

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Stemphylium sp.*
SOB DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE
AMBIENTE

FERNANDA CORRÊA DE SOUZA

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Stemphylium sp.*
SOB DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE
AMBIENTE**

FERNANDA CORRÊA DE SOUZA

Sob a Orientação da Professora
Margarida Goréte Ferreira do Carmo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Outubro de 2015

632.3

S729c

T

Souza, Fernanda Corrêa de, 1988-

Crescimento e esporulação de isolados de *Stemphylium* sp. sob diferentes meios de cultura e condições de ambiente / Fernanda Corrêa de Souza. - 2015.

51 f.: il.

Orientador: Margarida Goréte Ferreira do Carmo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, 2015.

Bibliografia: f. 32-39.

1. Fitopatologia - Teses. 2. Tomate - Doenças e pragas - Teses. 3. *Stemphylium* - Teses. 4. *Stemphylium* - Reprodução - Teses. 5. *Stemphylium* - Cultura e meios de cultura - Teses. 6. *Stemphylium* - Efeito da temperatura - Teses. I. Carmo, Margarida Goréte Ferreira do, 1963- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO FITOTECNIA

FERNANDA CORRÊA DE SOUZA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 08 / 10 / 2015

Margarida Goréte Ferreira do Carmo, Dr^a (UFRRJ).
(Orientadora)

Marcelo Elias Fraga, Dr (UFRRJ)

Maria do Carmo de Araújo Fernandes, Dr^a (PESAGRO-RIO)

A Deus por me guiar nessa caminhada

OFEREÇO

Aos meus pais Carlos e Fatima, ao meu filho amado Guilherme e ao amor que a rural meu deu, Luís Gustavo.

DEDICO

A todos com muito amor

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente na minha vida, me guiando e dando força para nunca desistir dos meus sonhos.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro ao projeto.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de estudo.

Aos meus pais Carlos José de Souza e Fatima Corrêa de Souza, pela dedicação, pela preocupação, pelo carinho, por sempre me fortalecerem e, principalmente, pelo amor incondicional.

Aos meus familiares, avós e tios, pelo apoio e incentivo dado durante esses dois anos.

Ao meu filho Guilherme Souza Galvão, por tentar entender, em muitos momentos, minha ausência, sem você nenhuma conquista valeria a pena.

Ao amor da minha vida Luís Gustavo Rocha Galvão, pelo companheirismo, ajuda e amor nesse momento.

À Professora Margarida Goréte Ferreira do Carmo pelos ensinamentos, oportunidade e orientação.

Às amigas Jessica Coelho Melo e Vanessa Oliveira pelos anos de amizade, cumplicidade, incentivo, ajuda e risadas.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes pela ajuda, companheirismo e incentivo, dividindo experiências ao longo desses anos.

Às estagiárias Kaoany Ferreira da Silva e Paula de Faria Lyra por toda colaboração, empenho e amizade nas horas de trabalho.

À amiga de laboratório Lígia Sayko Kowata Dresch pelos ensinamentos, sugestões, ajuda e atenção durante o desenvolvimento desse trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, minha sincera gratidão.

RESUMO

SOUZA, Fernanda Corrêa. **Crescimento e esporulação de *Stemphylium* sp. sob diferentes meios de cultura e condições de ambiente.** 2015. 51p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

A cultura do tomate está sujeita ao ataque de doenças de diferentes etiologias, com destaque para a mancha-de-estenfílio, causada por *Stemphylium* sp., que infecta a parte aérea da planta e tem apresentado maiores incidências e perdas nas áreas de cultivo nos últimos anos. Apesar da importância desta doença, são poucos os estudos realizados visando esclarecer aspectos da epidemiologia e controle da doença. Para realização desses trabalhos é fundamental o uso de ensaios que envolvam inoculações do patógeno o que requer métodos eficientes de sua multiplicação *in vitro*. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a influência de alguns fatores sobre o crescimento micelial e esporulação do patógeno em condições controladas. Diferentes meios de cultura (V8, suco de tomate, BDA, aveia, cenoura, farinha de milho, folha de tomate e V8+BDA), temperatura (25 °C, 25+10 °C, 25+15 °C, 25+20 °C, 25/10 °C, 25/15 °C; 25/20 °C), fotoperíodo (luz/escuro respectivamente, 0h/24h, 4h/20h, 6h/18h, 8h/16h e 12/12h), luminosidade (lâmpadas brancas frias e lâmpadas de luz negra) e tipos de estresse aplicado à colônia (raspagem e comprimento de onda) foram testados. Após a determinação das melhores combinações de temperatura, fonte de luz e fotoperíodo avaliou-se a virulência dos conídios obtidos no sistema selecionado. Os resultados indicaram o meio suco de tomate e V8 como os mais favoráveis ao crescimento e esporulação respectivamente. A temperatura de 25 °C contínuos favoreceu o crescimento micelial e a alternância de 25 °C (diurno) e 10 °C (noturno) a esporulação. O fotoperíodo 12h luz/12h escuro foi o que mais estimulou o crescimento, já para esporulação o estímulo foi maior quando foi oferecido 6h luz/18h escuro. As diferentes fontes de luz utilizadas tiveram influência marcante na esporulação, sendo as lâmpadas brancas frias as mais estimulantes. As colônias que não sofreram estresse obtiveram melhores resultados na produção de conídios. Dessa forma, o protocolo sugerido neste trabalho consistiu de inoculação em meio V8, temperatura alternada de 25 °C (diurno) e 10 °C (noturno), fotoperíodo de 6 horas de luz branca/18 horas de escuro. Os conídios produzidos nesta metodologia apresentam grande capacidade de infecção de plantas de tomateiro.

Palavras-chave: mancha-de-estenfílio, temperatura, fotoperíodo, esporulação *in vitro*, virulência.

ABSTRACT

SOUZA, Fernanda Corrêa. **Growth and sporulation of *Stemphylium* sp. under different culture media and environment conditions**. 2015. 51p. Dissertation (Master in Agronomy, Crop production). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The tomato crop is subject to attack by diseases of different etiologies, especially the gray leaf spot, caused by *Stemphylium* sp., which infects the aerial part of the plant and has shown higher incidences and losses in growing areas in recent years. Despite the disease importance, few studies are developed to elucidate the aspects of epidemiology and control of the disease. The use of trials involving pathogen inoculations is essential for carrying out these studies, which requires efficient methods of *in vitro* multiplication. The aim of this study was to verify the influence of some factors applied during incubation on the mycelial growth and sporulation of the pathogen under controlled conditions. Different culture media (V8 juice agar, tomato juice, PDA, oat, carrot, corn flour, tomato leaf and V8+PDA), temperature (25°C; 25+10°C; 25+15°C; 25+20°C; 25/10°C; 25/15°C; 25/20°C), photoperiods (day/night, respectively, of 0h/24h, 4h/20, 6h/18h, 8h/16h and 12h/12h), luminosity (cool white lamps and black light lamps) and stress types applied to the colony (scratching and UV) were tested. Promising factors were determinate and, after this, the virulence of conidia obtained on the selected system was evaluated. Results indicated the tomato juice and V8 juice agar more favorable for growth and sporulation, respectively. The temperature of 25°C continuous favored mycelial growth and alternation of 25°C (day) and 10°C (night) the sporulation. The growth was more stimulated by 12h light/ 12h dark of photoperiod and the sporulation was higher 6h light/ 18h dark. The different light sources had influence on sporulation and cool white lamps were the most stimulating. Not stressed colonies had better results in conidia production. Thus, the suggested protocol in this study consisted in incubation in V8 juice agar media, alternately temperature of 25°C (day) and 10°C (night), 12h light / 12 h dark photoperiod. The produced conidia in this methodology showed great capacity of infection on tomato plants.

Key-words: gray leaf spot, temperature, photoperiods, sporulation *in vitro*, virulence.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Códigos, origem, hospedeiro de origem e data de coleta dos isolados utilizados nos estudos.	12
Tabela 2. Análise de variância para efeito de isolado, meio de cultura e interação entre estes sobre o crescimento micelial, expresso pela Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e esporulação (conídio mm ⁻²), <i>in vitro</i> , de <i>Stemphylium</i> sp.. Seropédica, UFRRJ, 2015.	17
Tabela 3. Crescimento micelial, expresso pela Área Abaixo da Curva de Crescimentno Micelial (AACCM) e produção de conídios de quatro isolados de <i>Stemphylium</i> sp., expresso por número de conídios por mm ⁻² de colônia em diferentes meios de cultura. Seropédica, UFRRJ, 2015.	18
Tabela 4. Análise de variância para efeito de isolado, temperatura e da interação entre isolado e temperatura sobre o crescimento micelial, expresso pelos valores de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e sobre a esporulação (conídio mm ⁻²), <i>in vitro</i> , de <i>Stemphylium</i> sp.. Seropédica, UFRRJ, 2015.	20
Tabela 5. Crescimento micelial, expresso pela Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e produção de conídios, expresso por número de conídios por mm ² de colônia de <i>Stemphylium</i> sp. em diferentes temperaturas. Seropédica, UFRRJ, 2015.	21
Tabela 6. Análise de variância para efeito de isolado, regime de luz e interação entre estes sobre o crescimento micelial, expresso pela Area Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e esporulação (conídio mm ⁻²), <i>in vitro</i> , de <i>Stemphylium</i> sp.. Seropédica, UFRRJ, 2015.	22
Tabela 7. Análise de Regressão referente à esporulação e AACCM de diferentes isolados de <i>Stemphylium</i> sp., em diferentes regimes de luz.	23
Tabela 8. Análise para a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e esporulação (conídio mm ⁻²), <i>in vitro</i> , de <i>Stemphylium</i> sp., utilizando diferentes fontes de luz. Seropédica, UFRRJ, 2015.	26
Tabela 9. Crescimento micelial, expresso pela Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), e produção de conídios, <i>in vitro</i> , de quatro isolados de <i>Stemphylium</i> em duas fontes de luz. Seropédica, UFRRJ, 2015.	26
Tabela 10. Análise de variância para esporulação (conídio mm ⁻²), <i>in vitro</i> , de <i>Stemphylium</i> sp., utilizando diferentes estresses da colônia. Seropédica, UFRRJ, 2015.	27
Tabela 11. Produção de conídios, <i>in vitro</i> , de <i>Stemphylium</i> sp., expresso por número de conídios por mm ² de colônia, em diferentes estresses da colônia. Seropédica, UFRRJ, 2015.	27
Tabela 12. Análise de variância referente ao progresso da mancha-de-estenfílio, causada por diferentes isolados de <i>Stemphylium</i> sp., em plantas de tomateiro. Seropédica, UFRRJ, 2015.	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esporulação (conídios mm^{-2}) e Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), dos isolados SENA 106, SENA 108, SENA 301 e SENA 304, em função dos períodos de escuro. Seropédica, UFRRJ, 2015.24
- Figura 2.** Severidade da mancha-de-estenfílio, causada por diferentes isolados de *Stemphylium* sp., em condições controladas (câmara de crescimento). Seropédica, UFRRJ, 2105.29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O Tomateiro.....	3
2.1.1. Origem e história.....	3
2.1.2. Taxonomia e características da planta.....	3
2.1.3. Exigências climáticas.....	4
2.1.4. Situação econômica.....	4
2.1.5. Doenças do tomateiro.....	5
2.2. Mancha-de-Estenfílio.....	5
2.2.1. Importância.....	5
2.2.2. Agentes causadores e classificação taxonômica.....	5
2.2.3. Sintomatologia.....	6
2.2.4. Epidemiologia.....	7
2.2.5. Controle.....	8
2.3. Considerações Gerais Sobre Crescimento e Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp. <i>in vitro</i>	8
2.3.1. Influência do meio de cultura no crescimento micelial e esporulação de fungos.....	8
2.3.2. Influência da temperatura no crescimento micelial e esporulação de fungos.....	9
2.3.3. Influência da luminosidade no crescimento micelial e esporulação de fungos.....	10
2.3.4. Influência de fatores estressantes sobre a esporulação de fungos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Obtenção dos Isolados.....	12
3.2. Influência do Meio de Cultura no Crescimento Micelial e Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp.....	12
3.3. Influência da Temperatura no Crescimento Micelial e Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp.....	13
3.4. Influência do Fotoperíodo no Crescimento Micelial e Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp. .	14
3.5. Influência da Fonte de Luz na Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp.	14
3.6. Influência de Diferentes Estresses da Colônia na Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp.....	15
3.7. Avaliação da Virulência dos Isolados Obtidos nas Condições de Cultivo Seleccionados..	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Influência do Meio de Cultura no Crescimento Micelial e Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp.....	17
4.3. Influência da Temperatura no Crescimento Micelial e Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp..	19
4.4. Influência do Fotoperíodo no Crescimento Micelial e Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp. .	22
4.5. Influência da Fonte de Luz no Crescimento Micelial e Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp.	25
4.6. Influência de Diferentes Estresses da Colônia na Esporulação de <i>Stemphylium</i> sp.....	27
4.7. Avaliação da Virulência dos Isolados Cultivados no Sistema Acima de Cultivo Seleccionado.....	28
5. CONCLUSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
7. ANEXOS.....	40

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) destaca-se entre as diferentes hortaliças cultivadas pela sua importância econômica e social, distribuição geográfica e versatilidade culinária (FILGUEIRA, 2008). Pode ser cultivado em regiões tropicais e subtropicais no mundo inteiro, tanto para o consumo *in natura* como para a indústria de processamento, destacando-se como a segunda hortaliça mais cultivada no mundo sendo superada apenas pela batata.

O Brasil é o oitavo produtor mundial de tomate, com produção de cerca de 4.291.160 toneladas. Esta produção concentra-se nos Estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais, responsáveis por aproximadamente 60% da produção nacional. O estado do Rio de Janeiro é o sétimo maior produtor nacional de tomate, com cerca de 207.424 toneladas, o que corresponde a 5% da produção nacional (IBGE, 2014).

A planta de tomate pode ser infectada por diversos patógenos que podem provocar perda na produtividade e na qualidade dos frutos. De 15 a 30% do custo total de produção de tomate é atribuído ao uso de fungicidas no combate de doenças foliares causadas por fungos fitopatogênicos (LOPES *et al.*, 2005). Dentre essas doenças está a mancha-de-estenfílio que pode ser causada por *Stemphylium solani* (WEBER, 1930) e, ou *Stemphylium lycopersici* (ELLIS & GIBSON, 1975) no Brasil.

A mancha-de-estenfílio pode ocorrer durante todo o ciclo da cultura e, provocar, sob condições ideais de temperatura e umidade, a redução da área foliar e encurtar o ciclo da planta, conseqüentemente, queda na produção (KRANZ, 1977; MELLO, 1995; OLIVEIRA, 1997). As informações sobre as condições ótimas para o desenvolvimento de epidemia são escassas. Há relatos de que as infecções por *Stemphylium* são favorecidas por condições de ambiente com alta umidade relativa e temperatura de 25 a 30 °C (KRANZ, 1977) ou 24 a 27 °C (JONES, 1991). O controle da doença é baseado na aplicação de fungicidas e no uso de cultivares resistentes.

Apesar da importância da mancha-de-estenfílio, poucos são os estudos realizados visando esclarecer aspectos relacionados à biologia do patógeno e epidemiologia da doença. Uma das limitações hoje encontradas para se estudar este patossistema é a dificuldade de se produzir inóculo do patógeno *in vitro*. E, para o desenvolvimento de tais trabalhos, bem como para estudos genéticos, citológicos, implantação de programas de melhoramento e busca de novos métodos de controle é fundamental o uso de ensaios que envolvam inoculações do patógeno. Para a obtenção deste inóculo, por sua vez, é essencial o desenvolvimento de protocolos simples e que resultem em rápida e abundante produção de conídios *in vitro*.

Espécies do gênero *Stemphylium* apresentam grande variabilidade na virulência, e na habilidade de crescer e esporular em cultura pura. Sabe-se que a composição do meio de cultura, a temperatura e a luz determinam a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação de fungos (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Nozaki *et al.* (2004), afirmam que nem sempre as condições que favorecem o crescimento são as mesmas para esporulação, pois a luz exerce efeito direto sobre o fungo, induzindo ou inibindo a formação de estruturas reprodutivas. Segundo estes autores, alguns meios de cultura são mais favoráveis para esporulação de fungos que outros, por apresentarem carboidratos complexos que são menos adequados para a produção de hifas vegetativas, porém mais adequados à produção de esporos.

