 2,67 cm²), moderados (AS2, AS24, AS43, AS53 e AS55, com ADA de 0,67 a 1,10 cm²) e fracos (demais isolados, com ADA < 0,49 cm²) produtores de amilases (Figura 1). Dos isolados de *A. solani* originários de tomateiro, apenas AS18 e AS44 foram bons produtores de amilases. Não se verificou atividade amilolítica para grande parte dos isolados de tomateiro.

Todos os isolados cresceram em meio MMT e, portanto, foram capazes de utilizar pectina como fonte de carbono. Halos de degradação do substrato foram observados nas placas de cultivo dos 45 isolados. Contudo, houve variação quanto à difusão de pectinases para o meio circundante (Figura 2).

Baseado na área do halo de degradação da pectina, obtiveram-se três grupos de isolados de *A. solani*, aqui definidos como bons (AS4, AS14, AS16, AS18, AS25, AS26, AS28, AS45, AS52 e AS53, com

ADP de 1,98 a 2,19 cm²), moderados (AS 1, AS5, AS6, AS9, AS13, AS20, AS24, AS27, AS29, AS31, AS33, AS35, AS42, AS43 e AS54, com ADP de 1,75 a 1,94 cm²) e fracos (demais isolados, com ADP < 1,71 cm²) produtores de pectinases (Figura 1). O grupo de bons produtores de pectinases incluiu 10 isolados, 2 originários de plantas de berinjela (AS25 e AS26), 7 de tomateiro (AS4, AS16, AS18, AS28, AS45, AS52 e AS53) e 1 de batateira (AS14). A maioria dos isolados de batateira foi classificada como médio ou fraco produtor de pectinases.

Do total de isolados analisados, apenas AS18, oriundo de tomateiro, apresentou boa atividade pectinolítica e amilolítica *in vitro* (Figura 1). Por outro lado, 9 isolados de tomateiro (AS3, AS7, AS10, AS11, AS12, AS15, AS39, AS40 e AS46), 4 isolados de batateira (AS48, AS49, AS50 e AS51) e 1 de berinjela (AS47) apresentaram fraca atividade de ambas enzimas extracelulares. Curiosamente, observou-se ainda, que bons produtores de amilases (AS19, AS30 e AS44) apresentaram fraca atividade pectinolítica, à exceção de AS18. Similarmente, com exceção de AS18 e AS53, todos os bons produtores de pectinases foram fracos produtores de amilases (AS4, AS14, AS16, AS25, AS26, AS28, AS45 e AS52).

Agressividade de *A. solani* ao tomateiro

A. Foliolos destacados

De acordo com os resultados da caracterização pectinolítica *in vitro* de *A. solani*, foram selecionados os isolados AS26, maior produtor de pectinases, AS6, com moderada produção pectinolítica, AS7 e AS12, os quais apresentaram fraca atividade enzimática (Figura 1).

