

INSTITUTO BIOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO

**Estudos morfológicos e moleculares de *Colletotrichum*
gossypii var. *cephalosporioides***

Samantha Zanotta

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal
Orientador(a): Prof (a). Dr (a). Ricardo Harakava

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Zanotta, Samantha.

Estudos morfológicos e moleculares de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. / Samantha Zanotta. -- São Paulo, 2013.

74 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interação, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Ricardo Harakava.

Versão do título para o inglês: Morphological and molecular studies of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

1. Algodoeiro 2. *Colletotrichum gossypii* 3. *Gossypium* spp.
4. Iniciadores específicos 5. Ramulose I. Zanotta, Samantha II. Harakava, Ricardo III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2013/016



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
 AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
 Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
 CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Samantha Zanotta

Título: Estudos morfológicos e moleculares de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Orientador (a): Prof. Dr. Ricardo Harakava

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

***Deixe todos os campos em branco para serem preenchidos no dia do exame de Defesa da Dissertação**

Dedico àqueles que são pilares de minha vida e sem os quais a mesma não teria sentido: meus pais, Carlos e Glória, meu irmão, Brunno, meu avô, Antônio e minha avó Maria (*in memoriam*), por dedicarem parte de suas vidas, na minha formação pessoal e profissional, pelo amor a mim dedicado e por me proporcionarem paz na alma e felicidade na vida.

Amo vocês!

Agradecimentos

Primeiramente e acima de tudo agradeço a Deus, por ter me dado à oportunidade de concretizar minhas metas.

Aos meus pais, Carlos e Glória, por sempre me proverem de ensinamentos para a vida e para todas as questões em meus momentos mais difíceis, sem que, para isso, exigissem nada em troca. Pelo amor incondicional, orações, confiança, apoio e exemplo de vida a seguir.

Ao meu irmão, Brunno, pela atenção e carinho incondicionais dedicados a minha pessoa, tanto nos momentos comemorativos como nos tumultuados. Sempre desenvolveu a função de irmão mais velho, aquele que protege e ampara. Tenho uma admiração imensa por você!

Ao Dr. Ricardo Harakava, meu orientador, por me aceitar como orientada e pelas oportunidades de aprendizado que foram e continuarão a ser de valor inestimável para a continuidade da minha carreira como cientista, pesquisadora e professora. Agradeço também pela paciência, além da amizade formada.

A Dra. Marta Helena Vechiato Maziero, por ter aberto as portas do Laboratório de Patologia de Sementes – Instituto Biológico (São Paulo), confiando na minha competência. A todas as suas contribuições, ensinamentos e assessoria na área de patologia de sementes e também nas suas valiosas correções, sugestões e auxílio na resolução de problemas para o bom andamento do trabalho. Ainda, agradeço pelos materiais que nunca me foram negados durante qualquer experimento realizado.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, pela oportunidade de ser aluno bolsista de mestrado (CAPES). Poder vivenciar o trabalho de um instituto com tanta história e de grande importância nacional certamente ajudou na minha formação como profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Aos membros da banca de avaliação Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Dr. José Ivanildo de Souza, Dr. Jesus Guerido Tófoli, Dra. Carmen Lídia Amorim Pires Zottarelli pelas correções, comentários dos manuscritos tanto da qualificação quanto da versão final da tese. Essa colaboração foi importantíssima, melhorando a qualidade e valorizando o trabalho final.

Aos pesquisadores: Dra. Christiane Ceriani Aparecido, Dra. Margarida Fumiko Ito, Dra. Aparecida de Souza Tanaka, Dr. Alderi Emídio de Araújo, MSc. Augusto César Pereira

Goulart e Dr. Yeshmant Ramchandra Mehta, que gentilmente, cederam os isolados utilizados neste trabalho.

A Fabiana, pela ajuda com os estudos morfológicos, disponibilidade durante a execução deste trabalho e por toda compreensão.

Ao Wilson e a Alyne pela ajuda nos momentos corridos no Laboratório de Patologia de Sementes.

Agradeço aos professores do curso de Pós Graduação do IB, amigos e colegas pelo agradável convívio e companheirismo.

A todos os meus amigos que me apoiaram, me corrigiram, me aturaram, souberam entender a importância deste momento do trabalho que por tantas vezes justificou a minha ausência e me fizeram saber que, antes de tudo, a vida sem eles não teria graça alguma. Sem dúvida, este, que até o momento é o capítulo mais louco da minha vida, não poderia de deixar de ser escrito sem a presença de vocês.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, quer me criticando, quer incentivando, gostaria de manifestar meus sinceros agradecimentos.

Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

ZANOTTA, S. Estudos morfológicos e moleculares de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. SÃO PAULO. 2012. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

RESUMO

Colletotrichum gossypii var. *cephalosporioides* (Cgc), agente causal da ramulose, é um dos principais patógenos que afetam o algodoeiro. A diferenciação desta variedade de *Colletotrichum gossypii* (Cg), causadora da antracnose que se desenvolve sobre as sementes de algodão é muito difícil quando se utilizam métodos rotineiros de patologia de sementes, baseando-se apenas nas características morfológicas. O desenvolvimento de uma metodologia para detecção e diferenciação de Cgc em sementes seria de grande valia para a diagnose destes patógenos em laboratórios de rotina, resultando na comercialização de sementes de boa qualidade sanitária. Diante disso, este trabalho teve como objetivos: estudar características morfológicas do Cgc; estudar características moleculares do Cgc; desenvolver um método eficiente, rápido e de fácil aplicação na detecção e na identificação de Cgc em sementes e plantas de algodão utilizando a técnica PCR; e realizar uma pesquisa com produtores de algodão sobre a ocorrência da ramulose. Para isso, vinte isolados de Cgc e três isolados de Cg de diferentes regiões foram obtidos. Foi efetuado o teste de patogenicidade para confirmação da identidade dos isolados, baseando-se nos sintomas característicos da doença. Os experimentos para a caracterização do crescimento, tipo e coloração micelial foram realizados utilizando-se dois meios de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e Czapek (CZP), e duas temperaturas de incubação, 25 e 27 °C. O crescimento micelial foi avaliado aos cinco e dez dias de incubação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições de cada isolado e os dados foram analisados em esquema fatorial (3x2x2) aplicando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade. As características miceliais foram avaliadas de acordo com a morfologia e coloração de micélio. Para os estudos moleculares, foi realizada a extração de DNA, a

amplificação com iniciadores universais de regiões conservadas (ITS e Beta-tubulina) e sequenciamento dos produtos da amplificação. O teste de patogenicidade comprovou a identidade de todos os isolados. Os resultados do teste de caracterização do crescimento, tipo e coloração micelial mostraram que isolados de Cgc da mesma variedade apresentam variabilidade, tendo em vista as diferenças de crescimento, tipo e coloração micelial, em diferentes meios de cultura e temperaturas. No estudo molecular, foram observadas diferenças significativas nas sequências dos produtos amplificados para o gene da Beta-tubulina. A partir destas diferenças, foi desenhado um par de iniciadores específicos para Cgc. No teste de especificidade dos iniciadores, foi possível a observação do fragmento esperado de 230 pb somente para isolados de Cgc. Para detecção do patógeno em sementes e plantas de algodão os métodos desenvolvidos mostraram-se confiáveis.

Palavras-chave: Algodoeiro, *Colletotrichum gossypii*, *Gossypium* spp., Iniciadores específicos, Ramulose.

ZANOTTA, S. Morphological and molecular studies of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. SÃO PAULO. 2012. Dissertation (Master in Health, Food Safety and Environmental Agribusiness) - Biological Institute

Abstract

Colletotrichum gossypii var. *cephalosporioides* (Cgc), the causal agent of ramulose, is the most important pathogen affecting cotton. The differentiation of this variety and *Colletotrichum gossypii* (Cg) that causes anthracnose, both of which that can develop on cotton seeds, is very difficult when using routine methods of seed pathology based solely on morphology. The development of a methodology for detection and differentiation of Cgc from seeds, would be of great value for the diagnosis of these pathogens in routine laboratories, resulting in the commercialization of seeds with good sanitary quality. Thus, this work has as objectives: to study the morphological characteristics of Cgc; to study the genetic variability of Cgc; to develop an efficient, fast and easy method for the detection and identification of Cgc in seeds and cotton plants using PCR and to survey cotton producers. Twenty-three isolates of Cgc and Cg were obtained from different regions of Brazil. Pathogenicity tests were conducted to confirm their identity, based on the observation of characteristic symptoms of the disease. The experiments for characterization of growth, mycelial type and color were performed using two culture media, potato dextrose agar (PDA) and Czapek (CZP), and two incubation temperatures, 25 and 27 ° C. Linear growth was assessed by measuring the average diameter of each colony, after five and ten days of incubation. A completely randomized design was followed with three replications of each isolate and the data were analyzed by adopting the factorial design (3x2x2) applying the Tukey test at 5% probability. The mycelial characteristics were evaluated according

to its morphology and color. In the molecular studies, DNA fragments were amplified with universal primers for conserved regions (ITS region and Beta tubulin) and the products were sequenced. The pathogenicity test confirmed the identity of all isolates. The growth characteristics and mycelial type and color of Cgc have shown that isolates of the same variety have differences when grown in different media and temperatures. In the molecular study, significant differences were observed in the beta tubulin gene sequences. Based on these differences, a pair of primers specific for Cgc was developed. An amplification product of approximately 230pb was observed for Cgc isolates while Cg isolates did not result in observable bands, confirming the specificity of the primers. For detection of the pathogen in plants and seeds of cotton methods developed and proved reliable.

Keywords: Ramulosis, *Gossypium* spp, cotton, *Colletotrichum gossypii*, specific primers.

LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES, ABREVIATURAS.

°C - Grau Celsius

BDA – Batata Dextrose Agar

BOD – Incubadora com regulagem de temperatura

bp – Par de bases

Br – Branco

Cgc – *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Cg – *Colletotrichum gossypii*

CIA – Clorofórmio Álcool Isoamílico

cm - centímetro

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

cv. – Cultivar

CV% - Coeficiente de variação em %

Czp – Czapeck

DMS – Diferença mínima significativa

DNA – “Deoxyribonucleic acid”

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

HCl – Ácido clorídrico

Kb - Quilobyte

M – Molar

mL - Mililitro

mM - Milimolar

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

LISTA DE TABELAS

Número	Descrição	Página
1	Importância de doenças do algodoeiro em Estados produtores do Brasil.....	7
2	Lista de isolados obtidos para os estudos morfológicos e moleculares.....	23
3	Incidência (%) de patógenos em amostras de sementes de algodão.....	29
4	Tempo para aparição dos sintomas.	34
5	Agrupamento de isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> , incubados a 25 °C e 27 °C, nos meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e Czapeck (CZP), de acordo com as características miceliais e coloração.....	36
6	Quadro de análise fatorial de crescimento micelial de Cgc....	40
7	Crescimento micelial (cm) de diferentes isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> (Cgc) em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e Czapek (CZP), incubados durante 5 e 10 dias a 25 e 27°C.....	41
8	Análise fatorial da interação temperatura e meio de cultura..	45