Tendo como base o exposto, o presente trabalho teve como objetivos: (i) identificar o melhor meio de cultura e as melhores condições de temperatura para o crescimento micelial e esporulação de *Stemphylium* sp. *in vitro*; (ii) identificar o melhor comprimento de onda e regime de luz para o crescimento micelial e esporulação do patógeno; (iii) identificar fatores

de estresse da colônia que possam contribuir para estimular a esporulação e (iv) avaliar a virulência dos conídios obtidos nos sistemas acima estudados e selecionados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Tomateiro

2.1.1. Origem e história

O tomateiro é originário da costa ocidental da América do Sul, entre Equador e Chile e domesticado no México, pelos Maias (ALMEIDA, 2006). Para alguns autores, o tomate é descendente de algumas espécies silvestres que produzem frutos vermelhos e pequenos, o tomate cereja (CANDOLLE, 1886; MARANCA, 1981; STEVENS & RICK, 1986). Contudo, investigações genéticas têm mostrado que as plantas conhecidas como ‘*cerasiforme*’ são originárias do cruzamento entre tomates silvestres e cultivados, em vez de ser ‘ancestral’ das espécies cultivadas (NESBITT & TANKSLEY, 2002; BLANCA *et al.*, 2012).

A cultura do tomateiro foi levada para Europa pelos espanhóis no século XVI e consumido inicialmente pelos italianos, porém, somente dois séculos após a sua introdução (FILGUEIRA, 2008).

No Brasil, seu hábito de consumo foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX (ALVARENGA *et al.*, 2004).

2.1.2. Taxonomia e características da planta

O tomate pertence à ordem *Tubiflorae*, família *Solanaceae* e ao gênero *Solanum*. Quanto ao gênero, alguns autores o relatam como pertencente à *Solanum* (PERALTA *et al.*, 2006; TOURNEFORT, 1964). A classificação original do tomateiro foi feita por Linnaeus em 1753 utilizando o sistema binomial e o enquadrando no gênero *Solanum* (PERALTA *et al.*, 2006). A espécie foi, porém, reclassificada por Miller em 1754, como pertencente ao gênero *Lycopersicon* com a descrição de várias espécies por este mesmo autor em 1768, incluindo a espécie cultivada, *L. esculentum*. Tendo em vista as similaridades genéticas entre *Lycopersicon esculentum* e espécies do gênero *Solanum*, foi proposta a sua reclassificação e reposicionamento. Assim, tendo como base evidências obtidas a partir de estudos filogenéticos utilizando seqüência de DNA (SPOONER *et al.*, 2005), estudos morfológicos e de distribuição das plantas tem sido aceita a sua reclassificação e denominação científica como *Solanum lycopersicum* (PERALTA *et al.*, 2006; SPOONER *et al.*, 2003; WARNOCK, 1988), conforme consta no *Code of Nomenclature for Cultivated Plants* (BRICKELL *et al.*, 2004).

A planta de tomateiro é herbácea, com caule flexível e incapaz de suportar o seu próprio peso, especialmente quando em fase de frutificação, e com abundante ramificação. Desta forma, em lavouras de tomate para consumo *in natura* tem se como prática a sua condução em suportes ou tutores e as podas das gemas laterais alterando a sua conformação natural que lembra uma moita.

No entanto dentro da espécie podem ser encontradas plantas com dois tipos de hábitos de crescimento: a) crescimento indeterminado que predomina na maioria das cultivares para mesa, que são conduzidas tutoradas e podadas; b) crescimento determinado é valorizado para as cultivares destinadas para produção de tomate industrial, cultivadas de forma rasteira (FILGUEIRA, 2008).

O tomate é propagado comercialmente pelas sementes. Estas são pequenas, de formato reniforme e ricas em tricomas de coloração marrom-clara (ALVARENGA, 2004). As folhas

são compostas, alternadas (ALVARENGA, 2004) e o sistema radicular do tipo pivotante, com cerca de 80% das raízes nos primeiros 45 cm de profundidade (ESPINOZA, 1991).

As flores são pequenas, amarelas e hermafroditas e se agrupam em cachos. Os cachos podem ser do tipo simples (não ramificado) ou composto (ramificado) (MINAMI & HAAG, 1989). Os frutos são bagas carnosas, suculentas, com aspecto, tamanho e peso variados, conforme a cultivar. São tipicamente climatéricos e iniciam o seu amadurecimento com a elevação na atividade respiratória. A coloração vermelha é a mais comum, determinada por uma mistura de dois pigmentos, o licopeno (vermelho) e o caroteno (amarelo) (FILGUEIRA, 2008).

2.1.3. Exigências climáticas

A cultura adapta-se melhor ao cultivo em clima tropical de altitude, como o das regiões serranas ou de planalto, e também em clima subtropical ou temperado, seco e com luminosidade elevada (FILGUEIRA, 2008).

O tomateiro é exigente em termoperiodicidade diária, isto é, requer temperaturas diurnas amenas e noturnas menores, com diferença de 6-8 °C entre elas. As temperaturas ótimas são 21-28 °C, de dia, e 15-20 °C, de noite, variando em razão da idade da planta e da cultivar. Temperaturas excessivas, diurnas ou noturnas, constituem fator limitante à tomaticultura, prejudicando a frutificação e o pegamento dos frutininhos. Temperaturas diurnas amenas favorecem a polinização e a produtividade e baixas temperaturas retardam a germinação, emergência da plântula e crescimento vegetativo. O tomateiro se comporta como indiferente ao fotoperíodo. A alta umidade do ar favorece a ocorrência de doenças fúngicas e bacterianas (FILGUEIRA, 2008).

2.1.4. Situação econômica

A cultura do tomate é formada por duas cadeias produtivas distintas, caracterizadas pelos segmentos de mesa, destinado ao consumo *in natura*, e de indústria, destinado ao processamento. Cada cadeia produtiva possui características intrínsecas na produção, beneficiamento, processamento e comercialização, desde as cultivares utilizadas até as formas de cultivo e consumo final.

O tomate é a cultura mais importante, dentre as hortaliças, não só, em termos de produção, como também, em valor econômico, pois é a hortaliça mais industrializada e que emprega um dos maiores contingentes de mão-de-obra, além de estar diretamente na dieta alimentar de grande parte da população (KROSS *et al.*, 2001).

A produção mundial de tomate em 2013 foi de 163.963.770 toneladas, sendo a China, o maior produtor com 50.552.200 toneladas, seguida da Índia e Estados Unidos (FAO, 2013). O Brasil é o oitavo produtor mundial com 4.291.160 toneladas produzidas em 65.146 hectares. Esta produção está concentrada na região sudeste (1.919.438 t), seguida do centro-oeste (1.096.895 t) e nordeste (672.011 t), principalmente nos estados de Goiás (1.025.567 t), São Paulo (849.052 t) e Minas Gerais (674.962 t), que reunidos são responsáveis por 60% da produção nacional (IBGE, 2014).

O estado do Rio de Janeiro é o sétimo maior produtor nacional de tomate com 2.718 hectares plantados, 207.424 toneladas produzidas. A produtividade média do estado (76,42 t ha⁻¹) está acima da média nacional (65,94 t ha⁻¹), no entanto inferior ao estado de Goiás (88,05 t ha⁻¹), o qual se destaca pelo alto nível tecnológico empregado nas lavouras (IBGE, 2014).

A cultura do tomateiro acumulou muitos ganhos genéticos com o melhoramento de plantas, sendo cultivada em regiões mais remotas do mundo, apesar disso, apresenta muitos problemas, principalmente fitossanitários.

2.1.5. Doenças do tomateiro

O tomateiro está sujeito a várias doenças que podem causar redução de produtividade e da qualidade do produto. O conhecimento da etiologia, sintomatologia e epidemiologia é essencial para se definir as estratégias de controle.

Estima-se que cerca de 15% a 30% do custo total de produção de tomate deva-se ao uso de fungicidas para o controle de doenças foliares causadas por fungos (LOPES *et al.*, 2005). Dentre essas doenças está a mancha-de-estenfílio causada pelo fungo *Stemphylium* sp.

2.2. Mancha-de-Estenfílio

2.2.1. Importância

O primeiro relato desta doença foi nos Estados Unidos em 1924, primeiramente na cultura do algodão, e na sequência no tomateiro (WEBER, 1930). A mancha-de-estenfílio desde então vem sendo relatada em outras regiões do mundo.

No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 1945, no Estado do Rio de Janeiro (NAMETAKA & TOKESHI, 1967), apresentando frequência esporádica nos anos seguintes. Por volta de 1967, a doença teve sua ocorrência aumentada nas lavouras de tomateiro devido ao plantio quase que exclusivo da cultivar Santa Cruz, suscetível ao patógeno (NAMETAKA & TOKESHI, 1967). A fim de reduzir as perdas pela doença passou-se a preconizar o cultivo de ‘Ângela’ e, posteriormente de ‘Santa Clara’, resistentes à mancha-de-estenfílio (ALVARENGA, 2004).

Embora seja uma doença destrutiva, foi relatada como de importância secundária no Brasil devido à utilização combinada de fungicidas e variedades resistentes (KUROZAWA & PAVAN, 1997). No entanto, severas epidemias desta doença têm sido relatadas nas várias regiões produtoras do Brasil, sugerindo que os atuais híbridos plantados no país não apresentam resistência ao patógeno, principalmente, os do tipo Longa Vida. Desta forma, existe a necessidade de se buscarem novas estratégias de controle e/ou de verificar a eficiências das já utilizadas, além de se realizarem estudos sobre o patossistema (REIS & BOITEUX, 2006).

2.2.2. Agentes causadores e classificação taxonômica

A mancha-de-estenfílio é uma doença que pode ocorrer em praticamente todas as regiões onde se cultiva o tomateiro, afetando a cultura em diferentes estádios de desenvolvimento. A doença pode ser causada por quatro espécies do gênero *Stemphylium*: *Stemphylium solani* (WEBER, 1930), *Stemphylium lycopersici* (ELLIS & GIBSON, 1975), *S. floridanum* (HANNON & WEBER, 1955) e *S. botryosum* (ROTEM *et al.*, 1966). O gênero *Stemphylium* Wallr., do qual *S. botryosum* Wallr. é a espécie tipo, foi estabelecido em 1833 por Wallroth (SIMMONS, 1967) é classificado como pertencente ao reino *Fungi*; filo: *Ascomycota*; classe: *Dothideomycetes*; sub-classe: *Pleosporomycetidae*; ordem: *Pleosporales* e família *Pleosporaceae*, considerados portanto fungos anarmófitos hifomicetos (KIRK *et al.*,

2008). A forma perfeita da maioria das espécies de *Stemphylium* pertence a Pleospora (Fr.) (SIMMONS, 1969b).

As características do gênero são as seguintes: conídios muriformes e de coloração pálida a castanho, ovais, oblongos, elipsoides ou subféricos, subulares solitários, terminais, frequentemente com constricção na porção mediana do conídio onde está o principal septo transversal, de superfície lisa ou verrugosa. Os mesmos não têm bicos e são produzidos em conidióforos percorrentes, ou seja, que crescem através do próprio ápice (que os difere dos gêneros *Ulocladion e Alternaria*). A extremidade do conidióforo é em geral dilatada. As colônias crescem rápido em meio de cultura e o micélio é de coloração marrom a oliváceo-escuro ou de acinzentado a flocado (ELLIS, 2015).

No Brasil, são relatadas apenas as espécies *S. solani* e *S. lycopersici*, sendo *S. solani* a mais comum. Sua predominância em relação a *S. lycopersici* em lavouras de tomate, deve-se, provavelmente, ao fato de esta espécie ser mais polífaga, ou seja, ser capaz de infectar um maior número de espécies hospedeiras (MENDES *et al.*, 1998). Além do tomateiro, espécies de *S. solani* podem atacar cerca de 20 outras espécies da família das solanáceas, dentre as quais, pimentão (*Capsicum annuum* L.), pimentas (*Capsicum* spp.), o jiló (*Solanum gilo*), a berinjela (*S. melongena*), a lobeira (*S. lycocarpon*) e o algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) (BOITEUX *et al.*, 1993; MEHTA, 1998; MIZUBUTI & BROMMONSCHENKEI, 1996).

As espécies que infectam o tomateiro no Brasil podem ser diferenciadas pelas características morfológicas dos conidióforos e conídios. Os conidióforos do *S. solani* são mais longos (até 200 µm) e estreitos (4-7 µm de largura) que os de *S. lycopersici* (até 140 µm e 6-7 µm de largura). Os conídios de *S. solani* possuem 3 a 6 septos transversais (além dos longitudinais) e em sua maioria com constrito no meio dos septos, medindo de 35-55 X 18-28 µm. Os conídios de *S. lycopersici* são pontiagudos cônico até o ápice, com 1 a 8 septos transversais (alguns longitudinais) e geralmente com constrito nos três maiores septos transversais, medindo de 50-74 x 16-23 µm (ELLIS, 1971).

Isolados de *S. solani* apresentam grande variabilidade nas características morfológicas de suas colônias. Segundo Mehta (1998) as características morfológicas dos isolados de algodão foram diferentes daqueles de isolados de tomateiro. As colônias de isolados de algodão apresentavam crescimento lento quando cultivadas em meio de cultura BDA, atingindo no máximo 66 mm de diâmetro em 10 dias após a incubação, apresentaram coloração cinza escuro com setores e centro aveludado, micélio liso e alguns isolados produziram pigmentos amarelados no centro da colônia, os quais se tornaram avermelhados com o tempo. Já as colônias de isolados de tomate eram lisas, circulares, sem presença de setores e micélio aéreo de coloração branco para rosa.

Mehta (1998) realizou inoculações cruzadas com isolados de *Stemphylium* provenientes do algodoeiro, tomateiro, batata e tremoço azul (*Lupinus angustifolius* L.). O isolado de *S. solani* coletado do tomateiro foi altamente virulento quando inoculado em tomateiro e batata, mas pouco virulento ao algodoeiro. Neste estudo, os isolados de *S. solani* apresentaram pequenas diferenças quanto às características morfológicas e dimensionais dos conídios. Os isolados provenientes do algodoeiro eram levemente curtos, estreitos e apresentavam paredes lisas, ao contrário do isolado do tomateiro que possuíam paredes verrugosas (MEHTA, 1998).

2.2.3. Sintomatologia

No tomateiro, a mancha-de-estenfílio pode ocorrer em quaisquer estádios de desenvolvimento, desde mudas nas sementeiras até o período de colheita, neste último com maior frequência. É provável que o ataque do fungo seja mais intenso próximo à época da

colheita devido à dificuldade em prosseguir o programa de pulverização com fungicidas e ao enfraquecimento natural das plantas (KUROZAWA & PAVAN, 1997). A infecção ocorre principalmente nas folhas, tanto jovens como senescentes. Em condições muito favoráveis podem ser observadas lesões da doença nos pecíolos e nos pedúnculos florais (JONES, 1991; ROTEM & BASHI, 1977). Kowata-Dresch (2014) observou que o *S. solani* é capaz de infectar o fruto do tomateiro, tanto naturalmente como por inoculação.

As lesões ou pintas em seus estágios iniciais são pequenas, encharcadas, pouco visíveis, de coloração marrom a preta. Tornam-se rapidamente necróticas, irregulares, de coloração cinza-escuro, translúcidas, com 3 a 10 mm de diâmetro, freqüentemente rompidas ao atingir seu tamanho máximo. Ocasionalmente, nas folhas mais velhas, atingem 10 mm de diâmetro e coalescem, matando e destruindo extensas áreas dos folíolos (KUROZAWA & PAVAN, 1997).

O principal dano causado pela mancha-de-estenfílio é a redução da área foliar e, conseqüentemente, do potencial produtivo da planta (KUROZAWA & MUSSI, 1995). Segundo esses autores, a incidência é maior em folhas mais novas, afetando principalmente a porção apical. Diferente desta informação, Domingues (2012) e Kowata-Dresch (2014), observaram que a infecção pode ocorrer em qualquer posição das folhas, não ficando limitada nas folhas mais jovens, e ainda, a severidade da doença era maior em folhas mais velhas.

2.2.4. Epidemiologia

O patógeno pode sobreviver em restos culturais no solo ou em plantas que crescem no local de cultivo, em campos ou viveiros abandonados. O fungo pode também infectar diversas solanáceas cultivadas ou nativas, que podem atuar como fonte de inóculo. Pode haver disseminação por sementes, mudas infectadas e insetos, mas o principal agente é o vento (KURIZAWA & PAVAN, 1997). Entretanto, Lopes *et al.* (2005), relatam que não há evidências que o patógeno seja transmitido pela semente.