Os primeiros sintomas de pinta preta nos folíolos destacados

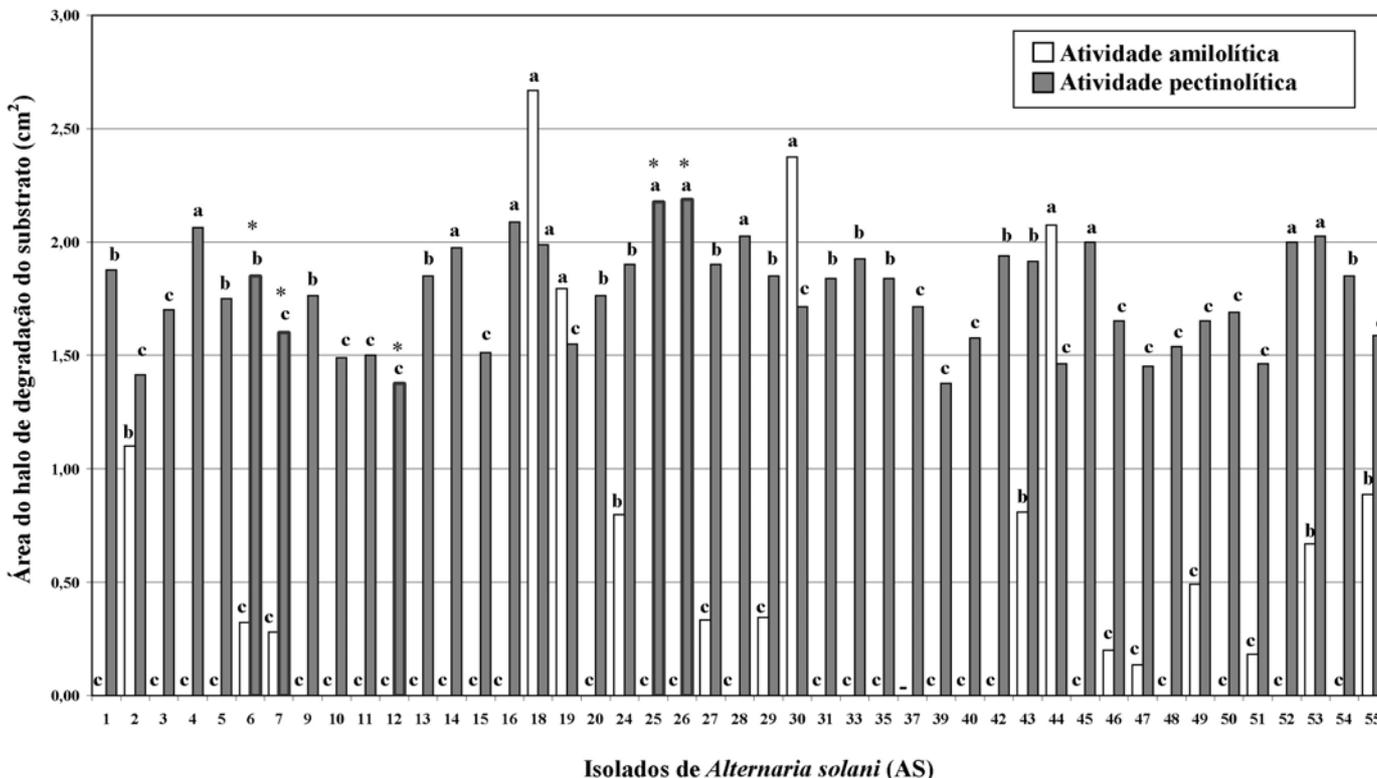


Figura 1. Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani*, estimadas por meio das áreas dos halos de degradação dos substratos específicos (cm²). Barras com asteriscos representam os isolados utilizados para os testes de patogenicidade em tomateiro. Médias (de quatro repetições) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott ($P \leq 0,05$). - Não avaliado quanto à atividade amilolítica (isolado AS37).