LISTA DE FIGURAS

Número	Descrição	Página
1	Sintomas característicos de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> : redução de tamanho (A), superbrotamento ou envassouramento (B), manchas necróticas e enrugamento da superfície do limbo da folha (C) e manchas necróticas na haste (D).....	10
2	Sintomas característicos de <i>Colletotrichum gossypii</i> : amarelecimento das folhas (A) e lesões escuras e deprimidas nas maçãs do algodoeiro (B).....	13
3	Esquema da região ITS que inclui ITS1, ITS2, 5.8DNAr e os iniciadores universais ITS1 e ITS4.....	16
4	Estrutura gemômina do gene β -tubulina de <i>Neurospora crassa</i> . As regiões sombreadas denotam éxons e as regiões com traços denotam íntrons. As regiões brancas denotam sequencias em torno da região codificadora de proteína de cada gene. Bt2a e b, Bt1a e b são pares de iniciadores comumente utilizados para a identificação de fungos.....	17
5	Questionário para entrevistar produtores de algodão.....	31
6	Sintomas característicos de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em plantas de algodão (cv. Fibermax 966): redução de tamanho (A), superbrotamento (B), necrose e enrugamento da superfície do limbo da folha (C) e necrose na haste (D).....	33
7	Grupos de isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> segundo características de tipo e coloração de micélio nos meios BDA e Czapeck. Grupos 1 ao 3. F – frente da placa e R – reverso da placa.....	37
8	Grupos de isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> segundo características de tipo e coloração de micélio nos meios BDA e Czapeck. Grupos 4 ao 7. F – frente da placa e R – reverso da placa.....	38
9	Grupos de isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> segundo características de tipo e coloração de micélio nos meios BDA e Czapeck. Grupos 8 ao 10. F – frente da placa e R – reverso da placa.....	39
10	Grupos de isolados de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> segundo características de tipo e coloração de micélio nos meios BDA e Czapeck. Grupo 11. F – frente da	40

	placa e R – reverso da placa.....	
11	Interação isolados x meios de cultura aos cinco dias após a incubação.....	42
12	Interação isolados x meios de cultura aos dez dias após a incubação.....	43
13	Interação isolados x temperaturas aos cinco dias após a incubação.....	44
14	Interação isolados x temperaturas aos dez dias após a incubação..	44
15	Alinhamento das sequências da região Beta-tubulina de Cg, Cgc e outras espécies de <i>Colletotrichum</i> , utilizando o Programa BioEdit. Cg = <i>Colletotrichum gossypii</i> e Cgc = <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	46
16	Amplificação com os iniciadores específicos desenvolvidos para <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> , Cgc 1 – 24, Cg 1 – 3; C 1 – 9 e A 1 – 8. Pd = Padrão 100 bp, Br = Controle sem DNA, Cgc - <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> , Cg - <i>Colletotrichum gossypii</i> (Cg), C – outras espécies de <i>Colletotrichum</i> e A - outras espécies de patógenos que afetam o algodoeiro.....	48
17	Amplificação por PCR com os iniciadores Cgc-F e Cgc-R e DNAs de Cgc extraídos das amostras de sementes sem incubação e com incubação, nas respectivas incidências (%) do patógeno: 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 50 e 100%. A – Amostras sem incubação, B - Amostras incubadas há 3 dias; C – Amostras incubadas por 5 dias e 7 dias. Pd = Padrão 100 pb, Br = Controle sem DNA, Cgc = <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> e Cg = <i>Colletotrichum gossypii</i>	50
18	Amplificação dos DNA extraídos das plantas com os iniciadores específicos desenvolvidos para <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioide</i> . Pd = Padrão 100 bp, Br = Controle sem DNA, Cgc - <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> , C = caule, F = folhas e GA = gema apical.....	51
20	Tempo no mercado como produtor de algodão.....	52
21	Cultivares de algodão utilizados em plantios nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul.....	52
22	Conhecimento da ramulose entre os produtores de algodão.....	53

23	Problemas com a ramulose entre os produtores de algodão.....	53
24	Métodos para prevenção de doenças.....	54

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES, ABREVIATURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. A cotonicultura no Brasil.....	4
2.2. O algodoeiro.....	6
2.3. Ramulose do algodoeiro.....	8
2.4. Técnicas rotineiras para detecção e identificação de fungos em sementes....	11
2.5. Diferenciação entre <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> e <i>Colletotrichum gossypii</i>	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Locais de execução.....	22
3.2. Obtenção e preservação de isolados.....	22
3.3. Teste de patogenicidade.....	24
3.4. Caracterização micelial.....	25
3.5. Técnicas moleculares.....	26
3.5.1. Extração de DNA.....	26
3.5.2. Amplificação da região ITS.....	26
3.5.3. Amplificação da região Beta-tubulina.....	27
3.5.4. Sequenciamento.....	27
3.5.5. Desenho de iniciadores específicos.....	28
3.5.6. Teste de especificidade dos iniciadores Cgc-F e Cgc-R.....	28
3.5.7. Detecção do patógeno em sementes via PCR.....	28
3.5.8. Detecção do patógeno em plantas via PCR.....	30
3.6. Pesquisa com produtores de algodão.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Teste de patogenicidade.....	33
4.2. Caracterização micelial.....	35
4.2.1. Tipo e coloração das colônias.....	35
4.2.2. Crescimento das colônias.....	40
4.3. Técnicas Moleculares.....	45

4.3.1.	Amplificação da região ITS.....	45
4.3.2.	Amplificação da região Beta-tubulina.....	46
4.3.3.	Teste de especificidade dos iniciadores Cgc-F e Cgc-R.....	47
4.3.4.	Detecção do patógeno em sementes via PCR.....	48
4.3.5.	Detecção do patógeno em plantas via PCR.....	50
4.4.	Pesquisa com produtores de algodão.....	51
5.	CONCLUSÕES.....	55
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior produtor de algodão no mundo, estando atrás somente da China, Estados Unidos, Índia e Paquistão (ANUÁRIO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 2011).

Nos últimos anos a cotonicultura vem se tornando cada vez mais importante no cenário agrícola brasileiro. Já ocorreram diversas modificações, tanto em relação às regiões de importância, como na tecnologia empregada na sua produção. As áreas de produção, antes concentradas na região sul e sudeste e caracterizadas por pequenas áreas de produção e sistemas menos tecnificados, passaram a ocupar regiões do Brasil central, região da retomada da recuperação da cultura do algodão (KUBIAK, 2003).

A explosão da cultura do algodão no Centro-Oeste e em certas regiões do Nordeste brasileiro representou a migração da cultura para novas áreas, as quais, livres de certas pragas e doenças e com o clima mais favorável, permitiram certas vantagens comparativas em relação às áreas tradicionais (FNP Consultoria & Comércio, 2002).

Com relação aos problemas da ocorrência de doenças no algodoeiro, na literatura especializada, encontram-se mais de 250 espécies de agentes causais de doenças, das quais 90% são fungos. Muitos destes patógenos não apresentam qualquer importância econômica, porém, outros são altamente destrutivos. O método mais econômico e seguro de controle de doenças é o emprego de cultivares resistentes. Entretanto, nem sempre existem fatores de resistência disponíveis no germoplasma ou o material não apresenta resistência múltipla às principais doenças que ocorrem na região, ou ainda, por opção de produtores, que utilizam plantio de cultivares suscetíveis (CIA; FUZATTO, 1999). Além do uso de variedades resistentes, a utilização de sementes livres de patógenos é considerada uma das medidas de controle mais eficientes (CIA; SALGADO, 1995).

Não existem dados oficiais sobre os efeitos somados de todas as doenças sobre a produção de algodão; existem apenas relatos de danos decorrentes da ação de patógenos, individualmente. Entretanto, como muitos patógenos da cultura ocorrem nas regiões produtoras (CIA; SALGADO, 1995), estima-se que as perdas sejam substanciais. Depois que grandes áreas produtoras de algodão se instalaram em regiões de Cerrado, tem sido constatada alta incidência de doenças foliares, inclusive aquelas que eram consideradas de pouca importância para o algodoeiro nas regiões tradicionalmente produtoras (MONTEIRO, 2007).

Cia e Fuzatto (1999), classificando a importância potencial de doenças de algodoeiro, até o ano de 1999, em Estados produtores da região do Cerrado brasileiro, responsável por 92% da produção nacional, identificaram a ramulose e a mancha angular como as de maior importância dentre as doenças fúngicas e bacterianas.

A ramulose é causada por uma variedade fisiológica do agente causal da antracnose (*Colletotrichum gossypii* - Cg), que recebeu o nome de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* - Cgc (CIA; SALGADO, 1995). Essa doença foi diagnosticada pela primeira vez no município de Rancheira – SP, em 1936 e já se encontra disseminada praticamente por todas as regiões do país onde se cultiva o algodão (KIMATI et al., 1997). Fora do Brasil, sua ocorrência foi relatada somente na Venezuela (MALAGUTI, 1955) e Paraguai (MATHIESON; MANGANO, 1985).

A diferenciação de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* de *Colletotrichum gossypii* que se desenvolvem sobre as sementes de algodão, é muito difícil quando se utilizam métodos rotineiros de patologia de sementes como incubação em papel de filtro, plaqueamento em ágar e outros, comprometendo a confiabilidade dos métodos usuais disponíveis.

O desenvolvimento de um método para detecção e diferenciação da var. *cephalosporioides* em sementes de algodão seria de grande valia para a diagnose destes patógenos em laboratórios de rotina, resultando na comercialização de sementes com boa qualidade sanitária, com reflexos positivos no controle dessas doenças e na produtividade de grãos e sementes.

A utilização de técnicas moleculares pode ser bastante promissora para solucionar os problemas metodológicos na detecção e diferenciação de patógenos em sementes.

Com os avanços na área de biologia molecular, vêm sendo desenvolvidas pesquisas com o objetivo de estudar a taxonomia, a variabilidade genética e a detecção de fungos fitopatogênicos, empregando-se técnicas moleculares como reação de polimerase em cadeia (PCR), amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), bem como os métodos imunológicos e enzimáticos (BATISTA, 1993).

Dentre as técnicas acima mencionadas, a técnica PCR é considerada a mais adequada para a diagnose por sua especificidade, tendo em vista que as técnicas imunológicas e enzimáticas apresentam limitações quanto a sua confiabilidade e precisão, pois podem ser afetadas por diversos fatores como: amostras que contenham altos níveis de proteínas, variações em função do estágio do microrganismo, tipo de tecido utilizado e variações ambientais (NEALE et al., 1992; SCHILLING et al. 1996).

Em patologia de sementes, especificamente para detecção de fungos, diversos trabalhos foram realizados utilizando PCR, associada ou não a outras técnicas, para a diagnose de fungos em nível infraespecífico.

Perante isso, o presente estudo teve como objetivos: a) estudar características morfológicas de diversos isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, utilizando duas temperaturas e dois meios de cultura; b) estudar características moleculares por meio de análises da região ITS e gene da Beta-tubulina de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*; c) desenvolver um método eficiente, rápido e de fácil aplicação para detecção e identificação de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodão utilizando a técnica PCR; d) realizar uma pesquisa com produtores de algodão sobre a ocorrência da ramulose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cotonicultura no Brasil

A presença do algodoeiro no território brasileiro é bastante antiga, muito anterior à chegada dos portugueses em 1500. Apesar das nossas condições climáticas não permitirem uma conservação adequada de fibras antigas que comprovariam esta tese, a maior parte dos pesquisadores acredita, por evidências indiretas, que o algodão subsiste no território nacional há milhares de anos. Prova disso é a presença de formas selvagens do algodoeiro, encontradas desde o século XVI, e que diferem das espécies originariamente encontradas na Ásia e na América. Isso denota uma origem bastante remota desta cultura no Brasil (COELHO, 2002).

Existem relatos de que quando os europeus chegaram ao Brasil os indígenas já cultivavam esta malvácea, trabalhando os fios em tecidos (SALVATIERRA, 2008). Além da pluma, do algodoeiro aproveitavam-se também as sementes na alimentação e as folhas como medicamento para cura de feridas (COELHO, 2002). No século XVIII, o cultivo se espalhou pelos Estados da Bahia, Pernambuco e Maranhão, e mais adiante se expandiu para outros Estados do Nordeste, que se tornou grande região produtora no Brasil. Desde então, o eixo da cultura foi deslocando-se, chegando ao Sul no século XX, onde por muitos anos esteve concentrada (SALVATIERRA, 2008).

A década de trinta representou um divisor de águas na cotonicultura nacional. Com a crise de 1929 e a decadência do café, a cotonicultura foi beneficiada devido ao impulso sofrido na industrialização do país nesta década, que representou um crescimento na demanda pela pluma nacional, já que a indústria têxtil era a mais importante neste período. Além disso, a crise no café estimulou a conversão de muitos agricultores à cotonicultura, especialmente no Estado de São Paulo (COELHO, 2002).

A partir disso, São Paulo consolidou-se como principal produtor nacional, aproveitando-se da proximidade de seu crescente parque têxtil e do esforço dos seus pesquisadores, entre eles os do Instituto Agrônomo de Campinas. Já na década de trinta, por exemplo, a área cultivada passou de 393.000 hectares em 1934 para 1.000.000 hectares em 1935 (COELHO, 2002).

Em 1999, ocorreu à consolidação da Região Centro-Oeste como principal produtora nacional, especialmente o Estado do Mato Grosso. Nos demais Estados da região a produção também cresceu bastante. Em 1989/90, a produção conjunta de Mato Grosso do Sul e Goiás era de aproximadamente 53,6 mil toneladas de algodão

em pluma. Em 1999/2000, a produção já era de 118,9 mil toneladas (ROCHELLE, 2000; COELHO, 2002).