A maioria das pesquisas sobre a infecção de espécies de *Stemphylium* em diferentes hospedeiros confirma que a temperatura e a umidade são os fatores ambientais mais importantes. A germinação de conídios ocorre rapidamente na presença de água livre sobre a superfície da folha e sob temperaturas entre 24 e 27 °C. Nestas condições, germina e cresce rapidamente e, após dois a três dias, os sintomas aparecem (ALVARENGA, 2004).

A temperatura ótima para o desenvolvimento da doença está entre 25 e 28 °C e alta umidade relativa - maior que 80% (KUROZAWA & PAVAN, 1997). Paulus e Pound (1955) estudaram, em condições controladas, o efeito da temperatura do ar na infecção e desenvolvimento de *S. solani* em tomate, e verificaram que o patógeno apresenta máximo crescimento após 24 horas sob condições de 24 a 26 °C, com umidade relativa de 100%. Segundo Kranz (1977), a temperatura de 26 °C e três horas de molhamento foliar é o mínimo para que ocorra a germinação dos conídios e penetração do tecido hospedeiro por *S. solani*.

A infecção do patógeno em plantas de tomateiro foi estudada nas condições de clima subtropical (Minas Gerais), utilizando-se técnicas histológicas e de microscopia eletrônica de varredura (BENTES & MATSUOKA, 2005). Os autores observaram que os conídios germinaram após seis horas, originando vários tubos germinativos, dos quais somente um ou, eventualmente, dois penetraram no hospedeiro. As hifas penetram principalmente via-estômatos após 12 horas da inoculação. Após a penetração, a hifa se expandiu originando uma vesícula de formato globoso ou irregular na cavidade subestomática, que se ramificou e originou hifas secundárias que colonizaram o mesofilo do hospedeiro após 24 horas da inoculação. Os sintomas típicos da doença apareceram no intervalo de 24 a 48 horas após a inoculação, na cultivar suscetível 'Moneymaker'. Após 36 horas da inoculação, foi observado

a degradação do conteúdo celular e o colapso de células do mesófilo, na presença de hifas intracelulares, e em células distantes das hifas do patógeno. Estes resultados demonstram que a estratégia de colonização do fungo é do tipo necrotrófica (BENTES & MATSUOKA, 2005).

2.2.5. Controle

A medida mais eficiente e mais econômica de controle da mancha-de-estenflilio é o uso de cultivares resistentes (JONES, 1991; KIMATI *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2005). Esta resistência é controlada por um único gene dominante, denominado *Sm* (HENDRIX & FRAZIER, 1949) sendo, por isso, relativamente fácil de ser incorporada (via retrocruzamentos) em uma cultivar de tomateiro (GIORDANO *et al.*, 2003). Pela sua eficácia e estabilidade, diversas cultivares, tanto produção destinada ao consumo *in natura* quanto para processamento industrial, apresentam o gene de resistência *Sm*. Dentre estas pode-se destacar ‘Santa Clara’, ‘IPA 5’, ‘Ângela’ e ‘Agrocita 33’ (KUROZAWA & PAVAN, 1997); ‘Ohio 4013’, ‘Yoshimatsu’ e ‘TSW-10’, ‘Havaii’ e ‘Monense’ (PAULA & OLIVEIRA, 2001).

Outras medidas de controle podem ser empregadas como aplicação de fungicidas, registrados no Ministério da Agricultura, de forma preventiva; rotação de cultura, evitando espécies hospedeiras dos patógenos; evitar plantios próximos a lavouras de tomate ou de outras plantas hospedeiras; eliminação de restos de cultura logo após a última colheita e manejo adequado das irrigações (LOPES *et al.*, 2005).

2.3. Considerações Gerais Sobre Crescimento e Esporulação de *Stemphylium* sp. *In Vitro*

Espécies do gênero *Stemphylium* apresentam grande variabilidade na patogenicidade, crescimento e capacidade de esporulação em cultura pura. Sabe-se que a composição do meio de cultura a temperatura e luminosidade determinam a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação dos fungos (DHINGRA & SINCLAIR 1995). Segundo Nozaki *et al.* (2004), as condições que favorecem o crescimento não favorecem necessariamente a esporulação e que a luz, por exemplo, pode exercer efeito direto sobre o fungo, induzindo ou inibindo a formação de estruturas reprodutivas. Segundo estes autores, alguns meios de cultura são mais favoráveis à esporulação que outros por apresentarem carboidratos complexos que são menos adequados para a produção de hifas vegetativas, porém mais adequados à produção de esporos.

2.3.1. Influência do meio de cultura no crescimento micelial e esporulação de fungos

Diversos meios de cultura que favorecem o crescimento micelial e estimulam a esporulação de espécies de *Stemphylium* têm sido relatados na literatura. Dentre estes destacam-se os meios: V8 ágar (200 mL de suco de vegetais V8; 20 g de ágar; 3 g CaCO₃; 800 mL de água destilada) (BENTES & MATSUOKA, 2005; DIENER, 1952) e o de batata-dextrose-ágar (BDA) (BENTES & MATSUOKA, 2005; LIMA, 1982; SANTOS, 1995). Segundo Bentes & Matsuoka (2005b), o meio de cultura V8 favorece a esporulação do patógeno.

Santos (1995), avaliou o efeito do meio de cultura (MP-5, Meio S, V-8 e BDA) na esporulação de *S. lycopersici* e constataram que o cultivo em meio V-8 e à temperatura de 25 ou 30 °C foram as melhores condições para a esporulação deste fungo. Outros autores propõem meios alternativos para a esporulação de *S. solani*, como, por exemplo: farinha de

milho-ágar (SANDROCK & VANETTEN, 1998); maltose-peptona-ágar (LIMA, 1982). Kumar (2007), obteve maior produção de conídios de *S. botryosum* no meio V8 com BDA, em comparação com os meios V8 e V8+BDA modificado.

As espécies de *Stemphylium* esporulam melhor em meio pobre em açúcar, como o meio V8-ágar. Este meio contém apenas 0,3% de açúcar, fornecido pelos oito vegetais de sua composição. Em alguns casos, extratos de planta hospedeira podem melhorar a esporulação, como, por exemplo, extrato de pó de café em meio V8 para esporulação de *Cercospora coffeicola* (SOARES, 2003). Leão *et al.* (2011), estudaram a influência de sete diferentes meios de cultura (BDA, BDA modificado, V8 modificado, aveia, cenoura, folha de melancia e folha de melancia+CaCO₃) no crescimento micelial e esporulação de *Ascochyta cucumis*. Segundo esses autores, o meio de folha de melancia+CaCO₃ à 27 °C foi a condição que mais favoreceu o crescimento e a esporulação deste fungo.

O comportamento de isolados de *Stemphylium solani in vitro* é variável. Outro fator importante para induzir ou aumentar a formação de esporos é a temperatura. A temperatura ótima para o crescimento micelial pode ser diferente daquela exigida durante a esporulação. A faixa de temperatura para a esporulação, geralmente, é mais estreita que a para o crescimento (DHINGRA & SINCLAIR, 1995).

2.3.2. Influência da temperatura no crescimento micelial e esporulação de fungos

A temperatura é um fator determinante para indução à esporulação de vários fungos. Patógenos de clima tropical e subtropical, em sua maioria, são capazes de se desenvolverem em ampla faixa de temperatura, embora estejam sujeitos à dessecação. Alguns fungos possuem pigmentação que podem atuar como uma proteção contra sol e altas temperatura, como *Alternaria* sp. e *Stemphylium* sp..

Temperaturas fora da faixa ótima podem inibir a esporulação, assim como as demais fases de desenvolvimento do fungo (AGRIOS, 2005). A temperatura utilizada para o crescimento de *Stemphylium* varia de 20 a 30 °C. Minussi *et al.* (1977), utilizaram para o cultivo do fungo meio V8 ágar à 28 °C, Mehta e Arias (2001), meio V8 ágar à 21 °C e Bentes e Matsuoka (2005) à 25 °C. Já Santos (1995), obteve elevada esporulação cultivando o patógeno em meio V8, com 10 ou 20 mL de meio, à temperatura de 25 ou 30 °C, sob luz N.U.V (20W) ou escuro pleno.

Espécies como *S. botryosum* e *S. trifolii* tem sua esporulação inibida por temperaturas acima de 28 °C (KIM *et al.*, 2004). De acordo com Bashi *et al.* (1973), a esporulação de *S. botryosum* f. sp. *lycopersici* pode ser observada entre 10 a 30 °C, com temperatura ótima de 25°C.

Spilari (2011), observou em seus estudos relacionados com a influência da temperatura no crescimento micelial e esporulação de *S. solani* que a melhor temperatura para o crescimento micelial é 25 °C e para esporulação 15 °C. Já Souza (2013), obteve melhor crescimento micelial e esporulação a temperatura de 25/15 °C alternado.

Tomioka e Sato (2011), cultivou isolados de *S. lycopersici* em meio BDA, a 5-38 °C no escuro, com crescimento micelial máximo a 25 °C. Santos (1999), recomenda o uso de cultura jovem de isolados altamente virulento e cultivo em placas contendo 12 mL de meio de tomate sob luz negra NUV ou escuro total e temperatura de 25 °C para indução da esporulação de vários isolados de *S. solani*.

2.3.3. Influência da luminosidade no crescimento micelial e esporulação de fungos

A qualidade e a intensidade da luz são fatores que também podem afetar a germinação de conídios, taxa de crescimento vegetativo, indução de formação de estruturas reprodutivas (MINUSSI *et al.*, 1997), pigmentação, forma e tamanho dos esporos de grande parte das espécies fúngicas (MATHUR & NEERGAARD, 1973). Segundo Cochrane (1958), a irradiação luminosa pode induzir, inibir ou ter efeito neutro sobre o crescimento e a esporulação de fungos.

Em relação ao fotoperíodo, *Stemphylium* é considerado um esporulador diurno, que exige um período de luz alternado com um período de escuro para o desenvolvimento de esporos. No escuro total ele produz apenas alguns esporos e sobre luz contínua são formados conidióforos estéreis (WARNER, 2005). Segundo Leach (1967), os fungos classificados como esporulantes diurnos apresentam duas fases distintas de fotoesporogênese, uma “fase indutiva” levando a formação de conidióforos e uma “fase terminal” resultando na formação de conídios. A fase indutiva é estimulada pela radiação próxima à ultravioleta (NUV) e temperaturas relativamente elevadas, enquanto que a fase terminal é fortemente inibida pela luz azul e NUV, sendo estimulada por baixas temperaturas.

As lâmpadas de luz negra NUV emitem radiação UV entre 330 e 380 nm, e têm sido consideradas ideais para induzir a esporulação em todos os fungos fotossensíveis. As lâmpadas de luz do dia e fria comum têm seus espectros dentro da faixa de luz visível (380-775 nm), a qual tem efeito relativamente pequeno sobre a produção de conídios. Entretanto, sob condições de fotoperíodo, pode causar a ocorrência de zoneamentos em alguns fungos em meio ágar (DEACON, 1996).

Diener (1952), cultivando *S. solani* em meio V8, com pH 6,2 a 8,0 e tratando as culturas com radiação ultravioleta, obteve esporulação abundante. Entretanto, em trabalhos posteriores, esse autor constatou que o modo de aplicação e o comprimento da onda da radiação ultravioleta podiam ter efeitos inibitórios ou mesmos letais, na esporulação do fungo (DIENER, 1955). Leach (1961), por outro lado, estudou a influência da luz na esporulação de *Helminthosporium oryzae*, e apontou a importância da radiação próxima à ultravioleta na esporulação, bem como a alternância de período escuro e de irradiação. Posteriormente, Leach (1962) estudou a esporulação de 34 espécies de fungos sob radiação próxima à ultravioleta por períodos variando de 3 a 10 dias e observou que em *Stemphylium botryosum* e *S. trifolii*, entre outros, a esporulação foi iniciada ou aumentada.

Baseando na metodologia descrita por Diener (1952), alterando apenas o tipo de lâmpada, Namekata e Tokeshi (1967), conseguiram farta esporulação em alguns isolados de *S. solani*. Propuseram, ainda, a classificação do fungo em três raças fisiológicas, sendo que uma delas esporulava abundantemente em qualquer meio, sem necessidade de radiação ultravioleta, mas as outras duas necessitavam de irradiação para esporular. Resultados semelhantes foram encontrados por Minussi *et al.* (1973).

O fotoperíodo também pode influenciar certas espécies fúngicas. Estudos realizados com *S. botryosum* isolado de tomate indicaram que a esporulação foi ótima no escuro contínuo, com maior rendimento de esporos ocorrendo quando um período de luz de 12 horas foi seguido de um período de escuro de 12 horas (BASHI & ROTEM, 1975). Resultados semelhantes foram encontrados por Mussi e Kurozawa (1996) para *S. solani*, com maior produção de conídios em cultivos em meio V8 ágar sob um período de 12 horas de luz alternado com 12 horas de escuro. Já Byung Soo-Kim (2004), obteve melhor esporulação de *S. solani* e *S. lycopersici* em placas com meio V8 à temperatura de 20 °C e menos de 12 horas de luz NUV, sendo que nenhuma das espécies esporulou muito sob escuro contínuo.

As recomendações gerais para a indução da esporulação com luz, segundo Dhingra e Sinclair (1995), são as seguintes: (1) uso de lâmpadas fluorescentes de luz negra emitindo radiação NUV em espectro contínuo de 320 a 420 nm; lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz-do-dia; (2) duas lâmpadas (40 W cada) horizontalmente separadas entre si por 20 cm e 40 cm acima das placas da cultura; (3) usar um ciclo alternado de 12h de luz e escuro; (4) seguir irradiando por dois a três dias após o crescimento; e (5) utilizar placas de plástico ou vidro que permitam a passagem da luz.

2.3.4. Influência de fatores estressantes sobre a esporulação de fungos

Outro método utilizado para induzir a esporulação são aplicações de fatores estressantes como, injúrias no micélio, exposição à irradiação UV, NUV e outros comprimentos de onda. Para espécies de *Alternaria* sabe-se que a transição da fase micelial para reprodutiva necessita de severa indução por fatores estressantes da colônia para que a esporulação ocorra (LEACH, 1967). Segundo esse mesmo autor o método de estresse mais utilizado é o da raspagem do micélio aéreo com subsequente exposição à luz branca ou ultravioleta próximo (NUV) (LEACH, 1962).

Wells *et al.* (1971), verificaram a esporulação de *S. solani* previamente cultivado em meio V8 ágar por sete dias em temperatura ambiente (20-25 °C) e fotoperíodo de 10 horas de claro/dia. Após este período foi realizada a raspagem do micélio e as placas foram dispostas a uma distância de 36 cm das lâmpadas fluorescentes de 40W, com fotoperíodo de 10 horas de claro/dia durante sete dias. Nestas condições, os autores observaram elevada produção de conídios. Já Pulz (2007), avaliou o efeito de diferentes estresses da colônia (raspagem de micélio aéreo, radiação de microondas, temperatura de 100 °C e radiação UV) na esporulação de *Alternaria* e obteve maior esporulação em meio V8-ágar, temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 12 horas de luz NUV/ 12 horas de escuro e raspagem do micélio aéreo.

Rodrigues *et al.* (2010), avaliaram o efeito da desidratação do micélio na esporulação de *Alternaria solani*. Esses autores observaram que colônias formadas em placas de Petri com tampa tiveram elevado crescimento micelial sem esporulação. Já nas placas abertas ocorreu a desidratação do micélio, desencadeando o estímulo inicial para a esporulação. Foi relatado que os conidióforos em contato com um filme de água podem reverter para hifas vegetativas e parar a produção de conídios (ARAGAKI *et al.*, 1973). Em *Neurospora crassa*, genes associados com a produção de conídios foram traduzidos apenas quando ocorreu a dessecação das colônias (CHANGGONG *et al.*, 1997).

No entanto, até o momento há poucos estudos comprovando que estresses da colônia como injúria do micélio, temperaturas elevadas, exposição à radiação UV, e a outros comprimentos de onda favoreça a produção de esporos de *Stemphylium* spp..

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos Isolados

Utilizaram-se quatro isolados de *Stemphylium*, provenientes de diferentes localidades do estado do Rio de Janeiro e mantidos na coleção do Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes (LabEPS) do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (Tabela 1). Os isolados foram preservados em tubos contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) e óleo mineral e reavivados por meio de repiques para placas de Petri contendo meio BDA seguido de incubação em câmara de crescimento a 25 °C, 12 horas de fotoperíodo, durante 10 dias para prover o inóculo inicial para os experimentos.

Tabela 1. Códigos, origem, hospedeiro de origem e data de coleta dos isolados utilizados nos estudos.