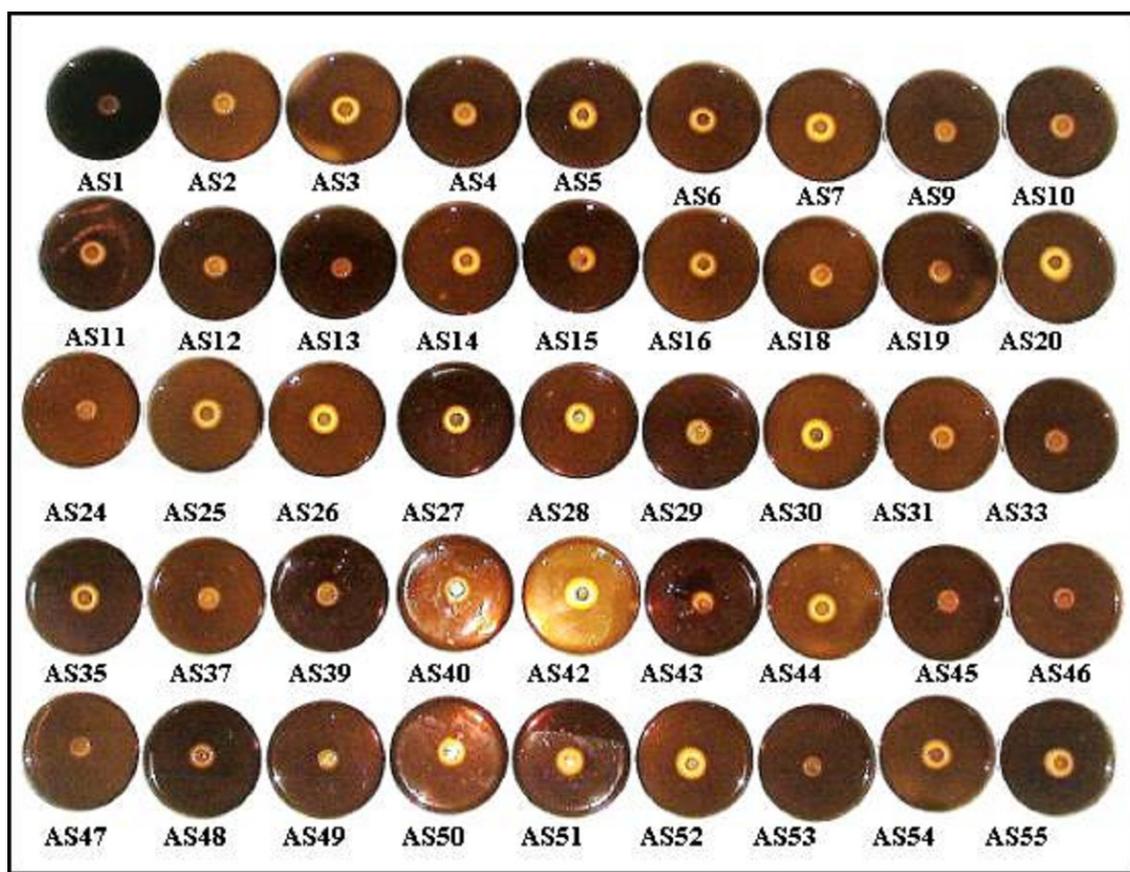


Figura 2. Atividade pectinolítica de isolados de *Alternaria solani* (AS), estimada por meio dos halos de degradação de pectina (áreas claras ao redor dos discos de ágar colonizados por micélio), em meio Mac Ilvaine. Fungo cultivado previamente em meio contendo pectina como fonte de carbono, por sete dias.

foram observados, aproximadamente, 60 h após a inoculação. O PI para os isolados AS26 e AS6, considerados bom e moderado produtor de pectinases, respectivamente, foi de 72 h. Já para AS7 e AS12, fracos produtores de pectinases, o PI foi de 96 h.

A AL calculada no oitavo dia após a inoculação dos folíolos não permitiu diferenciar os isolados de *A. solani* (Tabela 2). A mesma resposta foi observada com a TEL, estimada pelo parâmetro b da equação de regressão linear simples. Por outro lado, houve diferença ($P = 0,039$) entre os isolados quanto à ACPAL.

Não houve correlação significativa entre os valores médios de ACPAL e de área de degradação da pectina (Figura 3A). Desconsiderando-se o AS6, oriundo da batateira, a correlação entre a atividade pectinolítica e agressividade dos isolados tornou-se mais evidente (Figura 3B).

B. Plantas inteiras

Foram utilizados os isolados inoculados em folíolos destacados, mais o AS25, considerado bom produtor de pectinases. Não houve variação significativa entre os isolados quanto ao NL desenvolvidas em tomateiro (Tabela 2). Com relação à AL, foi possível classificar os isolados em três grupos: G1 - agressivos (AS25 e AS26), G2 - moderadamente agressivos (AS7 e AS12) e G3 - pouco agressivo (AS6).

Não houve correlação entre os valores médios de NL e de área de degradação da pectina. Quanto a AL, excetuando-se o AS6, pareceu que os isolados com maior atividade pectinolítica desenvolveram lesões

maiores, o que foi confirmado pela correlação observada ao se desconsiderar o isolado da batateira (Figura 3D).

DISCUSSÃO

Constatou-se haver variação intraespecífica quanto à atividade amilolítica de *A. solani*. Embora o amido tenha constituído fonte de carbono assimilável para *A. solani*, apenas 39% dos isolados analisados produziram halos de degradação quando cultivados em meio contendo o substrato específico. É provável que o tempo de cultivo em MMA, cinco dias, não tenha sido suficiente para induzir a síntese de amilases em todos os isolados. O período de incubação é importante para a indução da atividade enzimática, e há aumento significativo do diâmetro do halo de degradação após 10 dias de cultivo no substrato específico (5). Por outro lado, cinco dias de incubação foram suficientes para observar atividade amilolítica em *Cladosporium herbarum* (3). Visto que todos os isolados estabeleceram colônia em MMA, acredita-se que *A. solani* permaneceu o tempo necessário para a indução de amilases e que a grande parte dos isolados tenha apresentado baixa produção amilolítica, não detectável no ensaio de difusão em meio sólido específico.