Nestes Estados, a cotonicultura se desenvolveu de maneira semelhante àquela realizada nos Estados Unidos. Baseada em grandes propriedades e no uso intensivo de máquinas e tecnologia, ela difere completamente da tradicional cultura de algodão realizada em São Paulo e no Paraná (COELHO, 2002).

Atualmente, a cotonicultura vem se destacando como uma das atividades agrícolas de maior importância para o agronegócio brasileiro, devido ao crescente desenvolvimento de pesquisas objetivando o aumento da eficiência produtiva, com destaque para estudos envolvendo a fisiologia das plantas (OLIVEIRA et al., 2012).

Nos últimos anos a cotonicultura vem se tornando cada vez mais importante no cenário agrícola brasileiro. Já ocorreram diversas modificações, tanto em relação às regiões de importância, como na tecnologia empregada na sua produção. As áreas de produção, antes concentradas na região sul e sudeste, caracterizadas por pequenas áreas de produção e sistemas menos tecnificados, passaram a ocupar regiões do Brasil central, região da retomada da recuperação da cultura do algodão (KUBIAK, 2003).

O algodoeiro herbáceo (*Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch.) é uma das principais culturas exploradas no Brasil, cultivada em mais de 15 Estados. Ao decorrer de 10 anos, entre 1998 e 2008, o Brasil passou de importador para exportador de algodão (SALVATIERRA et al., 2008).

A explosão dessa cultura no Centro-Oeste e em certas regiões do Norte e Nordeste brasileiro representou a sua migração para novas áreas, as quais, livres de certas pragas e doenças e com o clima mais favorável, permitiram certas vantagens em relação às áreas tradicionais (FNP Consultoria & Comércio, 2002).

Hoje, o Brasil, é reconhecido como grande e extremamente competitivo produtor mundial de algodão, habilitado a atender com absoluta qualidade e regularidade ao mercado doméstico e com igualdade à clientela internacional. O algodão brasileiro conquista espaços em nível mundial graças a sua qualidade e também à promoção que vem sendo feita em torno do produto. Por conta desse perfil e desse histórico, o país firmou sua presença na lista dos grandes produtores e exportadores mundiais de algodão, sendo o quarto maior produtor, com uma produção de 2,037 milhões de toneladas, ficando atrás da China com 6,400 milhões de toneladas, Índia com 5,300 e Estados Unidos com 3,940, e o terceiro maior exportador, atrás somente dos Estados Unidos e Índia (ANUÁRIO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 2011).

Economicamente, o algodão é uma das principais commodities nacional (CIA; FUZZATO, 1999). Segundo dados do sétimo levantamento feito pelo CONAB (2013) sobre a safra 2012/2013, foram registrada uma área cultivada com algodão no país de 886,8 mil hectares e a produção de algodão em caroço de 3.264,3 mil toneladas e de 1.263,4 mil toneladas em pluma. Destacando as regiões Centro-Oeste e Nordeste (principalmente os Estados de Mato Grosso, Bahia, Goiás e Mato Grosso do Sul), que juntas são responsáveis por aproximadamente 96% da produção nacional de algodão herbáceo.

2.2. O algodoeiro

O algodoeiro é uma angiosperma, pertence ao grupo de plantas dicotiledoneas, ordem Malvales, família Malvaceae, subtribo Hibisceas, gênero *Gossypium*. Possui elevada importância econômica e social sendo cultivado em mais de 100 países (BELTRÃO; SOUZA, 2006).

O gênero *Gossypium* compreende 50 espécies vegetais, porém apenas quatro são citadas na literatura como comerciais: *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L., *Gossypium arboreum* L. e *Gossypium herbaceum* L. (CARVALHO; CHIAVEGATO, 1999). As espécies foram domesticadas independentemente, entretanto, o local de origem não é conhecido havendo apenas centros de diversidade: México (18 espécies), África e Arábia (14 espécies) e Austrália (17 espécies) (BRUBAKER et al. 1999). Baseando-se na sequência de DNA analisada via marcadores ITS das espécies existentes há indícios de que o gênero surgiu cerca de 10 a 20 milhões de anos (SEELANAN et al., 1997; SILVA, 2008).

A espécie *Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch, a mais cultivada mundialmente, apresenta grande capacidade adaptativa a diferentes ambientes (OOSTERHUIS, 1999; CARVALHO, 1999; SALVATIERRA, 2008). Trata-se de uma planta de grande complexidade morfológica, possuindo particularidades importantes que são utilizadas na identificação da espécie dentro do gênero *Gossypium* e da família Malvaceae (SALVATIERRA, 2008).

O algodoeiro é uma planta ereta, anual ou perene, dotada de raiz principal cônica, pivotante, profunda, e com pequeno número de raízes secundárias grossas e superficiais. O caule herbáceo ou lenhoso tem altura variável e é dotado de ramos vegetativos (4 a 5 intraxilares, na parte inferior), e ramos frutíferos (extraxilares, na

parte superior). As folhas são pecioladas, geralmente cordiformes, de consistência coriácea ou não e inteiras ou recortadas (3 a 9 lóbulos) (SALVATIERRA, 2008).

No Brasil não existem dados precisos sobre efeitos somados de todas as doenças sobre a produção de pluma; há apenas relatos de danos decorrentes da ação de patógenos individualmente. Entretanto, como muitos patógenos da cultura ocorrem nas regiões produtoras, estima-se que as perdas sejam substanciais (CIA; SALGADO, 1995; MONTEIRO, 2007).

Diversos problemas de ordem fitossanitária têm afetado a cultura do algodoeiro no Brasil (CHIAVEGATO, 2001). De uma maneira geral, o algodoeiro é uma planta hospedeira de mais de 250 agentes patogênicos, já descritos na literatura. Entre eles destacam-se os fungos, vírus, bactérias e nematóides (SALVATIERRA, 2008). Na Tabela 1 encontram-se discriminadas em uma escala numérica as doenças mais importantes de ocorrência nas principais regiões produtoras do Brasil.

Tabela 1. Importância de doenças do algodoeiro em Estados produtores do Brasil

Doenças	Estados Produtores								
	Sul/Sudeste			Centro-Oeste			Norte		Nordeste
	PR	SP	MG	GO	MS	MT	RO	PA	Outros
Mancha Angular	4	3	3	3	3	4	3	5	4
Manchas Foliares	3	3	2	4	4	4	X	X	4
Mofo Branco	X	X	X	X	X	X	0	0	0
Mosaico das Nervuras	4	3	5	5	5	5	0	0	3
Murcha de Fusarium	4	5	3	3	3	3	0	0	3
Murcha de Verticilium	3	3	4	5	4	1	0	0	0
Murchamento Avermelhado	3	3	X	3	3	3	0	0	3
Nematóides	4	5	4	4	3	4	0	0	4
Podridão das Maçãs	2	2	4	5	4	4	0	0	4
Ramulária	3	3	4	4	4	5	3	3	4
Ramulose	4	3	4	4	4	5	5	3	3
Virose	0	X	X	X	X	X	0	0	X

Escala de notas: 1 = sem importância; 2 = pequena importância; 3 = medianamente importante, necessitando precauções e estudos; 4 = importante, demandando medidas de controle; 5 = muito importante, inviabilizando a cultura se não houver controle; X = presença detectada; - = presença não detectada. Adaptado de SALVATIERRA, 2008 e SILVA, 2008.

Dentre elas, a ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*), o mosaico das nervuras (*Vírus do Mosaico das Nervuras* - VMN), a mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) e as manchas foliares (*Alternaria macrospora*, *Alternaria alternata*, *Ramularia aréola*) são consideradas as mais importantes doenças que afetam o algodoeiro (CHIAVEGATO, 2001).

2.3. Ramulose do algodoeiro

A ramulose do algodoeiro é uma das principais doenças que vêm causando problemas nas principais regiões produtoras de algodão no Brasil. Foi constatada pela primeira vez no município de Rancharia, SP, em 1936 (KIMATI et al., 1997). Atualmente, a ramulose encontra-se disseminada em quase todos os Estados do Brasil onde se cultiva o algodão (SUASSUNA, 2005). Além de São Paulo e Paraná, também foi diagnosticada nos Estados de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Pará, Bahia, Goiás (CIA, 1997), Ceará (ARAÚJO et al., 1978), Mato Grosso do Sul (CIA; SALGADO, 1997) e em Minas Gerais (GAEIRAS, 1978). Segundo Barrocas (2008), na região Centro-Oeste sua incidência continua aumentando ao longo dos anos. Trata-se de uma doença restrita à América do Sul (LIMA et al., 1999; SUASSUNA et al., 2005), visto que fora do Brasil os únicos países onde também houve relato foram a Venezuela (MALAGUTI, 1955) e o Paraguai (MATHIESON; MANGANO, 1985).

Na Venezuela, a doença é conhecida por “witches broom”, devido à semelhança dos sintomas com aqueles característicos da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro e pela aparência de vassoura, induzida às plantas infectadas pela emissão de ramificações excessivas (MALAGUTI, 1955; WATKINS, 1981; SUASSANA, 2005).

O agente causal da ramulose é o fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), uma variedade fisiológica do agente causal da antracnose, *Colletotrichum gossypii* (Cg) (CIA; SALGADO, 1995).

Colletotrichum gossypii var. *cephalosporioides*, segundo o Index Fungorum - <http://www.IndexFungorum.org> (2012), pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo: Pezizomycotina, Classe: Sordariomycetes, Subclasse: Sordariomycetidae, Ordem: Incertae sedis, Família: Glomerellaceae, Gênero: *Colletotrichum*.

O gênero *Colletotrichum* foi descrito por Corba em 1983. Os fungos pertencentes a esse gênero são conhecidos como causadores da antracnose (BAILEY; JEGER, 1992), entretanto a variedade *cephalosporioides*, causadora do sintoma de superbrotamento, descrita por Costa & Fraga Jr. (1937) no Estado de São Paulo, não apresentava os sintomas da antracnose (BARROCAS, 2008). Além do algodoeiro cultivado, a ramulose também afeta outras espécies do gênero *Gossypium* (COSTA; FRAGA JR., 1939).

As condições favoráveis ao desenvolvimento do fungo são alta pluviosidade e boa fertilidade do solo. A temperatura ótima para o crescimento e desenvolvimento do

fungo *in vitro* está entre 25 e 30 °C (SANTOS et al., 1993; SANTOS, 1993; CIA; SALGADO, 1997).

Segundo Arndt (1944) a temperatura ótima para a infecção em campo encontra-se ao redor de 22°C, sendo que temperaturas abaixo de 18°C e acima de 36°C são limitantes.

Cia e Salgado (1997) afirmaram que a doença pode se manifestar em plantas de qualquer fase, desenvolvendo-se de preferência em tecidos jovens da planta. Porém, quando presente em plantas em fase mais avançada (a partir da fase de florescimento) de desenvolvimento, é chamada de ramulose tardia, que não causa tantos prejuízos à produção e qualidade das fibras (ABRAHÃO, 1961; JULIATTI & RUANO, 1997; SUASSUNA; 2005).

Os conídios de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* são formados em conidióforos curtos nos acérvulos, onde permanecem aderidos devido a uma matriz gelatinosa que os une, sendo a dispersão dos mesmos, nessa situação, realizada por ação de respingos de chuva. Os conídios também são produzidos em extremidades das setas, o que pode facilitar a dispersão do patógeno pelo vento. Como consequência, estes conídios podem atingir plantas mais distantes do que os conídios transportados pela água (TANAKA et al., 1996). A patogenicidade de isolados pode estar relacionada com a sua capacidade de esporulação em meio de cultura (TANAKA & MENTEN, 1992; LIMA, 1981; SUASSUNA, 2005).

Os sintomas (Figura 1) aparecem primeiramente nas folhas jovens, tanto na haste principal como nas laterais, na forma de manchas necróticas, mais ou menos circulares quando situadas no limbo entre as nervuras, e alongadas quando no sentido longitudinal. O tecido necrosado tende a cair, formando perfurações. As lesões, principalmente das nervuras, acarretam o desenvolvimento desigual dos tecidos foliares, ocasionando o enrugamento da superfície do limbo. O fungo afeta o meristema apical provocando sua necrose, o que estimula o desenvolvimento dos brotos laterais que se transformam em “ramos extranumerários”, conferindo à planta um aspecto de superbrotamento ou envassouramento. Os internódios, via de regra, apresentam intumescimento e as plantas doentes ficam com porte reduzido (PAIVA; ASMUS; ARAÚJO, 2001).