Isolado ¹	Origem	Hospedeiro	Data da Coleta
SENA 106	Seropédica-RJ	Tomate	Agosto/2010
SENA 108	Seropédica-RJ	Tomate	Fevereiro/2015
SENA 301	Paty do Alfares-RJ	Tomate	Mai/2010
SENA 304	Paty do Alfares-RJ	Tomate	Mai/2010

¹ SENA = *Stemphylium* Escola Nacional de Agronomia

3.2. Influência do Meio de Cultura no Crescimento Micelial e Esporulação de *Stemphylium* sp.

Os meios de cultura utilizados nesse ensaio foram: V8, suco de tomate, BDA, BDA+V8, farinha de milho (FM), meio de aveia (MA), Folha de tomate (FT) e meio de cenoura (MC).

Para o preparo do meio V8-ágar utilizaram-se 200 mL de suco de vegetais V8 “Campbell Soup Co.”, 20g ágar, 3g CaCO₃, em seguida, o volume foi completado para 1,0 L (DIENER, 1952; MEHTA & ARIAS, 2001). O meio suco de tomate foi preparado utilizando-se 300 g de tomates cortados em cubos cozidos em 500 mL de água destilada durante 10 minutos. O material foi peneirado, obtendo-se somente o suco concentrado. No suco foram adicionados 3g CaCO₃, 20g dextrose, 15g ágar, em seguida, o volume foi completado para 1,0 L (Adaptado de Dias Neto *et al.*, 2010). O meio BDA foi preparado utilizando-se 42 g do produto comercial potato dextrose agar da marca KASVI. Para o preparo do meio de cultura BDA+V8 foi utilizado 177 mL de suco de vegetais V8 “Campbell Soup Co.”, 12g BDA comercial, 3,54g CaCO₃ e 12g ágar, sendo completado o volume com água destilada para 650 mL (KUMAR, 2007). Para os meios de cultura aveia e farinha de milho foram utilizadas 50g dos produtos, submetidas individualmente a um processo de cozimento em 1,0 L de água destilada por um período de cinco minutos. Após o cozimento foram peneiradas e tiveram os volumes completados com água destilada para 1,0 L. Em seguida, foram adicionados 20g dextrose, 15g ágar, para cada meio de cultura (DIAS NETO *et al.*, 2010). Para o preparo do meio folha de tomate utilizaram-se 60g de folha de tomate picadas manualmente, adicionadas

em 1,0 L de água destilada e fervidas por 30 minutos. Recolheu-se o decocto, por filtração em peneira, em Becker, e em seguida adicionou-se 18g ágar e 2,55g CaCO₃ completando o volume para 1,0 L (Adaptado de Brunelli *et al.*, 2006). Para o preparo do meio de cenoura utilizou-se 20g de cenoura ralada em repouso por 60 minutos em 400 mL de água destilada. Em seguida, foi feita a filtração em peneira, em Becker e adicionou-se na solução obtida 20g ágar. O volume completado para 1,0 L (ALFENAS & MAFIA, 2007).

Todos os meios tiveram o seu pH ajustado para 5,0 usando ácido láctico ou hidróxido de sódio e foram autoclavados a 121 °C por vinte minutos.

Para realização desse ensaio foram utilizados quatro isolados de *Stemphylium* sp., SENA 106, SENA 108, SENA 301 e SENA 304. Discos de micélio, 5 mm de diâmetro, foram retirados da borda de colônias dos respectivos isolados cultivadas em meio BDA e repicados para o centro de cada placa de Petri contendo os meios acima mencionados. As placas foram acomodadas em câmaras do tipo BOD na temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro por 10 dias para avaliar o crescimento micelial. Após os 10 dias, regulou-se a temperatura da BOD para 15 °C e fotoperíodo de 12 horas por mais cinco dias para estímulo à esporulação. Para cada tratamento foram utilizadas cinco placas de Petri, sendo cada parcela composta por uma placa. Foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 8x4, com oito meios e quatro isolados.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada diariamente, através de medições do diâmetro (mm) da colônia, em eixos perpendiculares entre si. Os eixos foram estabelecidos na primeira avaliação através da marcação no fundo da placa. O valor do crescimento micelial foi calculado através da média das duas medidas. Para a avaliação da esporulação adicionou-se 5 mL de água destilada a cada placa de Petri seguido de leve raspagem com auxílio de pincel. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e transferida para tubos de ensaio devidamente identificados de acordo com o tratamento e número da placa, os quais foram agitados em vortex por 30 segundos para a homogeneização. Em seguida, retiraram-se de cada tubo alíquotas para a contagem do número de conídios em câmara de Neubauer sob microscópio óptico. Foram realizadas três amostras por placa. Com os dados de número de conídios por amostra calculou-se o número de conídios por mm² de colônia, considerando-se a quantidade de conídios produzidos e a área ocupada pela colônia em cada placa.

A média do crescimento micelial foi integralizada no tempo para calcular a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), conforme o descrito por Shanner & Finney (1977). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (SISVAR).

3.3. Influência da Temperatura no Crescimento Micelial e Esporulação de *Stemphylium* sp.

Esse ensaio foi conduzido após a seleção do melhor meio de cultura. Na escolha do meio foi considerado o crescimento micelial, esporulação, custo e praticidade no preparo. Foram utilizados os mesmos isolados do ensaio anterior (SENA 106, SENA 108, SENA 301 e SENA 304) com características distintas para esporulação e virulência. Estes foram repicados para o centro de placas de Petri contendo o meio selecionado no ensaio anterior e incubados sob diferentes condições de temperatura.

Compararam-se regimes de temperaturas: (i) 25 °C contínuos; (ii) 25 °C por 10 dias seguido de 10 °C por mais 5 dias; (iii) 25 °C por 10 dias seguido de 15 °C por mais 5 dias; (iv) 25 °C por 10 dias seguido de 20 °C por mais 5 dias; (v) 25 °C e 10 °C alternados (dia e noite); (vi) 25 °C e 15 °C alternados (dia e noite) e (vii) 25 °C e 20 °C alternados (dia e noite).

Utilizou-se o fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram feitas ao final do 15º dia de cultivo.

Foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 7x4, sete regimes de temperaturas e quatro isolados. Para cada tratamento foram utilizadas cinco placas de Petri, sendo cada parcela composta por uma placa.

A avaliação do crescimento micelial e da produção de conídios foi feita conforme item 3.2..

A média do crescimento micelial foi integralizada no tempo para calcular a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), conforme o descrito por Shanner & Finney (1977). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$), utilizando-se o software SISVAR.

3.4. Influência do Fotoperíodo no Crescimento Micelial e Esporulação de *Stemphylium* sp.

O ensaio foi conduzido após a seleção do melhor meio de cultura e temperatura para crescimento e esporulação do patógeno. Repicaram-se os isolados para o centro de placas de Petri contendo meio de cultura V8 e em seguida incubaram-se as placas em câmaras de crescimento reguladas para temperatura de 25 °C durante o dia e 10 °C durante a noite, selecionada como o melhor regime de temperatura para a esporulação do patógeno, e cinco regimes de fotoperíodo. Os regimes comparados foram os seguintes: (i) 24 horas no escuro; (ii) 4 horas no claro e 20 horas no escuro; (iii) 6 horas no claro e 18 horas no escuro; (iv) 8 horas no claro e 16 horas no escuro e (v) 12 horas no claro e 12 horas no escuro. A condição de claro foi fornecida com o uso de quatro lâmpadas fluorescentes de 20 watts dispostas no interior da câmara de crescimento. Para a condição contínua no escuro as placas foram envoltas com papel alumínio.

Foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 5x4, com cinco condições de fotoperíodo e quatro isolados. Para cada tratamento foram utilizadas cinco placas de Petri, sendo cada parcela composta por uma placa.

A avaliação do crescimento micelial e da esporulação foram feitos conforme descrito no item 3.2.

A média do crescimento micelial foi integralizada no tempo para calcular a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), conforme o descrito por Shanner & Finney (1977). Os dados foram submetidos à análise de variância e testou-se a regressão linear e a quadrática para efeito do número de horas de escuro e para comparação entre isolados utilizou-se o teste de Tukey ($p<0,05$) (SISVAR). Os dados de crescimento e esporulação em função das horas de escuro bem como os ajustes dos dados pelas equações foram plotadas e apresentados em gráficos.

3.5. Influência da Fonte de Luz na Esporulação de *Stemphylium* sp.

O ensaio foi conduzido após a seleção do melhor meio de cultura, temperatura e fotoperíodo observados para o crescimento e esporulação dos isolados. Utilizaram-se os mesmos isolados que foram repicados para o centro de placas de Petri contendo meio de cultura V8. As placas foram acomodadas em câmaras de crescimento reguladas para a temperatura de 25 °C durante o dia e 10 °C durante a noite e fotoperíodo de 6 horas de luz e 18 horas de escuro selecionado nos ensaios anteriores, e duas fontes de luz. As fontes de luz testadas foram: (i) lâmpadas fluorescentes brancas frias “luz-do-dia” de 20 watts e (ii)

lâmpadas fluorescentes de luz negra NUV de 20 watts. Foram utilizadas quatro lâmpadas de cada tipo, sendo que cada tipo foi utilizada em câmaras de crescimento distintas.

Para cada tratamento foram utilizadas cinco placas de Petri, sendo cada parcela composta por uma placa. Foi utilizado o delineamento ao acaso, em esquema fatorial 2x4, com duas condições de luminosidade e quatro isolados.

Após 15 dias de incubação foi realizada a avaliação da esporulação conforme descrito no item 3.2.

A média do crescimento micelial foi integralizada no tempo para calcular a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), conforme o descrito por Shanner & Finney (1977). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (SISVAR).

3.6. Influência de Diferentes Estresses da Colônia na Esporulação de *Stemphylium* sp.

Após a determinação do melhor meio de cultura, temperatura, fotoperíodo e luminosidade para o crescimento e esporulação foram avaliados três fatores estressantes da colônia mais a testemunha sobre a esporulação: (i) raspagem do micélio aéreo; (ii) radiação UV e (iii) raspagem do micélio aéreo mais radiação UV (PULZ, 2007) e (vi) testemunha.

Os isolados SENA 106, SENA 108 e SENA 301 foram repicados para as placas de Petri contendo meio V8 e incubados nas condições ideais de temperatura, fotoperíodo e luminosidade, definidos nos ensaios anteriores. Após 10 dias de crescimento as colônias foram submetidas aos respectivos fatores de estresse.

A raspagem de micélio aéreo foi realizada com o auxílio de um pincel fino e água destilada esterilizada. Para a radiação UV foi utilizada lâmpada UV com potência 15W acoplada no interior da câmara de fluxo laminar. As placas foram submetidas à radiação UV por 5 minutos. Em seguida, as colônias foram colocadas por mais 5 dias nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo.

Para cada tratamento foram utilizadas cinco placas de Petri, sendo cada parcela composta por uma placa. Foi utilizado o delineamento ao acaso, em esquema fatorial 4x3, com quatro métodos de estresse e três isolados.

A avaliação da esporulação foi realizada de maneira idêntica à descrita nos itens anteriores.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (SISVAR).

3.7. Avaliação da Virulência dos Isolados Obtidos nas Condições de Cultivo Selecionados

A virulência dos isolados foi avaliada por meio de inoculações em mudas de tomate. Sementes da cultivar 'Perinha Água Branca' (suscetível) foi semeada em bandejas de polipropileno de 200 células contendo substrato comercial Carolina. Ao atingir o estágio de um par de folhas verdadeiras, as mudas foram transplantadas para copos plásticos de 150 mL. Após 24 horas, as plantas foram inoculadas com suspensão conidial de *Stemphylium* sp. na concentração de 10^4 conídios por mL, por aspersão até o ponto de escorrimento. Em seguida, as plantas foram acondicionadas em câmara de crescimento regulada para temperatura alternada de 25 e 15 °C (dia/noite), 12 horas de fotoperíodo e 100% de umidade relativa, por

um período de 48 horas. Após esse período, ajustou-se a umidade para 50%. Oito dias após o transplante adicionou-se 5 mL de solução nutritiva por planta.

A severidade da mancha-de-estenfilio foi avaliada nos três folíolos terminais de cada folha, duas folhas por planta, utilizando-se a escala diagramática de Boff *et al.* (1991). A avaliação iniciou-se no terceiro dia após a inoculação (DAI) e prosseguiu em dias alternados até 11° DAI, totalizando cinco avaliações. Os dados da severidade foram utilizados para o cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, duas plantas por isolado em cada bloco, sendo três blocos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência do Meio de Cultura no Crescimento Micelial e Esporulação de *Stemphylium* sp.

O crescimento micelial e esporulação dos isolados ocorreram em todos os meios utilizados. Houve efeito significativo de meio de cultura e da interação isolado x meio sobre o desenvolvimento das colônias, expresso pelos valores de AACCM, e de isolado, meio de cultura e da interação entre estes sobre a esporulação (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância para efeito de isolado, meio de cultura e interação entre estes sobre o crescimento micelial, expresso pela Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e esporulação (conídio mm⁻²), *in vitro*, de *Stemphylium* sp.. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio ¹	
		AACCM	Esporulação
Isolados	3	1349,69	3,69**
Meios	7	141293,84**	19,33**
Isolados x Meios	21	8548,15**	6,20**
Erro	128	1050,33	0,82
Total	159		
CV (%)		7,71	45,44

¹ dados transformados: Raiz quadrada de $Y + 1,0 - \text{SQRT}(Y + 1,0)$

** Significativo pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

O melhor meio de cultura para o crescimento micelial dos quatro isolados foi o preparado com sucos de vegetal fresco – “suco de tomate”, seguido dos meios “BDA+V8”, “V8” e “meio de aveia”, que não diferiram entre si. Em seguida, em ordem decrescente de taxa de crescimento do micélio ficaram os meios “meio de farinha de milho”, “meio de cenoura”, “BDA” e “folha de tomate”, todos diferentes entre si estatisticamente (Tabela 3).

Resultados diferentes foram observados na produção de esporos (Tabela 3). Os isolados apresentarem melhor esporulação, quando cultivados em V8, ao passo que, em Meio suco de tomate, a produção de esporos foi significativamente inferior, porém, ficou em segundo lugar seguido do meio com folha de tomate (FT). Tanto o menor crescimento como a menor esporulação ocorreram em cultivo no meio BDA (Tabela 3).

Diferenças foram observadas entre os quatro isolados quanto ao crescimento nos diferentes meios. No entanto, considerando a média geral estes foram estatisticamente iguais entre si. Diferenças significativas, porém foram observadas quanto à produção de conídios pelos diferentes isolados, tanto em cada meio individualmente quanto na média geral. O isolado SENA 106 foi o que apresentou maior esporulação média, porém igual estatisticamente ao isolado SENA 301 e SENA 304. A esporulação do isolado SENA 108, caracterizada pela menor capacidade de esporular, foi favorecida pelo meio feito com suco fresco de tomate “suco de tomate”.

Este meio estimulou também a esporulação dos isolados SENA 106, e SENA 301, mas não favoreceu a do isolado SENA 304. O meio V8 foi o que melhor estimulou a esporulação dos isolados SENA 106, SENA 301 e SENA304. De forma geral os meios “meio de cenoura”,

“meio de aveia” e “BDA” não favoreceram a esporulação de nenhum dos isolados testados. (Tabela 3).

Tabela 3. Crescimento micelial, expresso pela Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e produção de conídios de quatro isolados de *Stemphylium* sp., expresso por número de conídios por mm⁻² de colônia em diferentes meios de cultura. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Meios ¹	AACCM				Média
	SENA 106	SENA 108	SENA 301	SENA 304	
ST	527,16 Aa	506,67 Aa	548,90 Aa	528,56 Aa	527,82 a
BDA + V8	444,41 Bb	460,45 ABabc	499,55 Aab	513,74 Aa	479,54 b
V8	431,69 Bb	498,34 Aab	483,21 ABb	493,01 Aab	476,56 b
MA	446,34 Ab	439,38 Abcd	487,13 Aab	441,53 Abc	453,59 bc
FM	451,58 Ab	433,92 Acd	445,75 Abc	435,95 Abc	441,80 c
MC	359,98 Ac	377,18 Ad	388,09 Ac	364,02 Ac	372,07 d
BDA	423,85 Ab	285,54 Be	228,73 Ce	379,52 Acd	329,41 e
FT	291,63 Ad	293,02 Ae	315,16 Ad	229,17 Bd	282,25 f
Média	421,95 A	411,81 A	424,56 A	423,19 A	

	Conídios por mm ⁻² de colônia				
	V8	ST	FT	BDA + V8	Média
V8	50,3 Aa	0,61 Cb	10,46 Bab	36,43 Aa	24,45 a
ST	7,43 Ab	9,69 Aa	9,36 Aabc	0,2 Bb	6,67 b
FT	0,22 Bb	1,15 Bb	10,3 Aa	1,02 Bb	3,17 bc
BDA + V8	0,19 Bb	0,14 Bb	9,29 Aabc	2,06 ABb	2,92 bc
FM	1,12 Ab	3,44 Aab	1,06 Abcd	5,25 Ab	2,72 bc
MC	4,31 Ab	0,43 Ab	0,54 Acd	1,59 Ab	1,72 c
MA	1,55 Ab	0,33 Ab	0,88 Acd	0,09 Ab	0,71 c
BDA	0,59 Ab	1,08 Ab	0 Ad	0,67 Ab	0,58 c
Média	8,21 A	2,11 B	5,24 AB	5,91 A	

¹V8= suco de vegetais; BDA= Batata-dextrose-ágar; V8 caseiro= meio de tomate; MA= meio de aveia; MC= meio de cenoura; FM= meio de farinha de milho; FT= meio de folha de tomate; ST= meio de suco de tomate.

* Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A experiência bem sucedida com a utilização de meio à base de suco de tomate está de acordo com relatos feitos por Smith e Onions (1983 apud ÁVILA *et al.*, 2000). Segundo estes autores, certas culturas fúngicas crescem melhor em meios frescos preparados em laboratório. Esta experiência foi observada quando se utilizou meio à base de tomate exclusivamente, pois o meio de confecção caseira superou o meio da marca industrial testado, em termos de crescimento micelial.

O meio V8 apresenta maior riqueza nutricional e maior quantidade de carboidratos complexos. Estas características são citadas por diversos autores que as consideram como favoráveis ao crescimento e esporulação de *Stemphylium* sp. (BEHARE *et al.*, 1991; BENTES & MATSUOKA, 2005; DIENER, 1952; MEHTA & ARIAS, 2001; MILLER, 1955; MINUSSI *et al.*, 1977; SANTOS, 1995; WELLS *et al.*, 1971).

Brunelli *et al.* (2006), trabalhando com o efeito de diferentes meios de cultura na esporulação de *Cercospora zea-maydi*, agente causal da cercosporiose do milho, constataram que o meio V8 induziu grande quantidade de conidióforos. Também verificaram neste estudo que o meio BDA estimulou a formação de conidióforos, porém em quantidade bem inferior ao V8. Essa mesma observação foi feita nesse trabalho. O fato do meio BDA comercial não induzir significativamente a formação de conídios e o crescimento micelial pode estar relacionado à presença de alguma substância inibitória na composição do produto. Soares (2003), obteve resultados satisfatórios utilizando o meio V8 na produção de conídios de *Cercospora coffeicola*.

A inclusão de material vegetal no meio de cultura é uma técnica usada para estimular a produção de esporos para alguns fungos (NOZAKI *et al.*, 2004). Satyanarayana e Sadasiva (1986 apud SILVA & TEIXEIRA, 2012), também relatam que o uso de meios preparados a partir de partes de plantas suscetíveis podem aumentar a esporulação. No presente trabalho, porém, o meio preparado a partir de folhas de tomate (FT) não estimulou o crescimento micelial nem a produção de esporos satisfatória de *Stemphylium* sp.. Essa confirmação também foi feita por Chagas *et al.* (2009). Estes autores observaram em testes com meios à base de mamona que estes não foram eficientes na indução à produção de conídios de *Botryotinia ricini*, quando comparados com meios V8-20% e BDA. Entretanto, Leão *et al.* (2012) relataram que os meios de folha de melancia e folha de melancia+CaCO₃ proporcionaram maiores números de conídios de *Ascochyta cucumis*.

Alguns meios de cultura são mais favoráveis à esporulação de fungos que outros, por apresentarem carboidratos complexos que são menos adequados para a produção de hifas vegetativas, porém mais adequados à produção de esporos (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Andrade *et al.* (2007), trabalhando com *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose no mamoeiro, verificaram que diferentes meios de cultura, além de ocasionar diferenças quando ao crescimento e desenvolvimento das colônias, podem influenciar na futura severidade do patógeno na cultura inoculada.

Os meios suco de tomate e V8 são aqueles melhores para o crescimento e esporulação respectivamente. Comparando ambos os meios, aquele preparado com o suco industrializado, V8, é mais indicado para o cultivo do fungo, pois não sofre variações na composição do meio, oriundas das condições fisiológicas e nutricionais dos frutos de tomate. Por este motivo, o meio V8 foi selecionado para os próximos ensaios devido as suas características mencionadas anteriormente e por proporcionar maior esporulação.

4.3. Influência da Temperatura no Crescimento Micelial e Esporulação de *Stemphylium* sp.

Os resultados da análise de variância (Tabela 4) demonstram efeito significativo de temperatura, isolados e interação entre estes sobre o crescimento micelial e esporulação.

Os isolados comportaram-se de maneira distinta quanto à taxa de crescimento micelial (Tabela 5) em função do regime de temperatura utilizado. Mas de forma geral, maior crescimento micelial médio foi observado no isolado SENA 304 seguido de SENA 301 e maior crescimento favorecido pela incubação sob regime de 25 °C contínuos seguido daqueles com 25 °C nos primeiros 10 dias e redução posterior para 10, 15 ou 20 °C (Tabela 5). O isolado SENA 106, caracterizado como o de menor crescimento micelial médio nos sete regimes de temperatura testados, apresentou a mesma taxa de crescimento na maioria das temperaturas testadas e menor crescimento sob regime de 25/10 °C dia/noite. Os demais isolados, de forma geral, cresceram mais sob condições com 25 °C contínuos por 15 ou 10 dias consecutivos. Ou seja, de modo geral, a temperatura 25 °C contínuos foi a que apresentou

melhores resultados, porém sem diferir estatisticamente das temperaturas 25+10 °C e 25+15 °C.

Tabela 4. Análise de variância para efeito de isolado, temperatura e da interação entre isolado e temperatura sobre o crescimento micelial, expresso pelos valores de Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e sobre a esporulação (conídio mm⁻²), *in vitro*, de *Stemphylium* sp.. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		AACCM	Esporulação ¹
Isolado	3	19125,92**	427,50**
Temperatura	6	34797,69**	125,08**
Isolado x Temperatura	18	2181,18**	59,36**
Erro	112	406,75	6,26
Total	139		
CV (%)		6,06	54,96

¹ dados transformados: Raiz quadrada de Y + 1,0 – SQRT (Y+1,0).

** Significativo pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com Kim *et al.* (2004), as colônias de *S. solani* e *S. lycopersici* crescem bem em temperaturas que variam de 15 a 35 °C, sendo 25 °C a que proporciona melhor crescimento. Resultado semelhante ao observado neste ensaio. Para *S. botryosum* o crescimento foi constatado entre 15 a 35 °C, e faixa favorável de 20-30 °C (HOSEN *et al.*, 2009).

Com relação à esporulação, verificou-se maior produção de conídios quando as culturas foram submetidas ao regime de temperatura 25/10 °C, seguido de 25/15 °C e 25/20 °C alternadas dia/noite e menor produção sob condições de temperaturas contínuas de 25 °C ou de 25 °C por 10 dias seguido de redução para 10, 15 ou 20 °C por mais cinco dias (Tabela 5). O isolado SENA 106 apresentou também neste ensaio esporulação significativamente maior que os demais isolados que foi favorecida pelos regimes de alternância de temperatura dia/noite de 25/10 °C e em seguida por 25/15 °C e 25/20 °C que não diferiram entre si (Tabela 5). O isolado SENA 108, apesar das diferenças significativas, mostrou ser favorecido pelo frio para esporular, ou seja, não esporulou sob condições de 25 °C contínuos e produziu mais conídios nos dois regimes em que foram fornecidos períodos com 10 °C, seja em alternância dia/noite ou nos cinco dias finais. O isolado SENA 301, também com baixa taxa de esporulação, não respondeu significativamente à variação dos regimes de temperatura, mas de modo geral esporulou mais sob condições de 25/10 °C dia/noite. O isolado SENA 304, respondeu significativamente à variação de temperatura com maior produção de conídios sob condições de 25/20 °C e 25/15 °C (Tabela 5). Esta diferença entre os isolados pode estar relacionada à diferença nas características edafoclimáticas das regiões onde os isolados foram coletados. Os isolados SENA 106 e SENA 108 foram coletados na região de Seropédica – RJ, no período de inverno e verão respectivamente, os isolados SENA 301 e SENA 304 na região de Paty de Alferes – RJ no período de outono. A resposta dos isolados a temperaturas mais frias está de acordo com as características edafoclimáticas de outono/inverno das regiões de origem. Esse período é caracterizado por temperaturas mais amenas, com temperaturas mínimas que variam entre 12 °C a 18 °C, chegando a valores inferiores a 10 °C na região serrana (CPTEC, 2015). Apenas o isolado SENA 108 não apresentou resposta de acordo com o período e localidade da coleta.

Tabela 5. Crescimento micelial, expresso pela Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e produção de conídios, expresso por número de conídios por mm² de colônia de *Stemphylium* sp. em diferentes temperaturas. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Temperatura ¹	AACCM				Média
	SENA 106	SENA 108	SENA 301	SENA 304	
25 °C	340,73 Ba	344,13 Bab	350,84 Bab	430,59 Aa	366,57 a
25/10 °C	235,29 Bb	231,73 Bd	243,09 ABc	272,70 Ac	245,70 d
25/15 °C	308,38 BCa	282,45 Cc	318,89 Bb	352,39 Ab	315,53 c
25/20 °C	345,79 Ba	315,18 Bbc	326,35 Bb	388,05 Ab	343,84 b
25+10 °C	334,17 Ca	346,66 BCab	384,24 Aa	369,52 ABb	358,65 ab
25+15 °C	315,81 Ba	361,22 Aa	374,55 Aa	363,09 Ab	353,67 ab
25+20 °C	307,98 Ca	329,80 BCab	387,28 Aa	361,12 ABb	346,54 b
Média	312,59 C	315,88 C	340,75 B	362,59 A	

	Número de conídios por mm ² de colônia				
	SENA 106	SENA 108	SENA 301	SENA 304	Média
25 °C	57,56 Ac	0 Ba	11,56 ABa	7,58 Bab	19,18 c
25/10 °C	516,23 Aa	35,75 Ba	29,82 Ba	8,41 Bab	147,55 a
25/15 °C	262,00 Ab	1,58 Ba	2,68 Ba	32,83 Bab	74,77 b
25/20 °C	171,64 Ab	3,68 Ca	14,39 BCa	52,54 Ba	60,56 b
25+10 °C	36,58 Ac	15,01 Aa	3,27 Aa	4,08 Ab	14,73 c
25+15 °C	8,73 Ac	3,23 Aa	3,24 Aa	3,61 Ab	4,70 c
25+20 °C	16,7 Ac	2,81 Aa	6,29 Aa	1,25 Ab	6,76 c
Média	152,78 A	8,86 B	10,18 B	15,76 B	

¹ 25°C=contínuos; 25+10°C=10 dias a 25°C e 5 dias 10°C; 25+15°C= 10 dias a 25°C e 5 dias a 15°C; 25+20°C = 10 dias a 25°C e 5 dias a 20°C; 25/10°C= alternada dia/noite; 25/15°C= alternada dia/noite e 25/20°C= alternada dia/noite.

* Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Paulus e Pound (1955) relataram que a esporulação de *S. solani* pode ocorrer em faixa ampla de temperatura, de 14 a 26 °C. Em termos gerais, as temperaturas fora da faixa ótima podem inibir a esporulação, assim como as demais fases de desenvolvimento do fungo (AGRIOS, 2005). Espécies de *Stemphylium* sp. são classificadas como esporalantes diurnas pois precisam de temperaturas mais altas para a formação dos conidióforos e temperaturas mais baixas para a formação dos conídios (LEACH, 1967). Os resultados do presente trabalho confirmam a necessidade de alternância de temperatura para estimular a produção de conídios. Esta característica sugere que desenvolvimento do patógeno e conseqüentemente da doença são favorecidos pela alternância de temperatura dia/noite.

Pelos resultados observados pode-se afirmar que de modo geral o crescimento micelial de *Stemphylium* é favorecido por temperaturas de 25 °C e que a condição ideal para esporulação pode variar conforme o isolado sendo porém, de forma geral, estimulada pela alternância de temperatura 25/10 °C (dia/noite).

4.4. Influência do Fotoperíodo no Crescimento Micelial e Esporulação de *Stemphylium* sp.

Houve efeito significativo de isolado, regimes de luz e da interação entre estes sobre crescimento micelial e efeito simples de isolado e regime de luz sobre a esporulação de *Stemphylium* sp. (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de variância para efeito de isolado, regime de luz e interação entre estes sobre o crescimento micelial, expresso pela Area Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e esporulação (conídio mm⁻²), *in vitro*, de *Stemphylium* sp.. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		AACCM	Esporulação ¹
Isolados (I)	3	23296,22**	11,43**
Regimes de luz (RL)	4	284849,77**	1,87**
I X RL	12	55092,65**	1,00
Erro	80	78514,66	0,72
Total	99		
CV (%)		8,26	2,65

¹ dados transformados: $\sqrt{(x + 1000)}$

** Significativo pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Na tabela 7, estão apresentados dados, como o quadrado médio, o *p*-valor e coeficiente de determinação (R²) das regressões testadas. Para regressões significativas, adicionou-se a linha de tendência nos gráficos, como a regressão quadrática para a AACCM e esporulação. A variável AACCM diminuiu com o aumento das horas de escuro, sendo os menores valores observados em torno de 22 horas de escuro e os maiores valores foi observado com a utilização de 12 horas de escuro (Figura 1).

Os isolados SENA 106, SENA 108 e SENA 301 obtiveram o melhor crescimento micelial proporcionado pelo fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. Apenas o isolado SENA 301 o melhor crescimento foi obtido no fotoperíodo de 8h luz/16h escuro. De um modo geral, o fotoperíodo de 12h luz/12h escuro foi que apresentou melhores resultados. O isolado SENA 304 apresentou maior crescimento micelial, diferindo estatisticamente dos demais.

Em relação à produção de conídios, de acordo com os resultados obtidos (Figura 1), tanto nos dados individuais quanto nos dados médios, observou-se maior produção de conídios com períodos de 18 horas de escuro.

O isolado SENA 106 apresentou maior capacidade de produção de conídios em todas as condições de fotoperíodo, diferindo-se estatisticamente dos outros isolados.

Sabe-se que a luminosidade pode exercer efeito indutor ou inibidor sobre a formação de estruturas reprodutivas. Trione e Leach (1969) afirmam que a quantidade e a qualidade da luz necessária para induzir a formação de estruturas reprodutivas variam de acordo com a espécie fúngicas. Segundo Nozaki *et al.* (2004), nem sempre as condições que favorecem o crescimento do fungo são as mesmas para esporulação, conforme observado neste trabalho. A necessidade de luz para o crescimento e esporulação de fungos é muito variável, até mesmo entre isolados da mesma espécie (MASANGKAY, 2000 apud CARNAÚBA *et al.*, 2007).

Tabela 7. Análise de Regressão referente à esporulação e AACCM de diferentes isolados de *Stemphylium* sp., em diferentes regimes de luz.

Fonte de variação	GL	ESPORULAÇÃO									
		SENA 106		SENA 108		SENA 301		SENA 304		Média	
		QM	R ²	QM	R ²	QM	R ²	QM	R ²	QM	R ²
Regressão quadrática	1	11,44 (p = 0,000)	0,63	0,31 (p = 0,510)	0,43	0,07 (p = 0,757)	0,57	0,0002 (p = 0,985)	0,25	4,46 (p = 0,015)	0,61
Desvio	2	3,45 (p = 0,011)		0,20 (p = 0,752)		0,03 (p = 0,964)		0,0004 (p = 0,999)		1,47 (p = 0,137)	
Erro	80	0,72		0,72		0,72		0,72		0,72	
AACCM											
Regressão quadrática	1	24718,88 (p = 0,000)	0,98	18217,53 (p = 0,000)	0,95	11200,92 (p = 0,001)	0,49	7920,24 (p = 0,006)	0,99	59298,31 (p = 0,000)	0,94
Desvio	2	786,19 (p = 0,452)		2561,38 (p = 0,000)		28045,64 (p = 0,000)		219,71 (p = 0,800)		8854,69 (p = 0,000)	
Erro	80	981,43		981,43		981,43		981,43		981,43	

AACCM: Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial. QM: Quadrado Médio. R²: coeficiente de determinação.