Dos 17 isolados do fungo que produziram halos de degradação de amido, 9 foram coletados de batateira, 6 de tomateiro e 2 de plantas de berinjela. Aparentemente, os isolados de batateira apresentaram maior habilidade para hidrolisar amido do que os isolados de tomateiro, como observado anteriormente (9). Tais constatações podem ser

Tabela 2. Agressividade de isolados de *Alternaria solani* com diferentes atividades pectinolíticas, em folíolos destacados e em plantas inteiras de tomate.

Isolado	Folíolos destacados			Plantas inteiras	
	AL ¹	ACPAL ²	TEL ³	NL ⁴	AL ⁵
AS6	11,503 ⁶ a	17,143 b	0,740 a	7,476 a	0,197 b
AS7	23,906 a	40,250 ab	0,938 a	8,928 a	0,292 ab
AS12	32,861 a	40,348 ab	0,956 a	7,275 a	0,300 ab
AS25	-	-	-	8,500 a	0,335 a
AS26	46,628 a	90,443 a	1,050 a	5,680 a	0,352 a

¹Área da lesão (mm²) no oitavo dia após a inoculação.

²Área abaixo da curva de progresso da área da lesão (mm²).

³Taxa de expansão da lesão (logit/dia), estimada pelo parâmetro b da equação de regressão linear simples, tendo a proporção do índice diário da área da lesão (y) na forma linearizada do modelo logístico $\{y = \ln [y/(1 - y)]\}$ como variável dependente e o tempo em dias após a inoculação como variável independente.

⁴Número de lesões/cm² de área foliar.

⁵Área lesionada (cm²)/cm² de área foliar no sétimo dia após a inoculação.

⁶Médias de quatro repetições e seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

indicativos do possível envolvimento de enzimas amilases na interação *A. solani*-batateira. Pelo menos para a infecção de tubérculos, os quais possuem 65 a 80% da matéria seca composta por amido (21), acredita-se que as amilases sejam requeridas. A participação das amilases nesse patossistema precisa ser melhor investigada.

Para garantir a indução de pectinases, maior atenção foi dedicada ao período de incubação de *A. solani* em meio contendo pectina, o qual foi definido com base na atividade de pectina liase (PL). Sete dias de incubação em MMT possibilitaram observar atividade pectinolítica em todos os isolados, independente da origem. A alta frequência dos halos de degradação do substrato sugeriu a importância das pectinases em alguma fase do ciclo de vida de *A. solani*. Adicionalmente, o ensaio de difusão em meio sólido permitiu constatar a variabilidade intraespecífica de *A. solani* quanto à atividade pectinolítica.

Os fenótipos obtidos pela caracterização enzimática abrangeram todas as categorias possíveis, sendo que apenas AS18 foi bom produtor de pectinases e amilases. Em geral, os isolados de tomateiro foram mais hábeis em degradar a pectina do que o amido. Por sua vez, os isolados de batateira apresentaram boa atividade amilolítica e fraca à moderada atividade pectinolítica. Tais evidências corroboraram com a hipótese de que o perfil enzimático do isolado é relacionado ao hospedeiro original de onde foi coletado.

Em virtude da predominância da atividade pectinolítica nos isolados de tomate, testes de patogenicidade foram conduzidos em tomateiro para verificar apenas a influência das pectinases na agressividade de *A. solani*.

Em folíolos destacados, observou-se que os isolados do fungo com maior atividade pectinolítica apresentaram menor PI, o que sugere a contribuição das pectinases a partir dos estágios iniciais da doença. Contudo, não foi constatada correlação entre a produção de pectinases

e a severidade da pinta preta (ACPAL). O resultado foi influenciado pelo isolado de batateira (AS6), o qual mesmo apresentando moderada atividade pectinolítica foi classificado como pouco agressivo. A menor agressividade do isolado AS6 pode ter sido reflexo da especificidade de hospedeiro, a qual tem sido relatada entre os isolados de batateira e de tomateiro, inclusive por meio de marcadores moleculares (9, 19, 30, 35). Isolados de batateira são menos agressivos em diferentes genótipos de tomateiro (9, 19). Com a exclusão do isolado de batateira (AS6) da análise houve indício de que o aumento da atividade pectinolítica facilitaria o desenvolvimento da lesão em folíolos destacados de tomateiro.