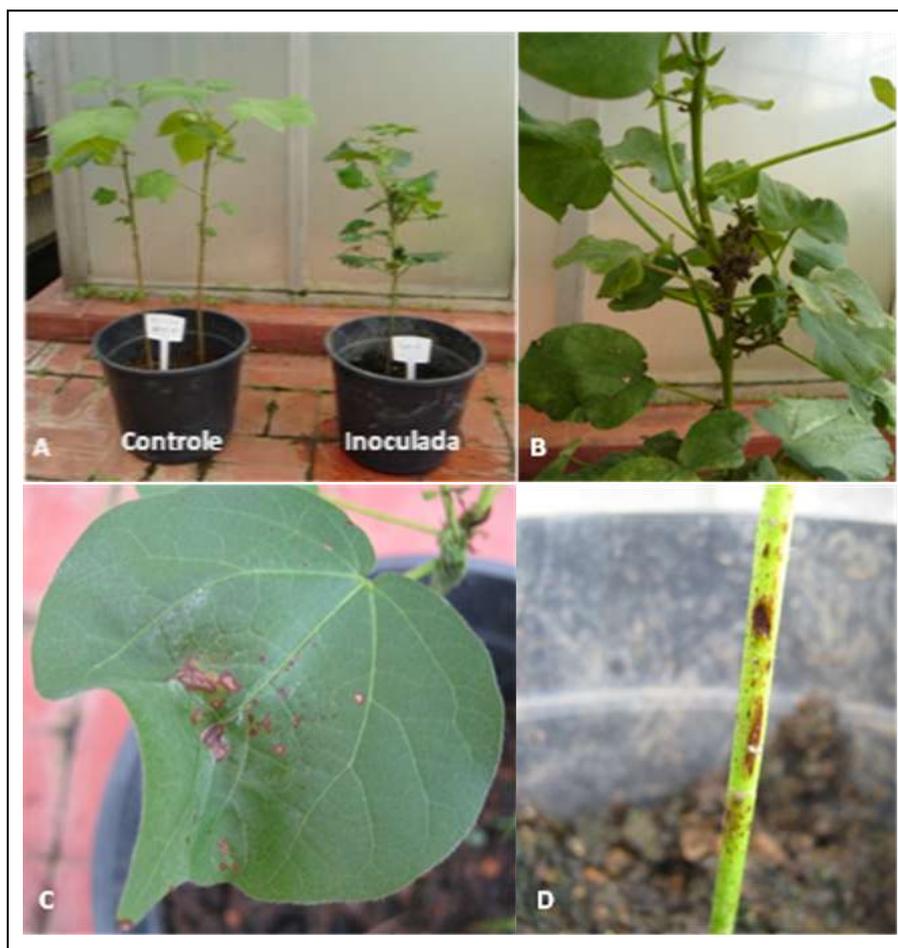


Figura 1. Sintomas característicos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*: redução de tamanho (A), superbrotamento ou envassouramento (B), manchas necróticas e enrugamento da superfície do limbo da folha (C) e manchas necróticas na haste (D).

Quando a doença afeta plantas novas, as gemas terminais dos ramos extranumerários podem sofrer novas infecções e, pela sua morte, estimulam o desenvolvimento de novas gemas. Esse carrear de energias para o crescimento vegetativo em resposta à sucessiva destruição das gemas apicais exaure a planta prejudicando a frutificação. Plantas doentes podem ser facilmente distinguidas das saudáveis, pois estas derrubam as folhas e apresentam grande número de capulhos, ao passo que as plantas doentes apresentam densa massa de folhagem escura e poucos capulhos. Normalmente, observam-se na parte inferior de plantas com muitos sintomas algumas folhas mais desenvolvidas, de coloração verde mais escura e aspecto coriáceo ou quebradiço (CIA; SALGADO, 1995).

Os dados das perdas ocasionadas por essa doença são poucos e inconsistentes. Alguns autores relataram prejuízos severos ocasionados pela ramulose, da ordem de 20 a 30%, podendo chegar em 85% em casos mais extremos (ABRAHÃO, 1949; ABRAHÃO, 1961; CARVALHO et al., 1984; SUASSUNA, 2005).

Esses prejuízos estão diretamente relacionados à suscetibilidade da cultivar, da idade da planta afetada e das condições climáticas (FREIRE et al., 1997). Se houver distribuição generalizada da doença no campo as perdas podem ser totais (COSTA; FRAGA, 1937; SUASSUNA, 2005).

Segundo Carvalho et al. (1984), as características mais afetadas do algodoeiro em função de altas infestações são a produtividade, o peso do capulho, comprimento, uniformidade e finura da fibra e o peso das sementes.

A principal via de disseminação do *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* é através de sementes, nas quais o patógeno pode ser veiculado externamente na forma de conídios e internamente na forma de micélio dormente (ABRAHÃO, 1949; TANAKA, 1990; TANAKA, 1991; PIZZINATO et al., 1994; CIA; SALGADO, 2005). A presença deste fungo em sementes foi constatada já no final da década de 30, em trabalho publicado por Costa (1939).

As sementes têm um papel fundamental no estabelecimento da doença na lavoura. É através da utilização de sementes contaminadas que o fungo é introduzido em novas áreas (GOULART, 2001). Em condições normais de armazenamento, o fungo pode permanecer viável no interior da semente, com o micélio dormente por até três anos (KIMATI, 1980), mas Machado (1988) relatou que o mesmo pode permanecer viável nestas condições por até cerca de treze anos.

As medidas recomendadas para o controle da doença são: a utilização de cultivares resistentes (CAVALHO et al., 1984; CIA; SALGADO, 1997), a utilização de sementes livres do patógeno (MACHADO, 1988; MENTEN, 1986; NEERGAARD, 1979; CIA; SALGADO, 1997); tratamento das sementes contaminadas com fungicidas (PAIVA et al., 2001), rotação de culturas, além de outras medidas que funcionam preventivamente, como inspeção periódica do campo para erradicação de plantas doentes e a pulverização de plantas saudáveis adjacentes às plantas doentes. Dentre essas, a mais usada é a utilização de sementes livres de patógenos.

2.4. Técnicas rotineiras para detecção e identificação de fungos em sementes

A medida mais efetiva de controle de doenças, quando se trata de patógenos transmitidos por sementes, emprega o princípio de exclusão, baseando-se na prevenção da entrada e estabelecimento de um patógeno em uma área (NEEGAARD, 1977; SCHAAD et al., 1997; 2003; FREDERICK, 2002; WALCOTT, 2003;

BARROCAS, 2008). Para que essa medida tenha sucesso, o uso de sementes sadias é um fator da extrema importância, já que a maioria das culturas utiliza-se de sementes como material propagativo (BARROCAS, 2008).

Para isso, a correta diagnose dos patógenos é uma das ferramentas básicas no controle de doenças transmitidas por sementes (SCHAAD et al., 1997). Diversos estudos têm sido desenvolvidos nessa linha, investigando metodologias que auxiliem na correta detecção, identificação e até quantificação de patógenos, utilizando diferentes métodos, combinados entre si ou não (EBBELS, 2003). Uma vez que os resultados sejam consistentes e a metodologia esteja estabelecida, poderá então ser utilizada em testes de rotina com confiabilidade, gerando o mesmo resultado em diferentes laboratórios de análise. Análises de sementes em rotina requerem métodos confiáveis para a implementação em programas de certificação de qualidade (BARROCAS, 2008).

Os critérios utilizados para detecção de fungos em sementes seguem basicamente as mesmas regras aprovadas pela “*International Seed Testing Association*” (ISTA), que consistem em estimular os microrganismos a produzir estruturas que permitam a sua identificação, no caso dos fungos as estruturas conidiogênicas e os conídios (BARROCAS, 2008).

Os métodos mais comumente utilizados em laboratórios de patologia de sementes para análises de rotina e detecção de fungos fitopatogênicos são: inspeção visual das sementes, exame da suspensão de lavagem das sementes, incubação em substrato de papel ou método do papel de filtro (“blotter test”) e plaqueamento em meio sólido, BDA ou MEA (BRASIL, 2009).

Estes métodos, apesar de padronizados em laboratórios de patologia de sementes como testes de rotina, são limitados quando existe a necessidade de uma diagnose específica em nível de espécie, subespécie ou variedade (BARROCAS, 2008; IACOMI-VASILESCU et al., 2002; KONSTANTINOVA et al., 2002; TAYLOR et al., 2001; BATES et al., 2001; GUILLEMETTE et al., 2001; XIA; ACHAR, 2001; JONSSON et al., 2000; SHI et al., 1996; ASSIGBETSE et al., 1994; TANAKA, 1995; VIEIRA, 1996; TANAKA; MENTEN, 1988). Isso, mais a carência de recursos humanos com treinamento adequado para detecção e identificação de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes, são fatores que facilitam a introdução e disseminação deste fitopatógeno no ambiente. No Brasil existem poucos laboratórios de sanidade de sementes que possuem equipamentos adequados e pessoas treinadas para a identificação de fungos em nível infraespecífico.

Ao utilizar métodos rotineiros de patologia de sementes *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pode ser confundido com *Colletotrichum gossypii*,

agente causal da antracnose, já que ambos são transmitidos via sementes e sua distinção morfológica é extremamente difícil e inconsistente (MEHTA *et al.*, 2001).

2.5. Diferenciação entre *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii*

Ao compararmos os sintomas causados por estes patógenos, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii*, eles se mostram distintos (COSTA; FRAGA JÚNIOR, 1937). *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, responsável pela ramulose, ataca toda a parte aérea da planta, provocando severos danos no rendimento do algodão, o causador a antracnose, *Colletotrichum gossypii*, ataca o sistema radicular das plântulas e os frutos (maçãs), porém normalmente não causa danos econômicos para a cultura (MEHTA; MEHTA, 2010).

Os sintomas descritos para *Colletotrichum gossypii* (Figura 2) são de amarelecimento das folhas e lesões escuras e deprimidas nas maçãs do algodoeiro, envolvendo todo o fruto (BITANCOURT, 1935; PIZZINATO, 1987; DUDIENAS, 1990; TEIXEIRA, 1995, BARROCAS, 2008).

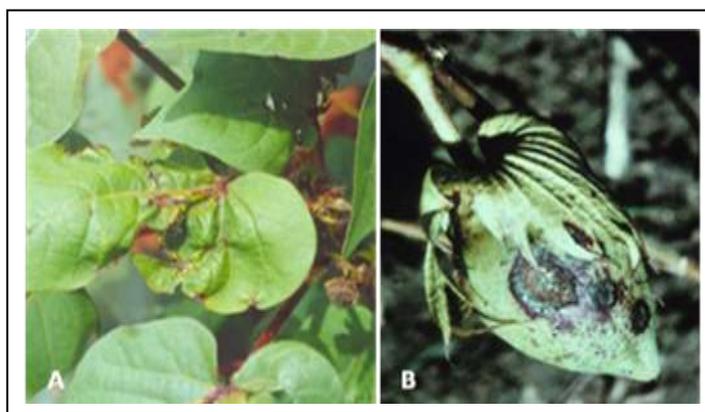


Figura 2. Sintomas característicos de *Colletotrichum gossypii*: amarelecimento das folhas (A) e lesões escuras e deprimidas nas maçãs do algodoeiro (B). Fontes: <http://br.viarural.com/> / <http://ecoport.org>

A disseminação de ambos os patógenos mencionados ocorrem principalmente pela semente. Muitas vezes a diagnose em testes de rotina não é precisa e os resultados são relativos somente a *Colletotrichum gossypii*, sem que se especifique qual é a variedade do patógeno (CHITARRA, 1996; BARROCAS, 2008).

Apesar da diferença na sintomatologia mencionada e dos critérios morfológicos distintos, observa-se intensa variação entre os isolados, inclusive de

patogenicidade, e nem sempre se consegue definir quais são os patógenos envolvidos (DUDIENAS, 1990; TANAKA, 1990; CHITARRA, 1996, IAMAMOTO, 2002, SILVA-MANN, 2002).

A precisão na identificação entre *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* é necessária para que apenas os lotes de sementes livres de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* sejam liberados para o plantio (MEHTA et al., 2001).

Com o objetivo de resolver esse problema, muitos estudos foram desenvolvidos visando à diferenciação e diagnose precisa entre os dois agentes, mas até o momento não houve consistência de resultados.