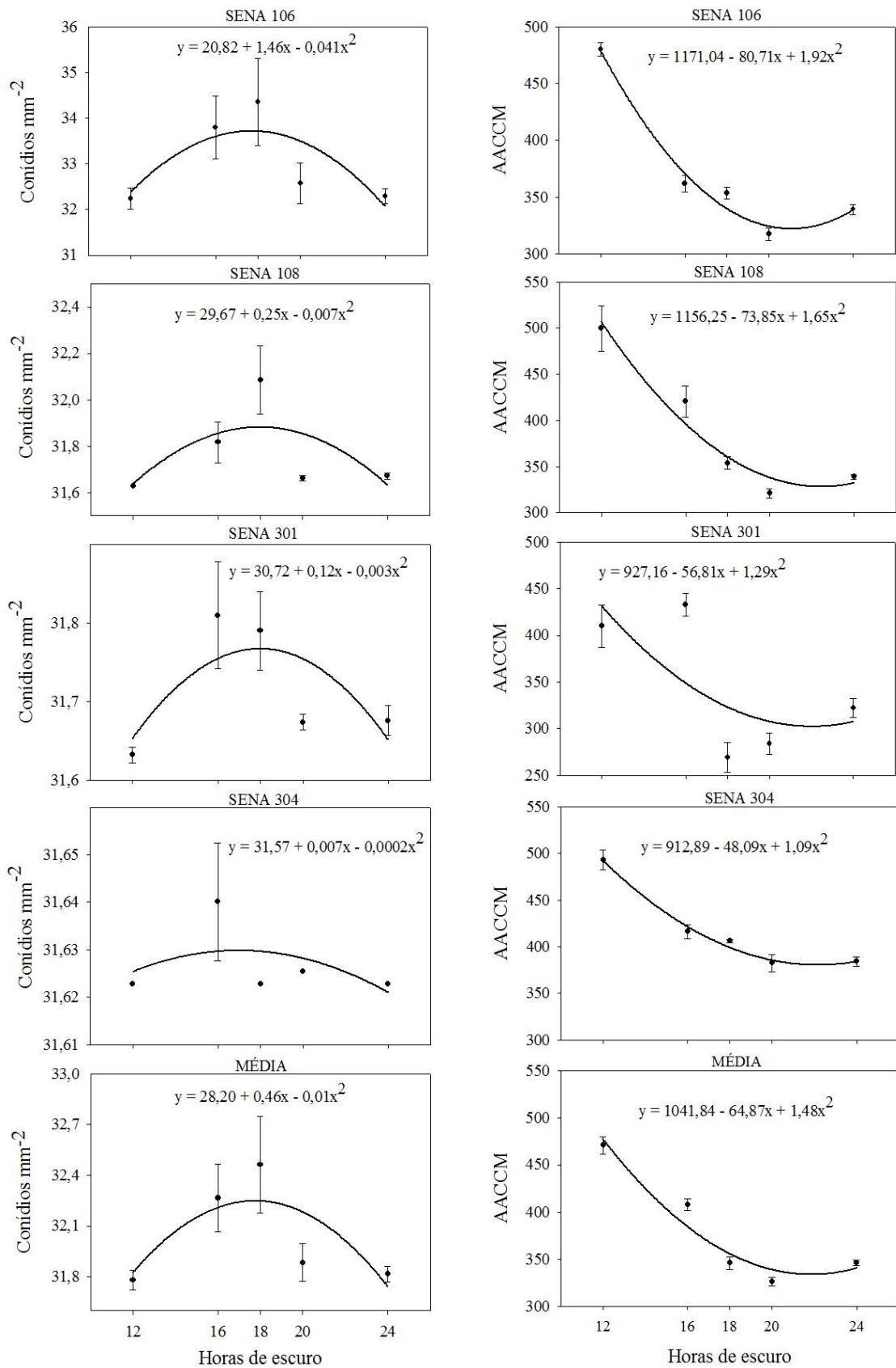


Figura 1. Esporulação (conídios mm⁻²) e Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), dos isolados SENA 106, SENA 108, SENA 301 e SENA 304, em função dos períodos de escuro. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Boss e Day (2001), descrevem *Stemphylium* como um esporulador diurno, o qual requer a alternância de períodos de luz e escuro para o desenvolvimento do esporo. A produção de conidióforos (primeira fase) requer luz, enquanto, a produção de conídios (segunda fase) necessita de período de escuro. Na condição de escuro contínuo são produzidos poucos conídios e em regime de luz contínua os conidióforos produzidos são estéreis. Confirmando estas informações, Minussi *et al.* (1977) relatam que a luminosidade contínua inibi a esporulação de *S. solani*, pois os conidióforos formados não produzem conídios. Alguns estudos apontam que a condição de escuro total pode promover a esporulação de *S. botryosum* f. sp. *lycopersici* obtidos de plantas de tomate (BASHI & ROTEM, 1975).

Em estudos de Lukens e Horsfall (1969), culturas que foram mantidas no escuro começaram a esporular após terem sido expostas a luz por pouco tempo. No entanto, a produção de esporos só ocorreu após 3 horas de incubação no escuro e continuaram a produzir esporos por um período de até 16 horas. Um período de escuro mais prolongado é mais importante no processo de esporulação que um longo período de luz.

Os resultados obtidos nesse estudo são sustentados pelos estudos de Lukens e Horsfall (1969), que sugerem que a colônia precisa de um período muito pequeno de luz para induzir a formação de conidióforos. Nesse estudo também houve produção de conídios no escuro contínuo confirmando o relato feito por Rotem (1998) que conidióforos também podem ser produzidos no escuro, mas tornam-se mais típicos e pigmentados quando expostos à luz. Estas informações podem ser claramente observadas quando se compara a produção de esporos no tratamento com 0h luz/24h escuro com o tratamento de 4h luz/20h escuro, onde a presença de um curto período de luz aumentou a produção de esporos. Na verdade, não há um consenso sobre o efeito da luz na formação dos conidióforos. Mas a importância do período de escuro para a conclusão do processo de esporulação tem sido bastante descrita na literatura.

Com base no exposto, a melhor condição de incubação visando a produção de conídios de *Stemphylium* sp. deu-se pela associação do regime de luz de 6 horas claro com 18 horas escuro.

4.5. Influência da Fonte de Luz no Crescimento Micelial e Esporulação de *Stemphylium* sp.

Observou-se efeito significativo de isolado e fonte de luz sobre o crescimento micelial e efeito de isolado e interação isolado x fonte de luz sobre a produção de conídios (Tabela 8).

Os isolados estudados apresentaram comportamentos semelhantes em relação às diferentes fontes de luz testada para o crescimento (Tabela 9). O melhor crescimento foi proporcionado pelo uso de lâmpadas fluorescentes brancas frias “luz do dia” diferindo estatisticamente da luz negra.

Comprimentos de onda maiores, acima de 600 nm, parecem ser mais efetivos na estimulação do crescimento micelial, conforme Strandberg (1987), que utilizou luz branca incandescente em estudo de crescimento e esporulação de *Alternaria dauci*. O crescimento de *Alternaria radicina*, investigado por Teixeira *et al.* (2001), apresentou melhor crescimento em luz NUV, quando comparado com luz branca, apesar de não diferirem estatisticamente. No entanto, são poucos os estudos que relatam o real intervalo espectral das luzes utilizadas.

Com relação à produção de conídios, verificou-se que quando submetido à “luz do dia”, o isolado SENA 106 obteve maiores concentrações de conídios, diferentemente dos isolados SENA 108, SENA 301 e SENA 304 que não responderam à fonte de luz. De modo geral, o tratamento “luz do dia” foi superior que “luz negra”, porém não diferiram estatisticamente um do outro.

O isolado SENA 106 apresentou maior capacidade de produção de conídios nos dois tratamentos, diferindo-se estatisticamente dos outros isolados.

Tabela 8. Análise para a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e esporulação (conídio mm⁻²), *in vitro*, de *Stemphylium* sp., utilizando diferentes fontes de luz. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		AACCM	Esporulação ¹
Isolado (I)	3	19520,38**	169,95**
Fonte de luz (FL)	1	14046,63**	17,08
I X FL	3	1627,68	35,39**
Erro	40	1143,25	12,2
Total	47		
CV (%)		8,94	102,91

¹ dados transformados: Raiz quadrada de Y + 1,0 - SQRT (Y + 1,0)

** Significativo pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 9. Crescimento micelial, expresso pela Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM), e produção de conídios, *in vitro*, de quatro isolados de *Stemphylium* em duas fontes de luz. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Fontes de luz ¹	AACCM				Média
	SENA 106	SENA 108	SENA 301	SENA 304	
Luz do dia	334,03 Ca	390,76 Ba	395,81 Ba	460,01 Aa	395,15 a
Luz negra	331,86 Ba	353,15 ABa	356,73 ABa	402,02 Ab	360,94 b
Média	332,95 C	371,96 B	376,27 B	431,02 A	
	Conídios por mm ² de colônia				
Luz do dia	215,58 Aa	0,27 Ba	1,83 Ba	0,1 Ba	54,45 a
Luz negra	43,35 Ab	1,88 Aa	7,72 Aa	0,35 Aa	13,32 a
Média	129,47 A	1,07 B	4,77 B	0,23 B	

¹Luz do dia=lâmpadas fluorescentes brancas frias de 20 watts; Luz negra=lâmpadas fluorescentes de luz negra de 20 watts.

* Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Entre todos os ativadores de esporulação, a radiação é um dos que tem efeito mais acentuado. Muitos protocolos desenvolvidos para estimular a esporulação de espécies de *Stemphylium* empregam luz branca ou NUV para a formação do conidióforo, com subsequente exposição ao escuro para formação dos esporos. Neste sentido, Pulz (2007), obteve menor produção de conídios de *A. solani* e *A. dauci* sob luz branca, quando comparada à NUV, porém estes dois espectros não diferiram entre si. Na determinação espectral da luz NUV e branca, ele mostrou que ambas apresentaram picos de comprimento de onda entre 310 e 440 nm, preconizado por Leach (1967) como o melhor intervalo espectral para a indução da esporulação dessas espécies.

A luz, apesar de ter efeito relativamente pequeno sobre o crescimento somático de hifas, pode afetar profundamente a reprodução e a ocorrência de outros eventos diferenciadores em fungos (DEACON, 1996).

Conforme os resultados obtidos a utilização de luz branca em estudos de crescimento e esporulação de alguns fungos patogênicos (*Alternaria* e *Stemphylium*) ainda parece ser uma boa opção.

4.6. Influência de Diferentes Estresses da Colônia na Esporulação de *Stemphylium* sp.

Os resultados segundo análise de variância (Tabela 10) demonstram que houve diferença significativa entre tratamentos utilizados para a esporulação.

Tabela 10. Análise de variância para esporulação (conídio mm⁻²), *in vitro*, de *Stemphylium* sp., utilizando diferentes estresses da colônia. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
		Esporulação ¹
Isolado	2	9,03
Trtamento	3	16,45**
Isolado x Tratamento	6	1,07
Erro	48	3,30
Total	59	
CV (%)		79,62

¹ dados transformados: Raiz quadrada de Y + 1,0 - SQRT (Y + 1,0)

** Significativo pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Nas colônias sem aplicação de estresse os isolados obtiveram maiores concentrações de conídios e foram estatisticamente superiores aos demais (Tabela 11). Entre os fatores de estresse utilizados, apenas o de aplicação de UV não diferiu estatisticamente da testemunha. A raspagem de micélio como fator estressante para indução da esporulação teve uma influência negativa, tendo inclusive inibido totalmente a esporulação dos isolados SENA 108 e SENA 301.

Tabela 11. Produção de conídios, *in vitro*, de *Stemphylium* sp., expresso por número de conídios por mm² de colônia, em diferentes estresses da colônia. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Estresse da colônia ¹	Isolado			Média
	SENA 106	SENA 108	SENA 301	
Raspagem de micélio (RM)	4,38	0,00	0,00	1,46 b
Luz Ultra violeta (UV)	9,71	6,57	3,89	6,72 ab
RM + UV	14,32	0,48	0,15	4,98 b
Sem Estresse	22,00	13,89	21,54	19,14 a

¹Rm=raspagem do micélio aéreo; UV=exposição a radiação UV.

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% probabilidade.

Na literatura tem-se observado relatos de uma grande variação em relação ao método de estresse empregado e seu efeito sobre a esporulação de fungos fitopatogênicos. Pulz (2007), por exemplo, relataram que, ao contrário deste trabalho, a raspagem de micélio aéreo favoreceu mais esporulação que outros tipos de estresses aplicados a colônias de *Alternaria*. Segundo Klebs (1900 apud ROTEM, 1978) o crescimento micelial abundante restringe ou inibe a esporulação.

A complexidade e interdependência dos processos metabólicos podem fazer com que os resultados desse tipo de estudo sejam diferentes, dependendo da espécie de trabalho.

A luz UV, quando não provoca a morte celular ou mudanças genéticas permanentes, pode promover mudanças metabólicas como alteração na atividade enzimática, permeabilidade da membrana, transporte de íons ou no metabolismo do fosfato (POMPER, 1965 apud PULZ, 2007). Esse tipo de radiação pode ter afetado uma série de processos bioquímicos que podem ter sido inativados temporária ou permanentemente, tendo grande influência na esporogênese. Essa observação foi comprovada por este estudo, onde as colônias submetidas à radiação UV apresentaram diminuição na produção de esporos. Algumas espécies fúngicas podem apresentar resistência à luz UV. A resistência principalmente de *A. solani*, é citada por vários autores (ROTEM *et al.*, 1985; SUSSMAN, 1968).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a utilização desses fatores estressantes pode prejudicar a produção de conídios por *Stemphylium*. Em estudos posteriores, fatores que afetam a esporulação *in vivo*, obtidos em estudos, podem ser adaptados para induzir ou aumentar a produção de esporos em várias espécies de *Stemphylium*, especialmente as que requerem indução externa para que a esporulação ocorra.

4.7. Avaliação da Virulência dos Isolados Cultivados no Sistema Acima de Cultivo Selecionado

Em função dos resultados anteriores, elegeram-se, como melhores condições para o cultivo e esporulação de *Stemphylium* sp., o meio V8-ágar, incubação em temperatura alternada de 25 °C/10 °C (dia/noite), fotoperíodo de 6 horas luz/18 horas escuro e radiação emitida por luz branca. A metodologia desenvolvida neste trabalho apresentou bons resultados na produção de conídios por diferentes isolados de *Stemphylium* sp..

Observou-se efeito significativo entre isolados quanto a sua capacidade de infecção, expresso pelos valores de AACPD (Tabela 12).

Tabela 12. Análise de variância referente ao progresso da mancha-de-estenfílio, causada por diferentes isolados de *Stemphylium* sp., em plantas de tomateiro. Seropédica, UFRRJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio AACPD
Bloco	2	21,73
Isolado	3	1960,34**
Erro	18	26,86
Total	23	
CV (%)		37,7

** Significativo pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

O isolado 301 apresentou, significativamente, maior valor de AACPD em relação aos outros isolados. A menor valor de AACPD foi observado nas plantas inoculadas com o isolado SENA 304, não diferindo estatisticamente do isolado SENA 108.

O isolado SENA 301 foi mais virulento tendo resultado em maior valor de AACPD (38,30) seguido dos isolados SENA 106 (16,41) e dos isolados SENA 108 e SENA 304 (0,17 e 0,12, respectivamente).

Esta variação entre os isolados ilustra a variabilidade existente em estudos desenvolvidos com a espécie de *Stemphylium* em ambientes controlados e campo.

Os primeiros sintomas da mancha-de-estenfílio nas plantas foram observados aos 3 dias após a inoculação (DAI) para o isolados SENA 106 e 301, aos 11 DAI para os isolados SENA 108 e 304. O desenvolvimento da doença foi favorecido pelas condições favoráveis à doença, temperatura moderadas (25 °C) e alta umidade (Figura 2).

Observou-se pouca variação na severidade da doença ao longo das avaliações nas plantas inoculadas com os isolados SENA 108 e 304, que atingiram ao final do ensaio severidade inferior a 1%. Por outro lado, observou-se um crescimento contínuo a partir da primeira avaliação nas plantas inoculadas com os isolados SENA 106 e 301, que ao final atingiram severidade igual a 3,37 e 9,67, respectivamente.