Visto que a remoção dos folíolos do tomateiro poderia influenciar nos resultados, teste de patogenicidade foi conduzido também em plantas inteiras. Os cinco isolados de *A. solani*, com distintas atividades pectinolíticas, apresentaram diferenças quanto à agressividade ao tomateiro. Novamente, não houve correlação entre atividade pectinolítica e a severidade da pinta preta quando a análise foi realizada com dados referentes ao isolado AS6. Quando se confrontaram os valores da produção de pectinases e da AL, desconsiderando o isolado da batateira, observou-se correlação positiva.

É possível que o conjunto de pectinases e suas isoenzimas sintetizadas pelo isolado AS6 não o tenha favorecido ao longo da infecção do tomateiro, constituindo uma das causas da agressividade reduzida. Algumas dessas enzimas parecem afetar a agressividade de isolados em diferentes hospedeiros, ou seja, podem contribuir para especialização patogênica (1). Por outro lado, essa menor agressividade pode ter sido provocada pela ausência e/ou presença de outros fatores intrínsecos ao isolado.

Existem evidências consideráveis sobre a importância das enzimas

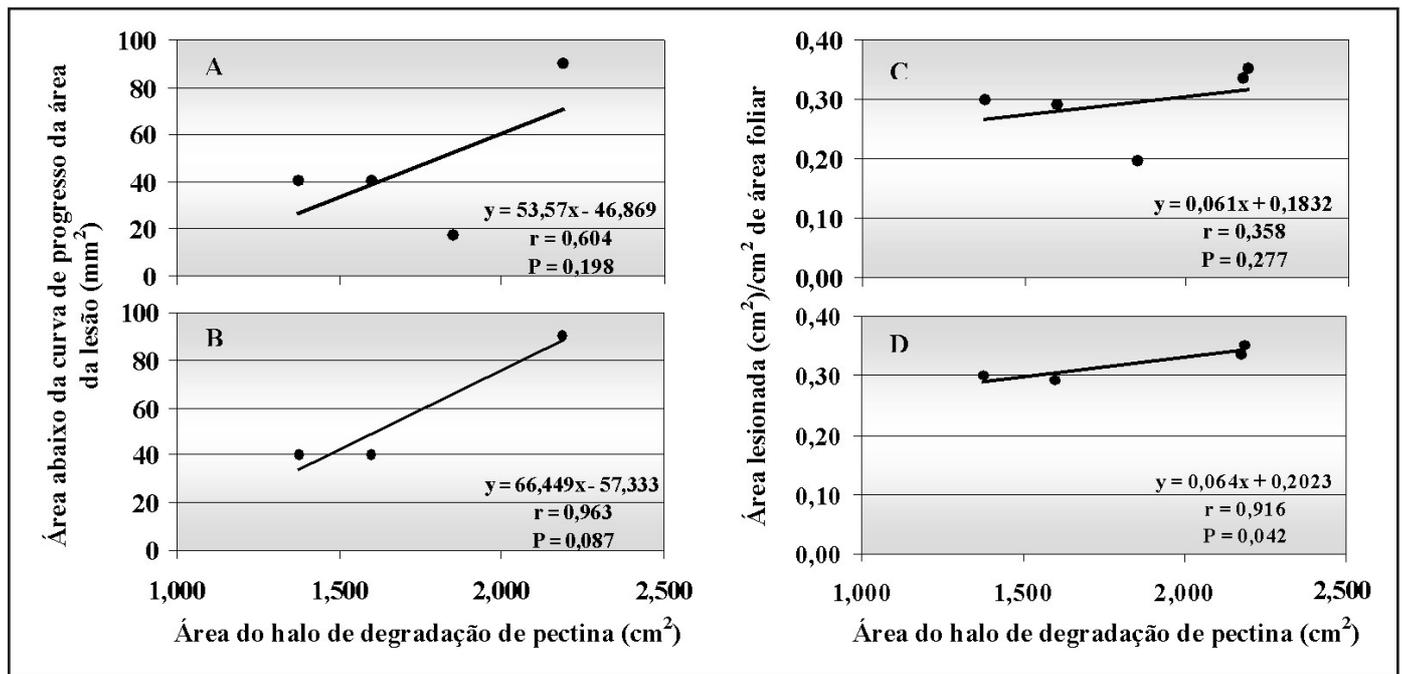


Figura 3. Relação entre atividade pectinolítica de *Alternaria solani*, estimada pela área do halo de degradação de pectina (cm²), e a patogenicidade em folíolos destacados (A e B) ou plantas inteiras de tomate (C e D), com (A e C) e sem (B e D) o isolado AS26 de batateira. Pontos representam médias de quatro repetições.