Em 1992, Ottonello estudou as características culturais, patogênicas e sorológicas de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, sugerindo a nomenclatura raça 1 para os isolados não associados à morte de ápices e raça 2 para isolados associados ao sintoma de superbrotamento, ou seja, os causadores de ramulose. Entretanto, isso não pode ser adotado uma vez que não existem cultivares definidos para a diferenciação de raças e nem trabalhos moleculares que sugiram essa diferença.

Em 1993, Dudienas e Kimati, em testes visando à caracterização auxanográfica observaram que os dois patógenos diferiram quanto ao requerimento de alguns aminoácidos: o agente causador de ramulose apresentou deficiência nos aminoácidos asparagina ou ácido aspártico e o da antracnose não apresentou essa deficiência, porém não consideraram segura sua diagnose devido a grande variabilidade dos isolados.

A diagnose com base no hábito de crescimento em sementes de algodoeiro nem sempre satisfaz os critérios recomendados por Tanaka et al. (1996) e Chitarra (1996), que encontraram resultados variáveis quanto à distinção de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Carvalho et al. (1997), para diferenciar os fungos *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, realizaram análises de isoenzimas de isolados em cultura pura dos dois fungos. Dentre os cinco sistemas enzimáticos testados, os perfis de esterase, fosfatase ácida e peroxidase permitiram distinguir os isolados *Colletotrichum gossypii* de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Nesse sentido, o desenvolvimento de um método para detecção e diferenciação da var. *cephalosporioides* em sementes de algodão seria de grande valia para a diagnose destes patógenos em laboratórios de rotina, resultando na comercialização de sementes de boa qualidade sanitária, com reflexos positivo no controle dessa doença e para uma boa produtividade de grãos ou de sementes.

A utilização de técnicas moleculares pode ser bastante promissora para solucionar os problemas metodológicos na detecção e diferenciação de patógenos em sementes.

Na área de biologia molecular, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de estudar taxonomia, variabilidade genética e detecção de fungos fitopatogênicos, empregando-se técnicas moleculares como PCR, RAPD e RFLP, bem como os métodos imunológicos e enzimáticos (BATISTA, 1993). Todas essas técnicas fundamentam-se na análise direta ou indireta da composição ou na seqüência dos ácidos nucleicos para identificação e caracterização de organismos e características genéticas de interesse.

Dentre as técnicas acima mencionadas, a técnica PCR é considerada a mais adequada para a diagnose devido à sua especificidade (NEALE et al., 1992; SCHILLING et. al. 1996).

Essa técnica revolucionou a biologia molecular e associada a outras técnicas ainda é promissora para a diagnose de patógenos em geral (SCHAAD et al., 1997; HENSON; FRENCH, 1993; LÉVESQUE, 2001; BRIDGE, 2002; SCHAAD; FREDERICK, 2002; PASQUALI et al., 2004; SCHENA et al., 2004).

Para a PCR, os iniciadores são desenhados para anelar em regiões específicas do DNA do organismo alvo, reproduzindo assim milhões de cópias de uma determinada região e o DNA amplificado pode ser observado por meio de eletroforese.

Esta reação consiste em três passos chave: fase de desnaturação da dupla fita de DNA em alta temperatura, geralmente em temperaturas de 94 a 96 °C; fase de anelamento, na qual o par de oligonucleotídeos iniciadores se liga à seqüência complementar na fita de DNA; e, finalmente, a fase de extensão da fita de DNA (CHEN; JANES, 2002).

O uso de técnicas moleculares que exploram as variações na seqüência de nucleotídeos no gene que codifica o DNA ribossomal (DNAr) e os espaços intergênicos, fez com que ocorresse, na última década, progresso no estudo da ecologia de fungos (PINHEIRO, 2004; ANDERSON; PARKIN, 2007).

Existem diversas regiões do DNAr que ao serem estudadas, podem permitir a distinção entre microrganismos, entre elas a regiões ITS e Beta-tubulina são as mais utilizadas.

A região ITS encontrada no genoma é mais conservada quanto a outras regiões do DNAr. Dessa maneira, ela é muito mais eficiente na identificação de microrganismos em nível específico (ANDERSON; CAIRNEY, 2004; PINHEIRO, 2004; ANDERSON; PARKIN, 2007). As regiões com níveis mais altos de mutações são indicadas para a diferenciação entre as espécies. Por isso, é necessário o

sequenciamento de mais de uma região genômica, já que elas são complementares no processo de identificação (MACIEL, 2012).

Devido à sua especificidade e sensibilidade, a PCR é um método importante para a identificação de fungos. A identificação molecular em nível de espécie tem sido baseada, na maioria das vezes, no uso da região ITS do DNA ribossômico (Figura 3). O DNA que codifica para o RNA ribossomal apresenta-se em *cluster* gênico, no qual se tem o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S. Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro. O fato desse *cluster* gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. A região ITS1 foi descrita por possuir uma rápida evolução e a região ITS2 uma evolução moderada rápida a rápida. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, a serem relativamente curtas (500 a 800 pb) e aparecem em grande número de cópias no genoma, permitem que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Como consequência disso, é grande o número de sequências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos (FUNGARO, 2000; MICHAELSEN et al., 2006).

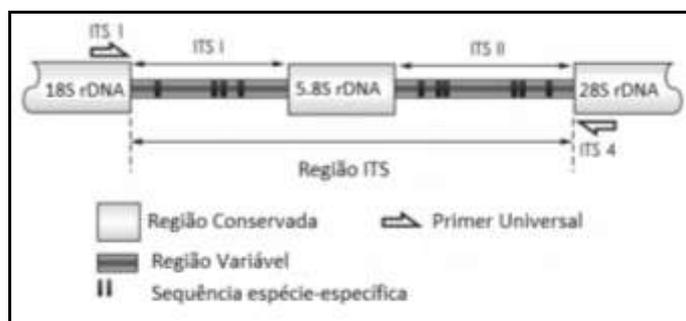


Figura 3. Esquema da região ITS que inclui ITS1, ITS2, 5.8 DNA e os iniciadores universais ITS1 e ITS4. Fonte: Lopes, 2011.

Além da região ITS, o gene Beta-tubulina também é muito utilizado para diagnóstico fúngico. Entretanto, os bancos de dados para sequências desse gene não são tão abundantes quanto do DNA ribossomal (BRUNNER et al., 2007). Esses genes estão recebendo maior atenção na investigação de relações evolutivas, pois as tubulinas apresentam alto grau de conservação em nível de aminoácidos e nucleotídeos, porém um alto grau de variabilidade nas regiões intrônicas (EINAX; VOIGT, 2003; LOPPNAU; BREUIL, 2003). As posições dos íntrons dentro dos genes

Beta-tubulina podem fornecer algumas pistas a respeito das relações evolutivas entre as espécies (MSISKA; MORTON, 2009). Além disso, genes codificantes de proteínas acumulam poucas mutações e são menos variáveis entre as poucas cópias que a maioria dos genomas contém (EINAX; VOIGT, 2003). Na figura 4 está demonstrada a estrutura genômica do gene Beta-tubulina de *Neurospora crassa*.

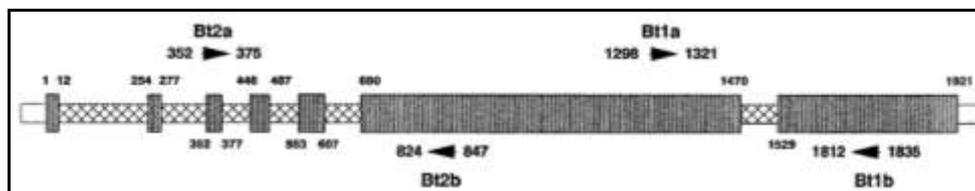


Figura 4. Estrutura genômica do gene Beta-tubulina de *Neurospora crassa*. As regiões sombreadas denotam éxons e as regiões com traços denotam íntrons. As regiões brancas denotam sequências em torno da região codificadora de proteína de cada gene. Bt2a e b, Bt1a e b são pares de iniciadores comumente utilizados para a identificação de fungos (GLASS; DONALDSON, 1995).

Uma das mais importantes bases de dados para a classificação de fungos é o GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy), do National Center for Biotechnology Information (NCBI) em colaboração com laboratórios internacionais que reúne sequências de mais de 100.000 organismos distintos. Além do GenBank, outras bases de dados fornecem informações relativas às sequências de microrganismos, como o o Index Fungorum (www.indexfungorum.org), o MycoBank (www.mycobank.org), entre outras.

Sutton (1992), ao comparar *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii* com *Colletotrichum gloeosporioides* molecularmente, afirmou que estes apresentam grande similaridade entre si. Bailey et al. (1996) analisaram sequências de nucleotídeos do DNAr de várias espécies de *Colletotrichum* que infectam plantas da família *Malvaceae*, e verificaram que isolados obtidos de algodão (*Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) são muito similares entre si e entre diversas formas de *Colletotrichum gloeosporioides*. Os autores concluíram que não é apropriado considerar *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* como espécies distintas de *Colletotrichum gloeosporioides* e propuseram que *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* fossem considerados como *formae speciales* de *Colletotrichum gloeosporioides*, propondo a nomenclatura de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *gossypium*. Entretanto, Suassuna (2005) considerou a proposta inadequada, pois não permite distinguir entre o agente causal da ramulose e da antracnose do algodoeiro.

Estudos moleculares sobre variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* em algodoeiro foram realizados, na maioria, baseados em polimorfismo de fragmentos amplificados aleatoriamente - RAPD (CHITARRA, 1996; VIEIRA, 1996, MEHTA et al., 2001; SILVA-MANN et al., 2002, 2005) e padrões isoenzimáticos (VIEIRA, 1996; CARVALHO et al., 1999). Portanto, com informações pouco conclusivas, principalmente quando se visa o desenvolvimento de iniciadores específicos.

Mehta et al. (2001), utilizando técnica molecular de ERIC-, REP-PCR, não conseguiram distinguir os isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

Silva-Mann et al. (2002), realizaram um trabalho com o objetivo de associar as informações do teste de patogenicidade com os marcadores bioquímicos e moleculares de DNA/RAPD, visando à identificação e diferenciação do complexo *Colletotrichum*. Foram usados dez isolados, sendo três classificados como causadores de antracnose (*Colletotrichum gossypii*) e sete de ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) pelo teste de patogenicidade. Os marcadores bioquímicos não se mostraram eficientes para a distinção dos isolados causadores da ramulose e da antracnose. Na análise de RAPD, o valor de similaridade encontrado para os dois grupos confirma a potencialidade da técnica para diferenciar tais fungos.

Carvalho (2005) não conseguiu diferenciar isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Colletotrichum gossypii* com base em estudos das regiões ITS1, ITS2 e 5,8S do DNA ribossomal.

Silva-Mann et al. (2005) estudaram a variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* utilizando a técnica de AFLP e indicaram a potencialidade desse método para a distinção entre as variedades.

Araújo et al. (2005) analisaram a variabilidade fisiológica de nove isolados de Cgc obtidos de diferentes regiões produtoras do Estado de Mato Grosso por meio de análise de RAPD. As distâncias genéticas entre os isolados foram de pequena magnitude, indicando pouca variabilidade entre os mesmos e não permitindo a separação dos isolados em diferentes grupos. Isto indica que os isolados devem fazer parte de uma mesma população genética.

Mehta e Mehta (2010) avaliaram a variabilidade genética da região ITS DNAr entre *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* através das técnicas moleculares RAPD, ERIC- e REP-PCR e PCR-RFLP. Com a técnica de RAPD foram utilizados oito iniciadores randômicos, os quais revelaram dois grupos distintos, o primeiro sendo formado por 94% dos isolados de sementes e o segundo

por 95% dos isolados de folhas. Na análise ERIC- e REP-PCR, os resultados foram semelhantes aos de RAPD. Quanto aos resultados de PCR da região ITS, foi obtido um perfil de bandas semelhantes para todos os isolados, não sendo possível a diferenciação entre as variedades.