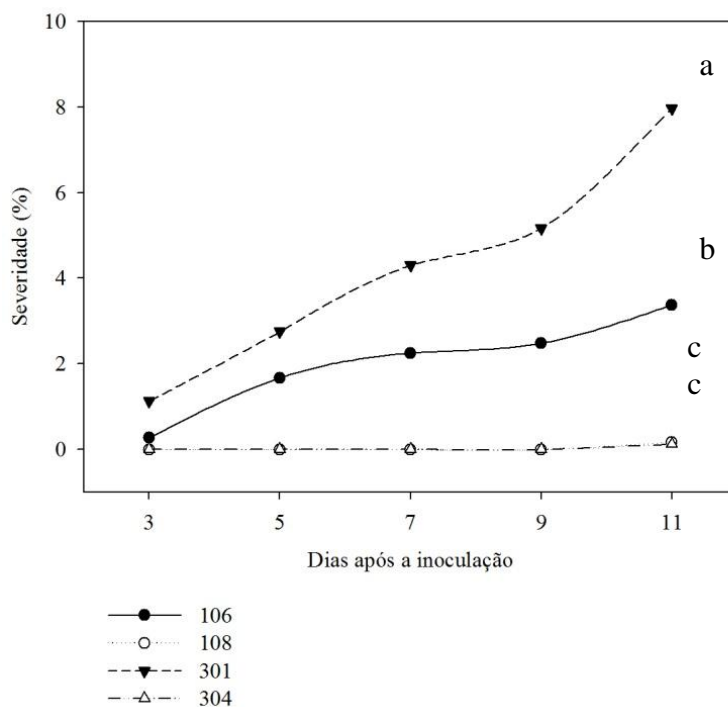


Figura 2. Severidade da mancha-de-estenfílio, causada por diferentes isolados de *Stemphylium* sp., em condições controladas (câmara de crescimento). Seropédica, UFRRJ, 2105.

A diferença apresentada pelos isolados quanto à virulência pode estar associada à origem geográfica ou época de coleta dos isolados nas lavouras das quais foram obtidos. Os isolados SENA 301 e SENA 304 foram obtidos de cultivos na região de Paty do Alfarez no mês de maio e os isolados SENA 106 e SENA 108 em Seropédica nos meses de agosto e fevereiro respectivamente. Peres *et al.* (2003) estudaram a variabilidade morfo-cultural e genética de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phoma caricae-papayae* e *Fusarium*

solani, associados a podridão penduncular do mamão (*Carica papaya* L.), procedentes de diferentes regiões e constataram uma ampla variabilidade morfológica entre os isolados estudados, mostrando que nem sempre isolados de mesma procedência são mais similares. Segundo estes autores, essa variação pode estar relacionada à origem dos isolados, coletados em regiões com características edafoclimáticas diferentes ou em lavouras com manejos distintos. Além disso, a variabilidade dos isolados pode ser influenciada por algum fator intrínseco ao patógeno, genótipo do hospedeiro ou interação entre esses fatores (PERES *et al.*, 2003). Os isolados SENA 106 e SENA 301 apresentaram maior severidade e durante o desenvolvimento dos ensaios maior capacidade de produzir conídios. O isolado SENA 301 também apresentou maior capacidade de crescer em meio de cultura e o isolado SENA 106 menor capacidade. Os isolados SENA 108 e SENA 304 apresentaram baixa virulência e esporulação durante os ensaios. Quanto ao crescimento o isolado SENA 304 apresentou as melhores médias em meio de cultura e o SENA 108 as menores.

De uma maneira geral, a metodologia desenvolvida neste trabalho proporcionou incrementos bastante significativos na esporulação dos isolados, como na capacidade dos conídios produzidos infectarem plantas de tomateiro.

5. CONCLUSÃO

1. Os meios preparados com suco de tomate e com suco V8 comercial foram, entre os meios testados, os que mais favoreceram o crescimento micelial e esporulação de *Stemphylium* sp., respectivamente.
2. As temperaturas de 25°C contínuas e alternada 25/10°C (dia/noite) foram as que mais favoreceram o crescimento micelial e a esporulação, respectivamente.
3. A melhor condição de incubação visando o crescimento micelial deu-se pela associação de 12 horas de claro/12 horas de escuro, com o aumento do período de escuro houve um decréscimo no crescimento. Para a produção de conídios esta associação foi de 6 horas de claro/18 horas de escuro. Houve uma diminuição na produção de conídios após esse período de escuro.
4. A utilização de luz branca apresentou melhores resultados tanto para crescimento quanto esporulação.
5. O uso de diferentes estresses da colônia reduziu a esporulação dos diferentes isolados.
6. Existe variação entre isolados de *Stemphylium* quanto à resposta ao meio de cultura, temperatura e fotoperíodo, porém a melhor condição para a produção de inóculo do patógeno, *in vitro*, foi identificada como sendo o cultivo em meio “V8”, temperatura 25/10°C (dia/noite), fotoperíodo de 6 horas de luz e 18 horas de escuro e uso de lâmpadas fluorescentes brancas frias.
7. O isolado SENA 301 apresentou maior virulência, sendo o mais indicado para ensaios com mancha-de-estenfílio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 948p.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 382p.
- ALMEIDA, D. **Manual de culturas hortícolas**. v. 2. Portugal: Editora Presença, 2006. 328p.
- ALVARENGA, M. A. R.; TEIXEIRA, A. S.; CHALFUN, N. N. J. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, 2004. 400p.
- ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.
- ARAGAKI, M.; NISHIMOTO, K. M.; HYLIN, J. W. Vegetative reversion of conidiophores in *Alternaria* tomato. **Mycologia**, v. 65, p. 1205-1210, 1973.
- ÁVILA, Z. D.; MELLO, S. D.; RIBEIRO, Z. D. A.; FONTES, E. M. G. Produção de inóculo de *Alternaria cassiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 533-541, 2000.
- BASHI, E.; ROTEM, J. Host and biotic factors affecting sporulation of *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* on tomatoes and of *Alternaria porri* f. sp. *solani* on potatoes. **Phytoparasitica**, v. 3, n. 1, p. 27-38, 1975.
- BASHI, E.; ROTEM, J.; PUTTER, J. Effect of wetting duration, and of other environmental factors, on the development of *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* in tomatoes. **Phytopathology**, v. 1, n. 2, p. 87-94, 1973.
- BEHARE, J.; LATERROT, H.; SARFATTI, M.; ZAMIR, D. Restriction Fragment Length Polymorphism Mapping of the *Stemphylium* Resistance Gene in Tomato. **Molecular Plant-microbe interactions**, v. 4, n. 5, p. 489-492, 1991.
- BENTES, J. L. S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 224-231, 2005b.
- BENTES, J. L. S.; MATSUOKA, K. Localização de peróxido de hidrogênio durante a resposta de defesa de tomateiro contra *Stemphylium solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 643-646, 2005.
- BLANCA, J.; CANIZARES, J.; CORDERO, L.; PASCUAL, L.; DIEZ, M. J.; NUEZ, F. Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the Tomato. **Plos One**, v. 7, n. 10, 2012.
- BYUNG-SOO KIM, SEUNG HUN YU, HYUN-JUNG CHO AND HEE-SUK HWANG. Gray Leaf Spot in Peppers Caused by *Stemphylium solani* and *S. Lycopersici*. **The Plant Pathology Journal**, p. 85-91, 2004.

BOFF, P. L.; ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F. X. Escalas para avaliação de severidade da mancha-de-estenfílio (*Stemphylium solani*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 280-283, 1991.

BOITEUX, L. S.; HENZ, G. P.; GIORDANO, L. B. *Solanum lycocarpum*: a natural host of *Stemphylium solani*. **Plant Disease**, v. 77, n. 8, p. 846, 1993.

BOSS, M. J.; DAY, D. W. **Air sampling and industrial hygiene engineering**. Florida: CRC press, 2001. 127p.

BRICKELL, C. D., B. R BAUM, W. L. A. HETTERSCHIED, A. C. LESLIE, J. MCNEILL, P. TREHANE, F. VRUGTMAN, AND J. H. WIERSEMA. International code of nomenclature of cultivated plants. **Acta Horticulturae**, v. 647, p. 1-123, 2004.

BRUNELLI, K. R.; FAZZA, A. C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L. E. A. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zae-maydis*. **Summa Phytopatologica**, v. 32, p. 92-94, 2006.

CAMARGO, L. S. **As hortaliças e seu cultivo**, 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1992. 253p. (Série Técnica número 6).

CANDOLLE, A. **Origin of cultivated plants**. International scientific series. London: Paul, Trench, v. 49, 1886. 480p. DOI <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.20259>.

CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. F.; AMORIM, E. P. R.; SILVA, J. C.; SANTOS, V. B.; FÉLIX, K. C. S. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scybalidium lignicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p. 199-200, 2007.

CHAGAS, H. A.; ROSA, D. D.; BASSETO, M. A.; ZANOTO, M. D.; FURTADO, E. L. Esporulação de *Botryotinia ricini* em diferentes meios de cultura. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 5, p. 120-123, 2009.

CHANGGONG, L.; MATTHEW, S. S.; SCHMIDHAUSER, T. J. Developmental and photoregulation of three *Neurospora crassa* carotenogenic genes conidiation induced by desiccation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, p. 101-108, 1997.

CPTEC, Centro de previsão de tempo e estudos climáticos. On line. Disponível em: www.cptec.inpe.br, acesso em: 15 de setembro de 2015.

DEACON, J. W. **Modern mycology**. 3. ed. Edinburgh: Blackwell Science, 1996. 293p.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Florida: CRC press, 1985.

DIAS NETO, J. J.; SANTOS, G. R.; CASTRO NETO, M. D.; ANJOS, L. M.; CUNHA, C. F.; IGNÁCIO, M. Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe grisea* e da concentração de conídios na severidade da Brunose do Arroz. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 173-179, 2010.

DIENER, U. L. A method for inducing abundant sporulation of *Stemphylium solani* in pure culture. **Phytopathology**, v. 42, p. 7 (Abst.), 1952.

DIENER, U. L. Sporulation in culture by *Stemphylium solani*. **Phytopathology**, v. 45, p. 141-145, 1955.

DOMINGUES, D. P. **Etiologia e controle da mancha-de-estenfilio do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) no estado do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012. 81p.

ELISS, D. **Mycology Online**. Disponível em: <<http://www.mycology.adelaide.edu.au>>. Acesso em 20 de junho de 2015.

ELLIS, M. B.; GIBSON, I. A. S. *Stemphylium lycopersici*. **CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, n. 472, p.2, 1975.

ELLIS, M. B. **Dematiaceos Hyptomycetes**. England: Editora CAB. p. 607-608, 1971.

ESPINOZA, W. **Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco**. Brasília: IICA, Escritório no Brasil, 1991. 301p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). www.fao.org. Acesso em 26 de agosto de 2015.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 412p.

GIORDANO, L. B.; ARAGÃO, F. A. S.; BOITEUX, L. S. Melhoramento genético do tomateiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, n. 219, p. 43-57, 2003.

HANNON, C. I.; WEBER, G. F. A leaf spot of tomato caused by *Stemphylium floridanum* sp.. **Phytopathology**, v. 45, p. 11-16, 1955.

HARVEY, M.; QUILLEY, S.; BEYNON, H. **Exploring the tomato: transformations of nature, society and economy**. Cheltenham, UK: Edward Elgar, 2002.

HENDRIX, J. W.; FRAZIER, W. A. Studies on the inheritance of *Stemphylium* resistance in tomatoes. **Technical Bulletin**, Honolulu: University of Hawaii, n. 8, 1949. 24p.

HOSEN, M. I.; AHMED, A. U.; ZAMAN, J.; GHOSH, S.; HOSSAIN, K. M. K. Cultural and Physiological Variation Between Isolates of *Stemphylium botryosum* the Causal of *Stemphylium* Blight Disease of Lentil (*Lens culinaris*). **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 1, p. 94-98, 2009.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. On line. Disponível em: www ftp.ibge.gov.br. Brasil, acesso em 26 de agosto de 2015.

JONES, J. P. Gray Leaf Spot. IN: JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of Tomato Diseases**. St. Paul: APS, 1991.

KIM, B. S.; YU, S. H.; CHO, H. J.; HWANG, H. S. Gray leaf spot in peppers caused by *Stemphylium solani* and *S. lycopersici*. **Journal of Plant Pathology**, v. 20, n. 2, p. 85-91, 2004.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. v. 2. Doenças de plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronomia Ceres, 2005. 663p.

KIRK, M.; CANNON, P. F.; MINTE, D. W.; STALPERS, J. A. **Dictionary of the Fungi**, Netherlands: CSIRO Publishing, 10. ed., 2008. Disponível em <www.indexfungorum.org>. Acesso em: 10 de junho de 2015.

KOWATA-DRESCH, L. S. **Estudos epidemiológicos e respostas fisiológicas à infecção da mancha-de-estenfílio em genótipos de tomateiro**. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014. 201p.

KRANZ, J.; SCHUMUTTERUR, H.; KOCH, W. **Diseases pest and weeds in tropical crops**. Berlim: Verlag Paul Parey, 1977. 666p.

KROSS, R. K.; CAVALCANTI MARTA, M. E. R. M.; BRAGA, E. M. Influência da epiderme do tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) na transferência de massa durante o tratamento osmótico. IN: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS (SACLA), 4. **Anais**. Campinas: UNICAMP, 2001.

KUROZAWA, C.; MUSSI, L. Avaliação de resistência em cultivares e híbridos de tomateiro à mancha-de-estenfílio. **Summa Phytopathologica**, v. 21, p. 199-201, 1995

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**, v. 2., 3. ed, p. 690 -719, São Paulo: Agroceres, 1997.

KUMAR, P. **Genetics of resistance to *Stemphylium* leaf blight of lentil (*Lens culinaris*) in the cross barimasur-4 x cdc milestone**. Dissertação (Mestrado) – University of Saskatchewan, Saskatoon, 2007. 68p.

LEACH, C. M. The sporulation of *Helminthosporium oryzae* as affected by exposure to near ultraviolet radiation and dark periods. **Canadian Journal of Botany**, v. 39, p. 701-715, 1961.

LEACH, C. M. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. **Canadian Journal Botany**, v. 40, p. 151-161, 1962.

LEACH, C. M. Interaction of near-ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Stemphylium*. **Canadian Journal Botany**, v. 45, p. 1999-2016, 1967.

LEÃO, E. U.; SANTOS, G. R.; SARMENTO, R. A.; REIS, M. R.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Crescimento micelial e produção de conídios de *Ascochyta cucumis* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 2, p. 325-331, 2012.

- LIMA, D. M. M. Maltose-peptone-agar, um meio de cultura para esporulação de *Stemphylium solani*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, p. 81-83, 1982.
- LINNAUS, C. **Species Plantarum**, 1.ed, Stockholm: L.Salvius, 1753.
- LOPES, C. A.; REIS, A.; BOITEUX, L. S. **Doenças fúngicas**. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. Doenças do tomateiro. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2005.
- LUKENS, R. J.; HORSFALL, J. G. Spores initiation in *Alternaria solani*. **Phytopathology**, v. 59, p. 1039 (Abstract), 1969.
- MARANCA, G. **Tomate: variedades, cultivo, pragas e doenças, comercialização**. São Paulo: Editora Nobel, 1981. 158p.
- MATHUR, S. B.; NEERGAARD, P. Seed health testing of rice IV. Effect of light and temperature on seed-borne fungi in the blotter test. **Handbook on Seed Health Testing**, Vollebakk, v. 37, n. 3, p. 723-730, 1973.
- MEHTA, Y. R. Severe outbreak of *Stemphylium* leaf blight, a new disease of cotton in Brazil. **Plant Disease**, v. 82, p. 333-336, 1998.
- MEHTA, Y. R.; ARIAS, C. A. A. Herança da resistência a *Stemphylium solani* e insensibilidade a sua fitotoxina em cultivares de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 761-765, 2001.
- MELLO, S. C. M. **Resistência do tomateiro à mancha bacteriana**. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, 1995. 112p.
- MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998.
- MILLER, P. M. V-8 juice agar as general purpose medium for fungi and bacteria. **Phytopathology**, v. 45, p. 461-462, 1955.
- MILLER, P. **The gardener's dictionary**. Abridged 4.ed, London: John and James Rivington, 1754. 529p.
- MINAMI, K.; HAAG, H. P. **O Tomateiro**. 2.ed, Campinas: Fundação Cargill, 1989. 397p.
- MINUSSI, E.; CHAVES, G. M.; NAMEKATA, K. Indução da esporulação de *Stemphylium solani* Weber e resistência varietal do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ao patógeno. **Experientiae**, v. 15, p. 235-256, 1973.
- MINUSSI, E.; MACHADO, C. C.; MENTEN, J. O. M.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Effects of different light conditions on the sporulation of *Stemphylium solani* (Weber) in a culture medium. **Fitopatologia Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 167-171, 1977.
- MIZUBUTI, E. S. G.; BROMMONSHENKEL, S. H. Doenças causadas por fungos em tomateiro. **Informe Agropecuário**, v. 18, p. 7-14, 1996.