pécticas no estabelecimento de doenças (23, 24, 36). Ao hidrolisar os polissacarídeos pécticos, os quais correspondem à 1/3 dos componentes totais da parede celular em dicotiledôneas (32), as pectinases podem atuar como fatores de patogenicidade, virulência ou agressividade. Na espécie *A. citri*, por exemplo, o estabelecimento de infecção em citrus foi dependente da atividade de endopoligalacturonidase (15). A inativação de genes codificadores para pectinases em *A. citri* (15), *Botrytis cinerea* (31) e *Nectria hematococca* (23) têm resultado em mutantes com virulência reduzida em citros, tomate e ervilha, respectivamente, comprovando o envolvimento dessas enzimas na patogênese.

Houve alta correlação ($r = 0,900$; $P = 0,05$) entre os resultados dos ensaios de patogenicidade conduzidos em folíolos destacados e em plantas inteiras de tomateiro. O potencial de folíolos destacados de tomateiro para a seleção de genótipos resistentes à pinta preta foi descartado por Foolad *et al.* (10). Contudo, é possível que a técnica de folíolos destacados possa ser explorada para a avaliação da patogenicidade de *A. solani*. A remoção do folíolo pode afetar a fisiologia do hospedeiro, mas no teste de patogenicidade, esse efeito parece não interagir com os isolados do fungo.

As informações geradas vêm somar às evidências de especificidade por hospedeiro em populações de *A. solani*, e apontar para a possível participação de enzimas pécticas na infecção de *A. solani* em tomateiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrios, G.N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
2. Annis, S.L.; Goodwin, P.H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell-wall degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p.1-14, 1997.
3. Barbosa, M.A.G.; Rehn, K.G.; Menezes, M.; Mariano, R.L.R. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, p.98-104, 2001.
4. Castellani, A. The "water cultivation" of pathogenic fungi. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Washington, v.66, p.283-286, 1963.
5. Couto, E.F.; Menezes, M.; Coelho, R.S.B. Avaliação da patogenicidade e diferenciação enzimática em meio sólido específico de isolados de *Colletotrichum musae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.28, p.260-266, 2002.
6. Dianese, J.C. **Patologia vegetal: agressão e defesa em sistemas planta-patógeno**. Brasília: Universidade Nacional de Brasília, 1989. 139p.
7. Di Piero, R.M.; Pascholati, S.F. Produção de celulases por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e seu papel na patogenicidade em algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, p.336-341, 2000.
8. Euclides, R.F. **Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas)**. Viçosa: UFV, 1983. 59 p.
9. Fancelli, M.I. **Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *A. solani* f. sp. *lycopersici***. 1992. 80f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
10. Foolad, M.R.; Ntahimpera, N.; Christ, B.J.; Lin, G.Y. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, p.967-972, 2000.
11. Griffin, D.H. **Fungal physiology**. 2. ed. New York: John Wiley, 1994. 458p.
12. Hancock, J.G.; Millar, R.L. Association of cellulolytic, proteolytic,