Para detecção e identificação de fungos patogênicos em seu hospedeiro, diversos estudos foram realizados utilizando a técnica PCR, associada ou não a outras técnicas, para *Verticillium tricorpus* em batata (MOUKHAMEDOV et al., 1994); *Stagnospora nodorum*, *Septoria trici*, *Microdochium nivale* var. *nivale*, *Microdochium nivale* var. *majus*, *Pseudoscerospora herpotrichoides* (R-type) e *P. herpotrichoides* (W-type) e *Rhizoctonia cerealis* em trigo (BECK; LIGON, 1995; NICHOLSON et al., 1996; NICHOLSON; PARRY, 1996); *Phytophthora infestans* em batata e tomate (TROUT et al., 1997); *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia oryzae* e *Rhizoctonia oryzae-sativae* em arroz (JOHANSON et al., 1998); *Phaeoisariopsis griseola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (GUZMÁN et al., 1999; ALVES-SANTOS et al., 2002; WANG et al., 2008); *Stenocarpella maydis* em milho (XIA; ACHAR, 2001); *Phakospora pachyrhizi*, *Phakospora meibomia*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum truncatum* em soja (FREDERICK et al., 2002; CHEN et al., 2006); *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo (PASQUALI et al., 2004); *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Phytophthora boehmeriae* em algodão (MORICCA et al., 1998; ZAMBOUNIS et al., 2007; SHEN et al., 2005).

Para a patologia de sementes, a técnica de PCR associada ou não a outras técnicas têm sido utilizada com sucesso para a diagnose de fungos patogênicos em sementes. Diversos trabalhos foram realizados para detecção de *Fusarium poae*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearum* – grupo 2 em sementes de trigo e centeio (PARRY; NICHOLSON, 1996; SCHILLING et al., 1996); *Tilletia indica* e *Tilletia walkeri* em sementes de trigo (SMITH et al., 1996; FREDERICK et al., 2000); *Diaporthe phaseolurum*, *Phomopsis longicolla* e *Diaporthe phaseolurum* var. *meridionalis* em sementes de soja (ZHANG et al., 1999; VECHIATO et al., 2006); *Alternaria radicina*, *Alternaria alternata* e *Alternaria dauci* em sementes de cenoura (PRYOR; GILBERTSON, 2001; KONSTANTINOVA et al., 2002); *Pyrenophora graminea*, *Pyrenophora teres* e *Rhynchosporium secalis* em sementes de cevada (TAYLOR et al., 2001; BATES et al., 2001; LEE et al., 2001); *Ascochyta rabiei* em sementes de grão-de-bico (PHAN et al., 2002); *Alternaria brassicicola*, *Alternaria japonica* e *Alternaria brassicae* em sementes de crucíferas (IACOMI-VASILESCU et al., 2002; GUILLEMETTE et al., 2004); *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*) em sementes de arroz (CHADHA; GOPALAKRISHNA, 2006); *Fusarium oxysporum* f. sp.

basílica em sementes de manjeriço (PASQUALI et al., 2006); *Plasmopara halstedii* em sementes de girassol (IOOS et al., 2007); *Botrytis aclada*, *Botrytis allii* e *Botrytis byssoidea* em sementes de cebola (CHILVERS et al., 2007); *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (CHEN et al., 2007).

Apesar da grande sensibilidade da técnica de PCR convencional, os projetos envolvendo a diagnose de patógenos associados às sementes encontram dificuldades na detecção de patógenos em sementes quando estes estão em baixos níveis de infestação/infecção (KONSTANTINOVA et al., 2002). Además, devido à presença de inibidores como taninos, compostos fenólicos, carboidratos que podem inibir a amplificação da PCR quando a extração é feita diretamente na semente, resultando em falso negativo (DEMEKE; ADAMS, 1992; PHAN et al., 2002; BARROCAS, 2008).

Para tentar solucionar esses problemas alguns autores optaram pela utilização da BIO-PCR, que tem como objetivo enriquecer a biomassa do fungo na semente, para aumentar a sensibilidade da técnica (PRYOR; GILBERTSON, 2001), envolvendo assim etapas como extração da amostra, plaqueamento no meio de cultura, incubação em papel de filtro, entre outros, para a retirada da biomassa (BARROCAS, 2008).

A BIO-PCR possui vantagens sobre a PCR convencional incluindo o aumento de sensibilidade e detecção somente de células viáveis, mas possui desvantagens como o aumento do tempo para diagnose e a necessidade de determinação do tempo de enriquecimento. O longo tempo de incubação pode permitir o crescimento de organismos saprófitos que podem interferir na detecção do organismo alvo. (SCHAAD et al.1997; PRYOY; GILBERTSON, 2001; JACCOUD et al., 2002; WALCOTT, 2003; DOMBROWSKI et al., 2006; BARROCAS, 2008).

A presença de inibidores, tais como compostos fenólicos, taninos, entre outros, sempre será um problema para a diagnose de patógenos em semente via PCR. Para tentar solucionar esse problema, reagentes como clorofórmio e fenol são recomendados para a precipitação de alguns inibidores (WALCOTT, 2003), assim como também o uso de kits para extração de DNA de sementes (GUILLEMETTE et al., 2004).

Muitos desafios ainda existem para a detecção de patógenos de sementes via testes moleculares. Primeiro é importante que os iniciadores utilizados sejam absolutamente específicos para o patógeno de interesse e não devem amplificar espécies proximamente relacionadas, ou seja, devem ser confeccionados para uma única seqüência do DNA do patógeno alvo (SCHAAD et al., 2003). A presença de inibidores em sementes deve ser minimizada por meios de ajuste de metodologias para cada patossistema.

Normalmente as técnicas de análise molecular são desenvolvidas utilizando culturas puras para identificar espécies ou genótipos dentro de populações (MARTIN, et al. 2000). Para patologia de sementes, a utilização de quaisquer técnicas moleculares só tem sentido se houver o seu desenvolvimento para detecção diretamente na semente, já que pouco se ganha em termos de diagnose, quando existe a necessidade de isolamento do patógeno em cultura pura para posterior detecção.

O uso das ferramentas moleculares representa um grande avanço na diagnose de patógenos transmitidos por sementes. A detecção precisa e rápida de fungos e de outros microrganismos patogênicos em sementes de plantas cultivadas, é de extrema relevância, considerando-se que o controle de importantes doenças pode ser alcançado com sucesso por meio do manejo sanitário preventivo, no qual o uso de sementes saudáveis, ou tratadas, é uma alternativa eficaz e de custo relativamente baixo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de execução

Os experimentos foram realizados no Instituto Biológico (São Paulo), nos Laboratórios de Patologia de Sementes e de Bioquímica Fitopatológica e na casa de vegetação do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal.

3.2. Obtenção e preservação de isolados

Para a realização dos estudos, foram obtidos 44 isolados, sendo 24 da espécie de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), três de *Colletotrichum gossypii* (Cg), nove de *Colletotrichum* de outras espécies (C), *Colletotrichum trichillum* (C1), *Colletotrichum gloeosporioides* (C2), *Colletotrichum lindemuthianum* (C3), *Colletotrichum boniense* (C4), *Colletotrichum fragariae* (C5), *Colletotrichum coffeanum* (C6), *Colletotrichum acutatum* (C7), *Colletotrichum falcatum* (C8) e *Colletotrichum graminicola* (C9), e oito outras espécies que afetam o algodoeiro (A), *Rhizoctonia solani* (A1), *Roselinia* sp. (A2), *Macrophomina phaseolina* (A3), *Verticillium dahliae* (A4), *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (A5 ao A7) e *Fusarium solani* (A8) (Tabela 2).

Os isolados foram cedidos pelos pesquisadores: Dra. Christiane Ceriani Aparecido, - Micoteca Mario Barreto Figueiredo, Instituto Biológico de São Paulo – São Paulo/SP (Cgc1 e Cgc2, C1 ao C9 e A1 ao A5), Dra. Margarida Fumiko Ito – Instituto Agrônomo de Campinas – Campinas/SP (Cgc3 ao Cgc10 e A6 ao A8), Dra. Aparecida de Souza Tanaka, Instituto Agrônomo de Campinas (Cgc11 ao Cgc13 e Cg1 ao Cg3), Dr. Alderi Emídio de Araújo, CNPA/EMBRAPA – Capina Grande/PB (Cgc14 ao Cgc19), M.Sc Augusto César Pereira Goulart, EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE – Dourados/MS (Cgc20) e Dr. Yeshmant Ramchandra Mehta, Instituto Agrônomo do Paraná/IAPAR – Londrina/PR (Cgc 21 ao Cgc24).

Tabela 2. Lista de isolados obtidos para os estudos morfológicos e moleculares.

Número	Isolados	Nome Científico	Procedência
Cgc 01	IB 246	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Campinas / SP
Cgc 02	IMUR 155	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Recife / PE
Cgc 03	IAC 12481	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Baús / MG
Cgc 04	IAC 13351	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Piracicaba / SP
Cgc 05	IAC 12507	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Palmeiras de Goiás / GO
Cgc 06	IAC 11326	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Piracicaba / SP
Cgc 07	IAC 11682	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Viçosa / MG
Cgc 08	IAC 11325	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Piracicaba / SP
Cgc 09	IAC 12805	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Montevideu / Uruguai
Cgc 10	IAC 13350	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Piracicaba / SP
Cgc 11	IAC CR6	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Conchal / SP
Cgc 12	IAC CR2	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Uberaba / MG
Cgc 13	IAC CR1	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Uberaba / MG
Cgc 14	CNPa 0070	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Campina Grande / PB
Cgc 15	CNPa 0086	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Campina Grande / PB
Cgc 16	CNPa 0150	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Campina Grande / PB
Cgc 17	CNPa 0107	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Campina Grande / PB
Cgc 18	CNPa 0116	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Campina Grande / PB
Cgc 19	CNPa 0134	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Campina Grande / PB
Cgc 20	CNPa Oeste	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Dourados / MS
Cgc 21	08	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Coleção Dr. Mehta
Cgc 22	09	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Coleção Dr. Mehta
Cgc 23	10	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Coleção Dr. Mehta
Cgc 24	11	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Coleção Dr. Mehta
Cg 01	IAC CA 5393	<i>Colletotrichum gossypii</i>	Santa Cruz do Rio Pardo / SP
Cg 02	IAC CA5	<i>Colletotrichum gossypii</i>	Piraporazinho
Cg 03	IAC CA1	<i>Colletotrichum gossypii</i>	Piracicaba / SP
C 01	MMBF 05/96	<i>Colletotrichum trichillum</i>	São Paulo / SP
C 02	MMBF 04/08	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	São Paulo / SP
C 03	MMBF 22/09	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	-
C 04	MMBF 19/10	<i>Colletotrichum boniense</i>	Bauru / SP
C 05	MMBF 845	<i>Colletotrichum fragariae</i>	Piedade / SP
C 06	MMBF 11/74	<i>Colletotrichum coffeanum</i>	Ribeirão Preto / SP
C 07	MMBF 49/09	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Botucatu / SP
C 08	MMBF 12/05	<i>Colletotrichum falcatum</i>	-
C 09	MMBF 02/89	<i>Colletotrichum graminicola</i>	Sete Lagoas / MG
A 01	MMBF 416	<i>Rhizoctonia solani</i>	ESALQ
A 02	MMBF 03/80	<i>Roselinia</i> sp.	IAPAR
A 03	MMBF 809	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Mogi-Mirim / SP
A 04	MMBF 413	<i>Verticillium dahliae</i>	-
A 05	INTA 576	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	Castelar / Argentina
A 06	IAC 12344	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	Tocantins / GO

A 07	IAC 21-4	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	Capão Bonito / SP
A 08	IAC 8450	<i>Fusarium solani</i>	Guaíra / SP

Cgc - *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, Cg - *Colletotrichum gossypii*, C – outras espécies de *Colletotrichum* e A - outras espécies de patógenos que afetam o algodoeiro.

Todos os isolados obtidos foram transferidos para placas de Petri contendo o meio BDA (batata-dextrose-ágar) e incubadas a 24 °C no escuro para que se desenvolvessem e as características morfológicas fossem avaliadas. Após sete dias, foram realizadas observações microscópicas que possibilitaram confirmar a identificação dos isolados.

As culturas foram preservadas em tubos de ensaio contendo BDA e em água destilada esterilizada, método de Castellani (FIQUEIREDO, 1967) para evitar perdas durante a execução do projeto. Pequenos discos (sete milímetros) do meio de cultura com o fungo foram transferidos para frascos de vidro contendo aproximadamente 4 mL de água destilada esterilizada. Após a transferência dos discos para os frascos, estes foram fechados com uma rolha de borracha previamente esterilizada e permaneceram, durante alguns dias, sob observação, para que fosse verificada a ocorrência de possíveis contaminações bacterianas. Não havendo tais contaminações, os frascos foram lacrados para evitar a perda d'água e acondicionados a 10 °C. Para cada um dos isolados foram preparados dois frascos e dois tubos.