MUSSI, L.; KUROZAWA, C. Effect of culture media and illumination regimes on *Stemphylium solani* sporulation. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 19-22 (Abst.), 1996.

NAMEKATA, T.; TOKESHI, H. Variabilidade de *Stemphylium solani* Weber, agente causal da mancha foliar do tomateiro no Estado de São Paulo. **Anais da ESALQ**, São Paulo, v. XXIV, p. 273-287, 1967.

NESBITT, T. C.; TANKSLEY, S. D. Comparative sequencing in the Genus *Lycopersicon* implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. **Genetics**, v. 162, n. 1, p. 365-379, 2002.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M. E.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 429-432, 2004.

OLIVEIRA, W. F. **Herança da resistência em tomateiro à murcha bacteriana**. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, 1997. 136p.

PAULA, R. S.; OLIVEIRA, W. F. Resistência de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a *Stemphylium solani* Weber. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 31, n. 2, p. 139-145, 2001.

PAULUS, A. O.; POUND, G. S. Effect of air temperature on initiation and development of gray leaf spot and Nailhead spot of tomato. **Phytopathology**, v. 45, p. 168-174, 1995.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. GBSSI gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 1888-1902, 2001.

PERALTA, I. E., KNAPP, S.; SPOONER, D. M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **TGC Report**, v. 56, p. 6-12, 2006.

PERES, A. P.; SILVA-MAN, R.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Variabilidade morfo-cultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciências Agrotécnicas**, v. 27, n. 5, p.1053-1062, 2003.

PULZ, P. **Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani* em meio de cultura**. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007. 68p.

REIS, A.; BOITEUX, L. S. Mancha-de-estenfilio: ressurgimento de um antigo problema do tomateiro. Brasília: Embrapa Hortaliças. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, n. 41, 2006.

RODRIGUES, T. M. S.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; MIZUBUTI, E. S. G. *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 4, p. 203-212, 2010.

ROTEM, J.; COHEN, Y.; WAHL, I. A new tomato foliage disease in Israel caused by *Stemphylium botryosum*. **Canadian Journal of Plant Sciences**, v. 46, p. 265-270, 1966.

ROTEM, J.; BASHI, E. A review of the present status of the *Stemphylium solani* in tomato foliage. **Phytoparasitica**, n. 5, v. 1, p. 45-48, 1977.

ROTEM, J.; WOODING, B.; AYLOR, D. E. The role of solar radiation especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. **Phytopathology**, v. 75, p. 510-514, 1985.

ROTEM, J. **The genus Alternaria: biology, epidemiology and pathogenicity**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1998. 326p.

SANDROCK, R. W.; VANETTEN, H. D. Fungal Sensitivity to and Enzymatic Degradation of the Phytoanticipin α -Tomatine. **Phytopathology**, v. 88, n. 2, p. 137-143, 1998.

SANTOS, J. R. M. Produção massal de esporos de *Stemphylium lycopersici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20 (Suplemento), p. 354, 1995.

SANTOS, J. R. M. Protocolo de tecnologia: seleção para resistência a doenças em hortaliças, tomateiro/mancha de estenfínilio (*Stemphylium spp*). Embrapa Hortaliças: **Comunicado técnico**, n. 11, 1999.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression. Of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, n. 67, p. 1051-1056, 1977.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia – Embrapa Hortaliças, 2000. 168p.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 47-52, 2012.

SIMMONS, E. G. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia*, v. 59, p. 67-92, 1967.

SIMMONS, E. G. **Perfect states of Stemphylium**. New York: *Mycologia*, v. 61, n. 1, p. 1-26, 1969.

SOARES, D. J. **Esporulação e germinação in vitro de conídios de *Cercospora coffeicola***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2003. 31p.

SOUZA, F. C. **Esporulação de *Stemphylium solani* sob diferentes condições de temperatura**. Monografia (Graduação) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013. 30f.

SPIRARI, M. G. **Eficiência e efeito de diferentes temperaturas na Produção de Conídios de *Stemphylium sp.*, in vitro**. Monografia (Graduação) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011. 27p.

SPONNER, D. M; HETTERSCHEID, W. L. A; VAN DEN BERG, R. G.; BRANDENBURG, W. Plant nomenclature and taxonomy: an horticultural and agronomic perspective. **Horticultural Reviews**, v. 28, p. 1-60, 2003.

SPONNER, D. M.; PERALTA, I. E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes *Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill) Wettst. **Taxon**, v. 54, p. 43-61, 2005.

STEVENS, M. A.; RICK, C. M. Genetics and breeding, In: J. G. Atherton and J. Rudich editors. **The tomato crop**. Chapman and Hall, London, UK. p. 35-109, 1986.

STRANDBERG, J. Isolation, storage and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. **Phytopathology**, v. 77, p. 1008-1012, 1987.

SUSSMAN, A. S. Longevity and survivability of fungi. In: AINSWORTH, C. C.; SUSSMAN, A. S. **The fungi: an advanced treatise**. New York: Academic Press, v. 3, p. 447-486, 1968.

TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L.G.; ARIAS, S. M. S.; MACHADO, J. C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação in vitro de fungos fitopatogênicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1314-1320, 2001.

TOURNEFORT, J. P. **Elemens de botanique: or method pour connoitre les plantes**. Paris: L'Imprimerie Royale, v.1, 1764.

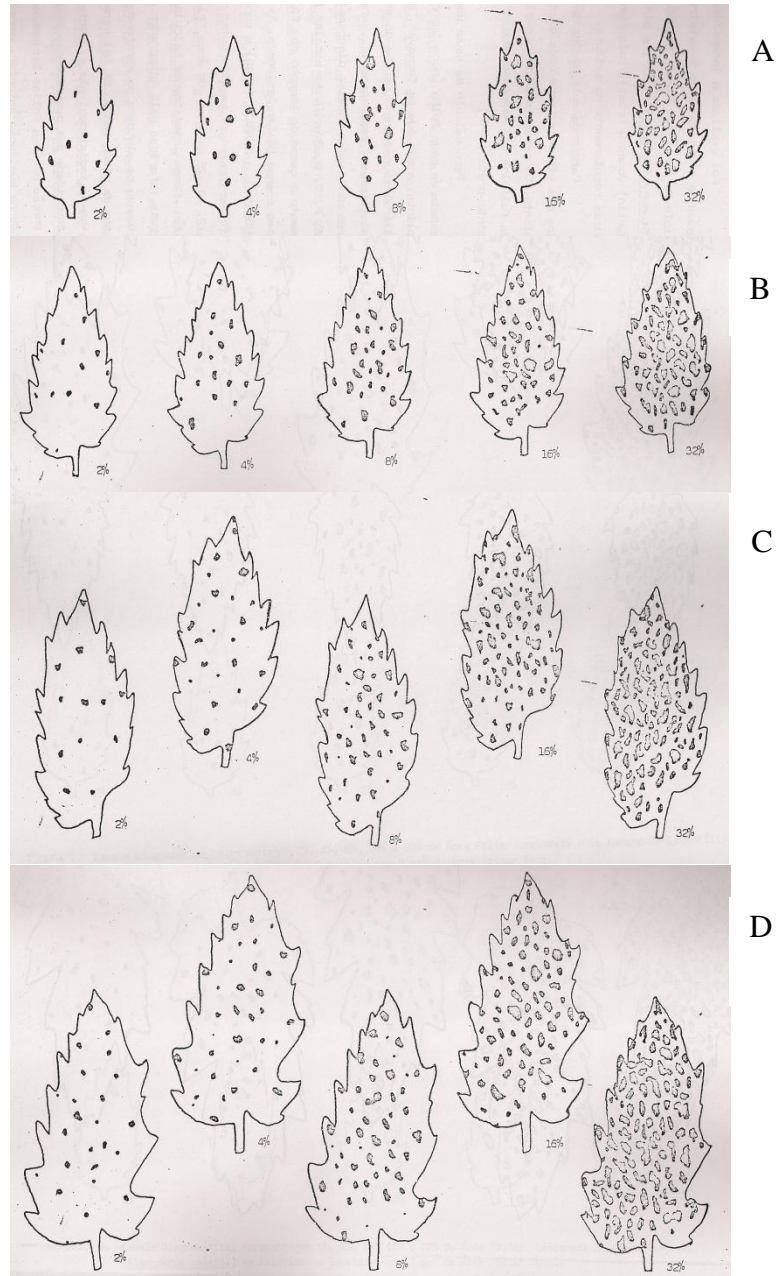
TRIONE, E. J.; LEACH, C. M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology**, v. 59, p. 1077-1083, 1969

WARNOCK, S. J. A review of taxonomy and phylogeny of genus *Lycopersicon*. **HortScience**, v. 23, n. 4, p. 669-673, 1988.

WEBER, G. F. Gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani*, sp. **Phytopathology**, v. 20, p. 513-518, 1930.

WELLS, H. D.; FORBES, I.; MARKHAN, C. R. A black, readily sporulating mutant of *Stemphylium solani* susceptible biotypes of blue lupine. **Phytopathology**, v. 61, p. 575-577, 1971.

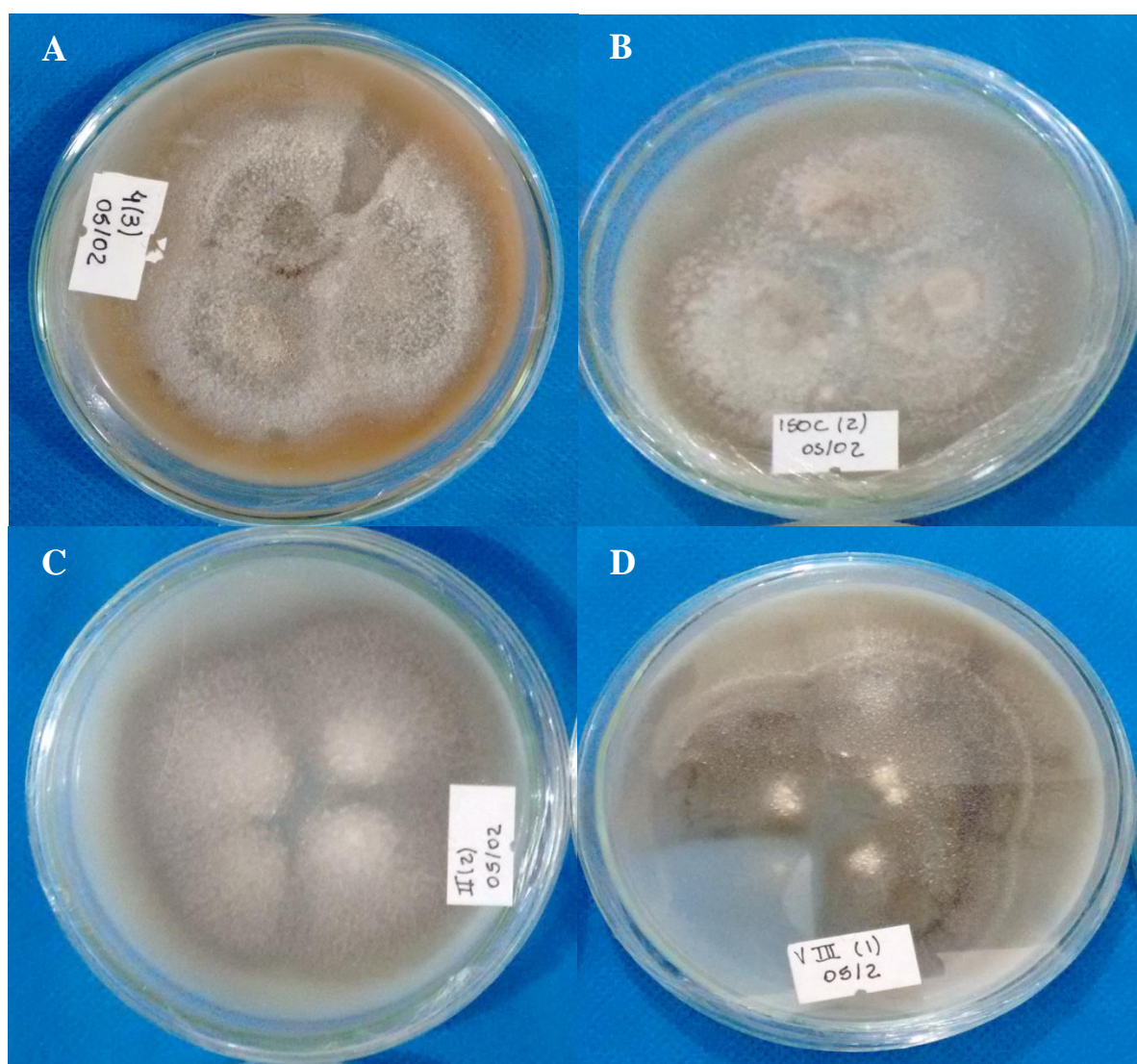
7. ANEXOS



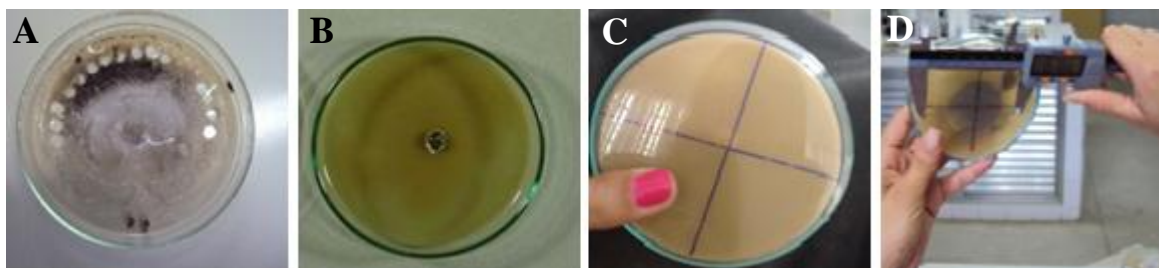
Anexo A. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha-de-estenfílio (*Stemphylium solani*) em folhas de tomateiro (*S. lycopersicum*) (BOFF et al., 1991) nas áreas foliares: 7 cm² (A); 12 cm² (B); 18 cm² (C); 25 cm² (D) e 35 cm² (E).



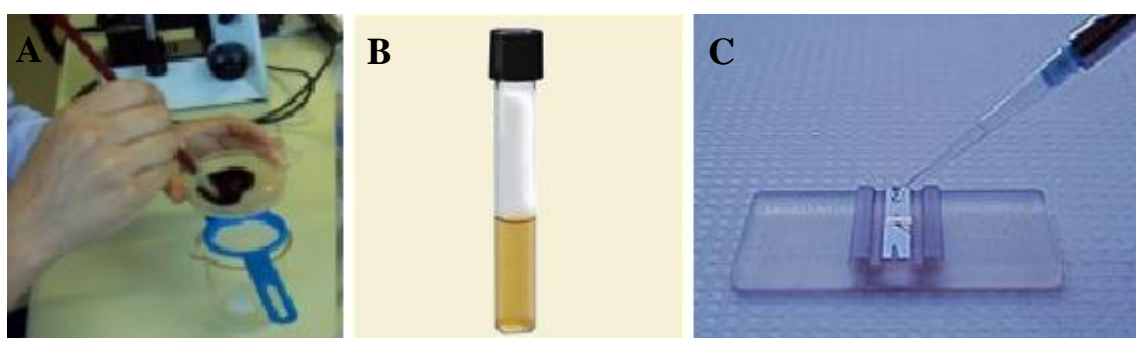
Anexo B. Conídio de *Stemphylium solani* (A). Lesão da mancha-de-estenfílio em folha de tomateiro na fase inicial.



Anexo C. Aspecto e coloração das colônias dos isolados SENA 106 (A), SENA 108 (B), SENA 301 (C) E SENA 304 (D) de *Stemphylium* spp. coletados de folhas de tomateiro.



Anexo D. Montagem e avaliação dos ensaios com crescimento micelial: disco de micélio retirados da borda das colônias de *Stemphylium* (A), depositados no centro das placas de Petri (B), eixos perpendiculares definido no fundo das placas (C) e medição do diâmetro das colônias (D).



Anexo E. Montagem e avaliação da esporulação: raspagem do micélio (A), tubo de ensaio contendo a solução filtrada após raspagem (B) e alíquotas de solução depositadas na câmara de Neubauer para contagem dos esporos (C).



Anexo F. Mudas de tomateiro cereja ‘Perinha Água Branca’ (A), inoculadas (B) e utilizadas em ensaio em câmara de crescimento para avaliação da virulência dos isolados (C).