- and xylolytic enzymes with southern anthracnose, spring black stem, and *Stemphylium* leaf spot of alfafa. **Phytopathology**, St. Paul, v.55, n.4, p.356-360, 1965.
13. Hankin, L.; Anagnostakis, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, Bronx, v.67, n.4, p.597-607, 1975.
 14. Herbert, C.; O'Connell, R.; Gaulin, E.; Salesses, V.; Esquerré-Tugayé, M.T.; Dumas, B. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v.41, p.140-147, 2004.
 15. Isshiki, A.; Akimitsu, K.; Yamamoto, M.; Yamamoto, H. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v.14, p.749-757, 2001.
 16. Lalaoui, F.; Halama, P.; Dumortier, V.; Paul, B. Cell wall-degrading enzymes produced in vitro by isolates of *Phaeosphaeria nodorum* differend in aggressiveness. **Plant Pathology**, Oxford, v.49, p.727-733, 2000.
 17. Lima Filho, R.M.; Oliveira, S.M.A.; Menezes, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.620-625, 2003.
 18. Mahmoud, A.L.E.; Omar, S.A. Enzymatic activity and mycotoxin-producing potencial of fungi isolated from rotted lemons. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v.15, p.117-124, 1994.
 19. Martínez, S.P.; Snowdon, R.; Pons-Kühnemann, J. Variability of Cuban and international populations of *Alternaria solani* from different hosts and localities: AFLP genetics analysis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.110, p.399-409, 2004.
 20. Pascholati, S. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorin, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.343-364.
 21. Pereira, A.S. Composição química, valor nutricional e industrialização. In: REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Produção de batata**. Brasília:Linha Gráfica, 1987. p.12-28.
 22. Rodrigues, A.A.C. **Fungos endofíticos de sementes de caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, e diferenciação morfológica, patogênica e enzimática de espécies de *Fusarium***. 1999. 87f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
 23. Rogers, L.M.; Kim, Y.K.; Guo, W.; González-Candelas, L.; Li, D.; Kolattukudy, P.E. Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hemato-cocca*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, p.9813-9818, 2000.
 24. Roncero, M.I.G.; Pietro, A. Di; Ruiz-Roldán, M.C.; Huertas-González, M.D.; Garcia-Maceira, F.I.; Mégleez, E.; Jiménez, A.; Caracuel, Z.; Sancho-Zapatero, R.; Hera, C.; Gómez-Gómez, E.; Ruiz-Rubio, M.; González-Verdejo, C.I.; Páez, M.J. Papel de enzimas líticas de la pared celular em la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Bilbao, v.17, p. S47-S53, 2000.
 25. Rotem, J. **The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity**. St. Paul: APS Press, 1994. 326p.
 26. Sachslehner, A.; Nidetzky, B.; Kulbe, K.D.; Haltrich, D. Induction of mannanase, xylanase, and endoglucanase activities in *Sclerotium rolfsii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.594-600, 1998.
 27. Santos, A.M.P.V.; Matsumura, A.T.S.; Lopes, P.T.C. Caracterização de atividade enzimática extracelulares em isolados de *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, supl., p.435-435, 2000. (Resumo).
 28. SAS - STATISTICAL ANALYSES SYSTEM. User's guide: statistics. version 8, v.2, Cary: 1999-2001.
 29. Silva, R.L.X.; Oliveira, S.M.A.; Barbosa, M.A.G.; Burity, H.A. Utilização de enzimas no estudo da capacidade fitopatogênica e da caracterização de isolados de *Sclerotium rolfsii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, supl., p.423-423, 2000. (Resumo).
 30. Scheuermann, K.K.; Falleiro, B.A.S.; Reis, A.; Brommonschenkel, S.H.; Mizubuti, E.S.G. Seleção de marcadores RADP para estudo de diversidade genética de *Alternaria solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, supl., p.49-50, 2004. (Resumo).
 31. Ten Have, A.; Mulder, W.; Visser, J.; van Kan, J.A. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of Botrytis cinerea. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v.11, p.1009-1016, 1998.
 32. Thomma, B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.4, p.225-236, 2003.
 33. Tonukari, N.J.; Scott-Craig, J.S.S.; Walton, J.D. The *Cochliobolus carbonum* *SNF1* gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. **The Plant Cell**, Rockville, v.12, p.237-248, 2000.
 34. Torres, J.C.; Ventura, J.A. AVACPD: um programa para calcular a área e volume abaixo da curva de progresso da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.16, supl., p.8-8, 1991. (Resumo).
 35. Weir, T.L.; Huff, D.R.; Christ, B.J.; Romaine, C.P. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. **Mycologia**, Bronx, v.90, p.813-821, 1998.
 36. Yakoby, N.; Beno-Moualem, D.; Keen, N.T.; Dinooor, A.; Pines, O.; Prusky, D. *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.14, p.988-995, 2001.
 37. Yao, C.; Köller, W. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: different cutinases are expressed during saprophytic and pathogenic stages of *Alternaria brassicicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.8, p.122-130, 1995.