3.3. Teste de patogenicidade

Para o teste de patogenicidade os isolados foram repicados para quatro placas de Petri contendo BDA e foram incubadas em câmara BOD por 10 dias a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas.

Após o crescimento micelial dos fungos, foram preparadas suspensões com os conídios, acrescentando-se 25 mL de água destilada às placas e, friccionando-se o micélio para liberação das estruturas de forma asséptica. As suspensões foram ajustadas para a concentração de 10^6 conídios/ mL com o auxílio de um microscópio óptico e uma câmara Neubauer (hematocitômetro), seguindo-se o método descrito por Barrocas (2008).

Em casa de vegetação, as inoculações foram realizadas em plântulas de algodão do cultivar Fibermax 966, após apresentarem as primeiras folhas verdadeiras (aproximadamente 20 dias após a emergência). Todas as partes das plântulas foram inoculadas com suspensões de conídios (incluindo a gema apical), utilizando-se o

método de pincelamento da suspensão nos locais pré-estabelecidos. Cada plântula foi protegida com sacos plásticos durante as primeiras 24 horas do período de condução dos experimentos (BARROCAS, 2008).

Plântulas testemunhas foram inoculadas com água destilada e mantidas da mesma forma que as plântulas inoculadas com os esporos.

As plântulas permaneceram em casa de vegetação até o aparecimento dos sintomas de infecção, como redução de tamanho, superbrotamento ou envassouramento, manchas necróticas e enrugamento da superfície do limbo da folha e manchas necróticas na haste. Após visualização e registro dos sintomas, o patógeno foi submetido ao re-isolamento para confirmação da sua identidade, concluindo assim as etapas do Postulado de Koch.

3.4. Caracterização micelial

Os experimentos para a caracterização do crescimento e coloração micelial foram realizados utilizando-se a seguinte metodologia: discos de micélios de nove milímetros de diâmetro dos isolados foram repicados para 12 placas de Petri, seis contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e seis contendo meio Czapek (CZP). Cada disco foi colocado no centro de cada placa. Estas foram divididas em dois grupos, cada grupo continha três placas com BDA e três com CZP, sendo que um grupo foi incubado à temperatura de 25 °C e outro à temperatura de 27 °C.

As avaliações foram efetuadas aos cinco e 10 dias de incubação. Nos estudos de coloração as avaliações foram realizadas, agrupando-as por tipo e coloração do micélio (Andrade, 2007).

O crescimento linear foi avaliado medindo-se o diâmetro médio de cada colônia, com auxílio de uma régua milimetrada.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições de cada isolado e os dados foram analisados adotando-se o esquema fatorial (3x2x2), aplicando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade (Fator 1 = isolados, Fator 2 = temperaturas e Fator 3 = meios de cultura). Os dados foram analisados no programa Assistat, versão 7.5 beta.

3.5. Técnicas moleculares

3.5.1. Extração de DNA

Discos de micélios de nove milímetros de diâmetro de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* foram transferidos para tubos esterilizados contendo meio líquido de batata-dextrose, os quais foram mantidos a 25 °C por sete dias.

A extração de DNA foi realizada segundo método descrito por Dellaporta e colaboradores (1983) com modificações. O material foi triturado em nitrogênio líquido dentro de tubos de 1,5 mL, adicionou-se 600 µL de solução de extração CTAB e homogeneizado os tubos. Foram incubados por 30 minutos a 65 °C com agitação moderada. Adicionou-se 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), a mistura foi agitada por inversão e centrifugada. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e a etapa com clorofórmio/álcool isoamílico foi repetida. O sobrenadante foi novamente transferido para novos tubos de 1,5 mL, onde foi adicionado isopropanol e posteriormente incubou-se a -4°C durante a noite. Após a incubação, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 µL de etanol absoluto, agitou-se e centrifugou-se. A etapa foi repetida com etanol 70%. Foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi seco a 36 °C por 20 minutos. O DNA foi suspenso em 30 µL de água de osmose reversa esterilizada

3.5.2. Amplificação da região ITS

As reações de PCR para a região ITS foram realizadas utilizando-se os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATTGC-3'), segundo White e colaboradores (1990).

O produto de aproximadamente 600 pares de bases (pb) da reação foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TAE e corado com brometo de etídeo (10mg/mL).

3.5.3. Amplificação da região Beta-tubulina

As reações de PCR para o gene da Beta-tubulina foram realizadas utilizando-se os iniciadores Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'), segundo Glass e Donaldson (1995).

O produto de aproximadamente 600 pb da reação foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TAE e corado com brometo de etídeo.

3.5.4. Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados seguindo-se o protocolo descrito por Schmitz e Riesner (2006): em microtubo de 1,5 mL, foi misturado 1,6 µL de EDTA 0,5 M, 21,0 µL de PEG a 50% e 8,1 µL de NaCl 5 M. Adicionou-se o produto da PCR (\pm 20 µL) à mistura. Incubou-se em temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugou-se durante 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 125 µL de etanol 70%, centrifugado (5 minutos a 14.000 rpm) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi seco a 36 °C por 20 minutos. O DNA foi suspenso em 30 µL água de osmose reversa esterilizada.

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger e colaboradores (1977). As reações para sequenciamento foram efetuadas com o kit Big Dye (Applied Biosystems) e realizadas no sequenciador (ABI 377 – ABI Prism / Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante.

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas utilizando-se o programa BioEdit.

A partir de diferenças observadas no sequenciamento da região Beta-tubulina, foram desenhados os iniciadores específicos para Cgc.

3.5.5. Teste de especificidade dos Iniciadores Cgc-F e Cgc-R

Para comprovação da especificidade dos iniciadores específicos desenhados a partir da amplificação e sequenciamento da região Beta-tubulina, foi efetuada uma reação de amplificação com DNAs genômicos de 24 isolados de Cgc, três isolados de Cg, nove isolados de C e oito isolados de A com os iniciadores específicos para Cgc (Cgc-F - 5'-CAGCTCGAGCGCATGAGT-3' e Cgc-R - 5'-ACCAGACTGGCCGAAGACA-3') utilizando-se a seguinte programação: um ciclo de 94°C por 5 minutos; 45 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 66°C, 45 segundos a 72°C e um ciclo de extensão final de 4 minutos a 72°C.

3.5.6. Detecção do patógeno em sementes via PCR

Para estes estudos foram avaliados os métodos sem incubação das sementes (0 dia) e com incubação das sementes em papel de filtro (método do papel de filtro) durante 3, 5 e 7 dias.

Para obtenção das sementes inoculadas, sementes previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos foram distribuídas em placas de Petri contendo BDA com o fungo cultivado por 7 dias. Após 56 horas à temperatura de ± 20 °C em câmara de incubação com agitação manual das placas aproximadamente a cada 12 horas, as sementes foram retiradas e colocadas para secar em temperatura ambiente.

As sementes sadias (SS) foram misturadas às inoculadas (SI) obtendo-se as incidências de: 0; 0,25; 0,50; 1; 2; 5; 10; 50 e 100% do patógeno conforme a Tabela 3. As sementes foram distribuídas em placas de Petri descartáveis de nove cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro previamente embebidas em água destilada esterilizada, utilizando-se o método do papel de filtro (BRASIL, 2009). Foram colocadas 10 sementes por placa. Para este experimento foram utilizadas sementes com diferentes níveis de incidência (Tabela 3) que foram incubadas aos 3, 5 e 7 dias. Posteriormente, as amostras foram submersas em água destilada esterilizada (1,0 mL por semente) e colocadas sob agitação mecânica por 10 minutos. Uma alíquota de 10 mL da suspensão obtida foi transferida para 2 tubos de ensaio de 5 mL e centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm. A extração de DNA foi realizada a partir do precipitado seguindo-se a metodologia descrita no item 3.5.1.

A reação de PCR com DNAs genômicos extraídos das amostras de sementes de algodão utilizando-se os iniciadores específicos Cgc-F e Cgc-R foi efetuada seguindo-se protocolo já descrito no item 3.5.5. O produto de aproximadamente 230 pb da reação foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TAE e corado com brometo de etídeo.

Tabela 3. Incidência (%) de patógenos em amostras de sementes de algodão.

Incidência do Patógeno (%)	Número de Sementes	
	SS*	SI**
0,00	400	0
0,25	399	1
0,50	199	1
1,00	99	1
2,00	49	1
5,00	95	5
10,00	9	1
50,00	5	5
100,00	0	10

SS – Sementes sadias

SI – Sementes inoculadas

3.5.7. Detecção do patógeno em plantas via PCR

Para esta etapa, três isolados foram escolhidos aleatoriamente e estes foram repicados para quatro placas de Petri contendo BDA e incubados em câmara BOD por 10 dias a 25 °C.

Após o crescimento micelial dos fungos, foram preparadas suspensões com os conídios com concentração de 10^6 conídios/ mL, seguindo-se método descrito por (BARROCAS, 2008). As inoculações foram realizadas em plântulas de algodão do cultivar Fibermax 966, após apresentarem as primeiras folhas verdadeiras. Todas as partes das plântulas foram inoculadas utilizando-se método de pincelamento da suspensão de conídios. Cada plântula foi protegida com sacos plásticos durante as primeiras 24 horas do período de condução dos experimentos (BARROCAS, 2008).

Plântulas testemunhas foram inoculadas com água destilada e mantidas da mesma forma que as plântulas inoculadas com os conídios.

As plântulas permaneceram em casa de vegetação por 30 dias. Após esse período foi coletado material vegetal (caule, folhas e gema apical) de plantas com e sem sintomas inoculadas com os isolados escolhidos.

A extração de DNA do material vegetal coletado foi realizada segundo descrito no item 3.5.1, entretanto ao tampão de extração de CTAB foi adicionado PVP e mercaptoetanol, como sugerido por Ferreira e Grattapaglia (2001).

As reações de PCR com DNAs genômicos extraídos das plantas de algodão (controle, inoculadas com sintomas e inoculadas sem sintomas) utilizando-se os iniciadores específicos Cgc-F e Cgc-R foram efetuadas seguindo-se protocolo já descrito no item 3.5.6. O produto de aproximadamente 230 pares de bases da reação foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TAE e corado com brometo de etídeo.

3.6. Pesquisa com produtores de algodão.

Foi realizada uma pesquisa, com produtores de algodão dos Estados de São Paulo e Mato Grosso, para fazer um levantamento sobre os danos/prejuízos causados pelo patógeno *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* na cultura do algodoeiro, utilizando um questionário (Figura 5).

INFORMAÇÕES BÁSICAS

Nome: _____
Profissão/Cargo: _____
Nome da Empresa: _____
Cidade: _____ Estado: _____

QUESTIONÁRIO

1 - Há quanto tempo está no mercado do algodão?

2 - Quais seus principais produtos fornecidos (sementes, fibras, etc)?

3 - Qual(s) cultivar(s) de algodão é utilizado em seu plantio?

4 - Conhece ou já ouviu falar sobre a ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*)? Conhece os danos que essas doenças podem causar?

5 - Já teve problemas em seu plantio devido a essa doença? Se sim, quais foram seus prejuízos econômicos?

6 - Conhece algum produtor/empresa de algodão que teve problemas em seu plantio devido a essa doença? Se sim, qual o procedimento por ele tomado?

7 - Qual procedimento é utilizado para a prevenção de aparecimento de doenças em seu plantio (uso de sementes saudáveis, biocontrole, agroquímicos, entre outros)?

8 - Se existir uma suspeita de doenças no plantio, quais procedimentos são seguidos?

Figura 5. Questionário para entrevistar produtores de algodão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Testes de patogenicidade

Os resultados dos testes de patogenicidade em condições de casa de vegetação, com as inoculações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc 1 ao Cgc 20) e *Colletotrichum gossypii* (Cg 1 ao Cg 3) demonstraram que todos os isolados foram patogênicos a plantas de algodão. Entretanto, apresentaram diferentes níveis de severidade (Tabela 4), resultando em sintomas característicos da doença como redução de tamanho, superbrotamento, necrose e enrugamento da superfície do limbo (Figura 6) no caso de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e amarelecimento das folhas no caso de *Colletotrichum gossypii*. Os resultados obtidos evidenciaram a existência de três grupos distintos no que se refere à agressividade: o primeiro formado por nove isolados de Cgc (6, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18 e 20) que resultou em sintomas em até 45 dias após as inoculações, o segundo composto por sete isolados de Cgc (1, 2, 3, 5, 8, 10 e 19) e dois isolados de Cg (2 e 3) que induziram sintomas 55 dias após as inoculações e o último grupo com quatro isolados de Cgc (4, 7, 14 e 15) e um de Cg (1) induzindo sintomas 75 dias após as inoculações.

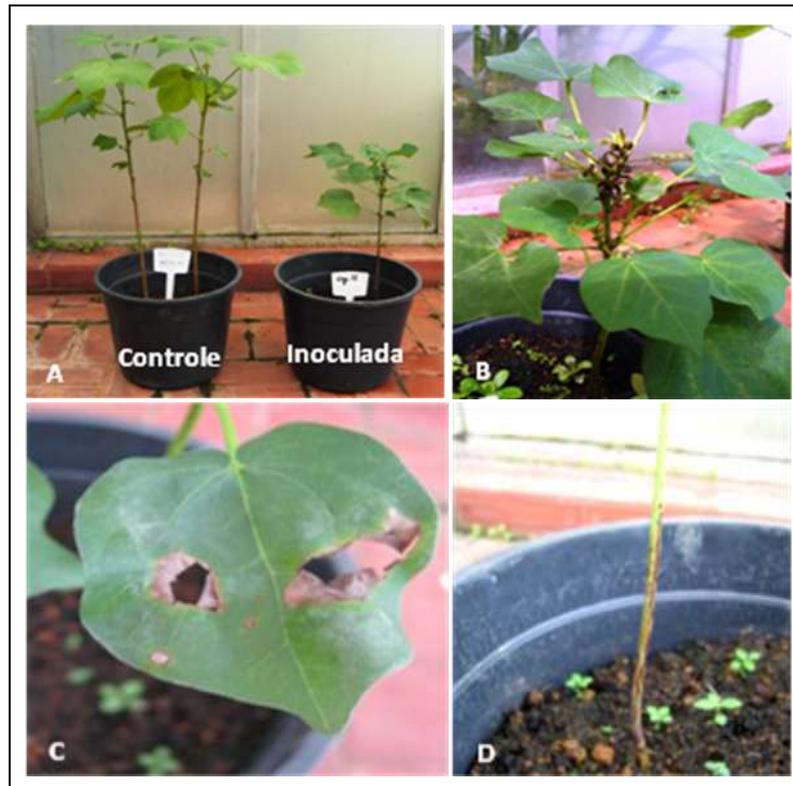


Figura 6. Sintomas característicos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em plantas (cv. Fibermax 966): redução de tamanho (A), superbrotamento (B), necrose e enrugamento da superfície do limbo da folha (C) e necrose na haste (D).

Tabela 4. Tempo para aparição dos sintomas.

Isolados	Aparecimento dos Sintomas		
	até 45 dias	até 55 dias	até 75 dias
Cgc 1		X	
Cgc 2		X	
Cgc 3		X	
Cgc 4			X
Cgc 5		X	
Cgc 6	X		
Cgc 7			X
Cgc 8		X	
Cgc 9	X		
Cgc 10		X	
Cgc 11	X		
Cgc 12	X		
Cgc 13	X		
Cgc 14			X
Cgc 15			X
Cgc 16	X		
Cgc 17	X		
Cgc 18	X		
Cgc 19		X	
Cgc 20	X		
Cg 1			X
Cg 2		X	
Cg 3		X	

Cgc - *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, Cg - *Colletotrichum gossypii* (Cg)

É importante ressaltar que a partir das plantas com sintomas foram efetuados reisolamentos do patógeno em placas contendo o meio de cultura BDA.

4.2. Caracterização micelial

4.2.1. Tipo e coloração das colônias

Como mostra a Tabela 5, os isolados de Cgc foram separados em 11 grupos a temperaturas de incubação de 25 °C a 27 °C, em meio BDA e em meio CZP.

O agrupamento foi realizado de acordo com as seguintes características: **1.** micélio superior cotonoso cinza e reverso cinza escuro, **2.** micélio superior cotonoso

cinza escuro e reverso cinza, **3.** micélio superior lanoso cinza escuro e reverso cinza escuro, **4.** micélio superior cotonoso cinza claro e reverso cinza claro, **5.** micélio superior cotonoso cinza e reverso cinza claro, **6.** micélio superior lanoso cinza claro e reverso cinza claro, **7.** micélio superior cotonoso cinza e reverso cinza, **8.** micélio cotonoso superior cinza escuro reverso cinza escuro, **9.** micélio superior lanoso cinza e reverso cinza, **10.** micélio superior lanoso salmão e reverso salmão e **11.** micélio superior cotonoso esbranquiçado e reverso salmão (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Em meio BDA, o grupo onde mais isolados foram agrupados foi o Grupo 2, com nove isolados de Cgc (4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14 e 18), tanto a 25 quanto a 27 °C. Entre os 20 isolados avaliados, apenas quatro apresentaram diferença nas características micelias e/ou coloração quando comparados entre as temperaturas. Os isolados Cgc 9 e Cgc 16 foram classificados no grupo 5 a 25°C e no grupo 4 a 27°C, o Cgc 17 a 25°C ficou no grupo 4 e a 27°C no grupo 3 e o Cgc 19 a 25°C no grupo 4 e a 27°C no grupo 5. Os demais isolados apresentaram características miceliais e coloração idênticas em ambas às temperaturas.

Em meio CZP, o grupo onde mais isolados foram agrupados foi o Grupo 10 com nove isolados de Cgc (4, 5, 6, 8, 11, 12, 14, 18 e 19), tanto a 25°C quanto a 27°C. Entre os 20 isolados avaliados, apenas três apresentaram diferença nas características micelias e/ou coloração quando comparados entre as temperaturas. O isolado Cgc 10 foi classificado no grupo 6 a 25°C e no grupo 7 a 27°C, o Cgc 15 a 25°C ficou no grupo 4 e a 27°C no grupo 11 e o Cgc 17 a 25°C no grupo 4 e a 27°C no grupo 3. Os demais isolados apresentaram características miceliais e coloração idênticas em ambas às temperaturas.

Os isolados Cgc 3 e 20 apresentaram características miceliais e coloração das colônias idênticas em todas as temperaturas e meios de cultura, porém, em grupos distintos, considerando que o isolado 3 foi classificado no Grupo 3 e o 20 no Grupo 6, evidenciando que não houve variação no tipo e coloração de micélio quando os isolados foram submetidos aos diferentes tratamentos.

Analisando-se as Figuras 7, 8, 9 e 10 e a Tabela 5 observa-se uma maior variação dos isolados de Cgc entre os meios de cultura em relação à temperatura a qual foram submetidos.

Esses resultados mostraram que existe uma variabilidade expressiva na coloração e tipo de micélio entre os isolados da mesma variedade que se encontravam nas mesmas condições de incubação, meio de cultura e temperatura.

Tabela 5. Agrupamento de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, incubados a 25 °C e 27 °C, nos meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e Czapeck (CZP), de acordo com as características miceliais e coloração.

Grupos	Meios de cultura			
	Batata ágar dextrose		Czapeck	
	Temperatura (°C)		Temperatura (°C)	
	25	27	25	27
1	1	1	-	-
2	4;5;6;7;8;11;12;14;18	4;5;6;7;8;11;12;14;18;	-	-
3	3	3;17	3;	3;17;
4	10;13;15;17;19	9;10;13;15;16;	15;17	-
5	9;16	19;	-	-
6	20	20	2;10;20	2;20
7	-	-	-	10;
8	2	2	-	-
9	-	-	1;7	1;7
10	-	-	4;5;6;8;11;12;14;18;19	4;5;6;8;11;12;14;18;19
11	-	-	9;13;16;	9;13;15;16;

1. micélio superior cotonoso cinza e reverso cinza escuro; 2. micélio superior cotonoso cinza escuro e reverso cinza; 3. micélio superior lanoso cinza escuro e reverso cinza escuro; 4. micélio superior cotonoso cinza claro e reverso cinza claro; 5. micélio superior cotonoso cinza e reverso cinza claro; 6. micélio superior lanoso cinza claro e reverso cinza claro; 7. micélio superior cotonoso cinza e reverso cinza; 8. micélio superior cotonoso cinza escuro reverso cinza escuro; 9. micélio superior lanoso cinza e reverso cinza; 10. micélio superior lanoso salmão e reverso salmão; 11. micélio superior cotonoso esbranquiçado e reverso salmão.

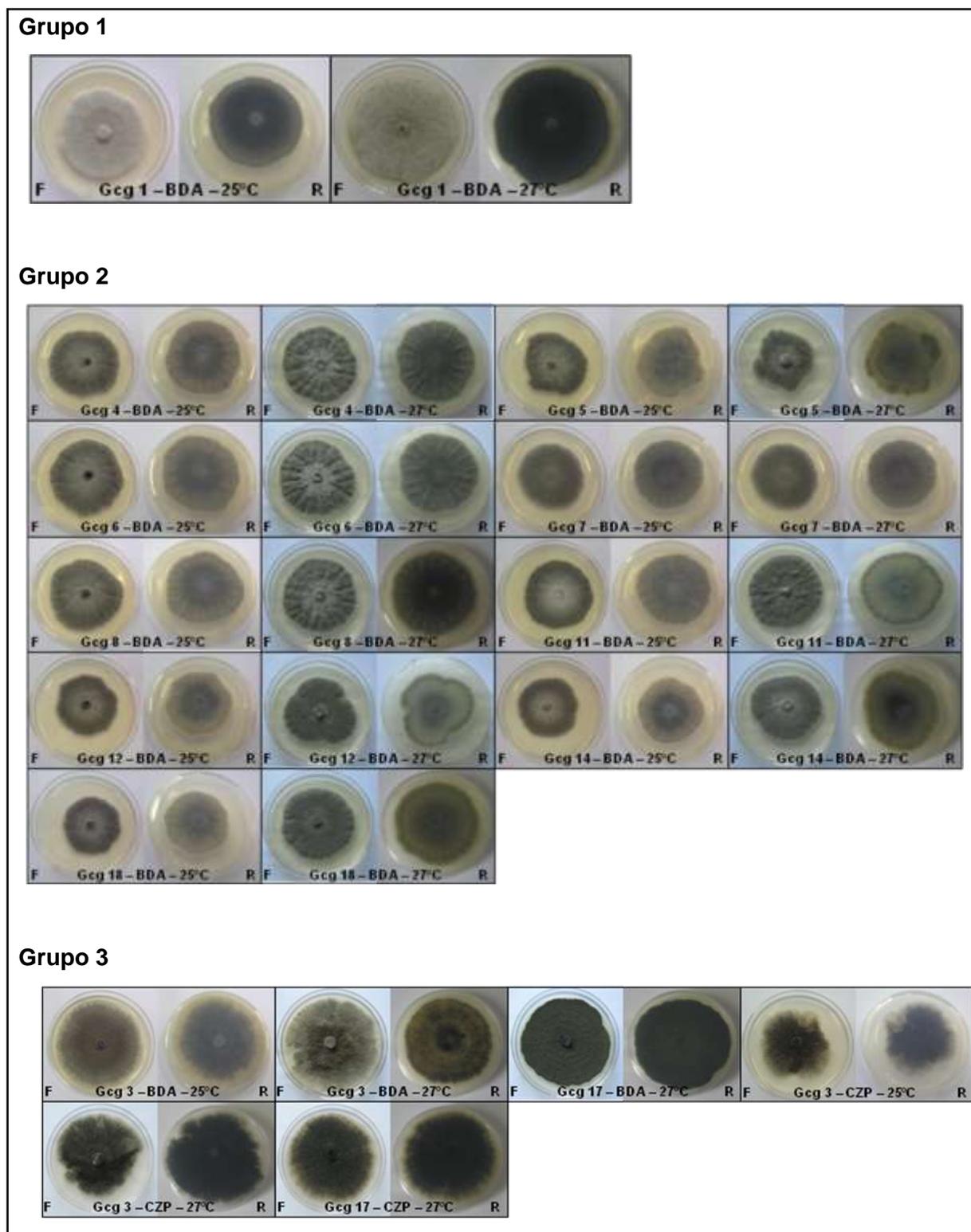


Figura 7. Grupos de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Gcg) segundo características de tipo e coloração de micélio nos meios BDA e Czapeck. Grupos 1 ao 3. F – frente da placa, R-reverso da placa.

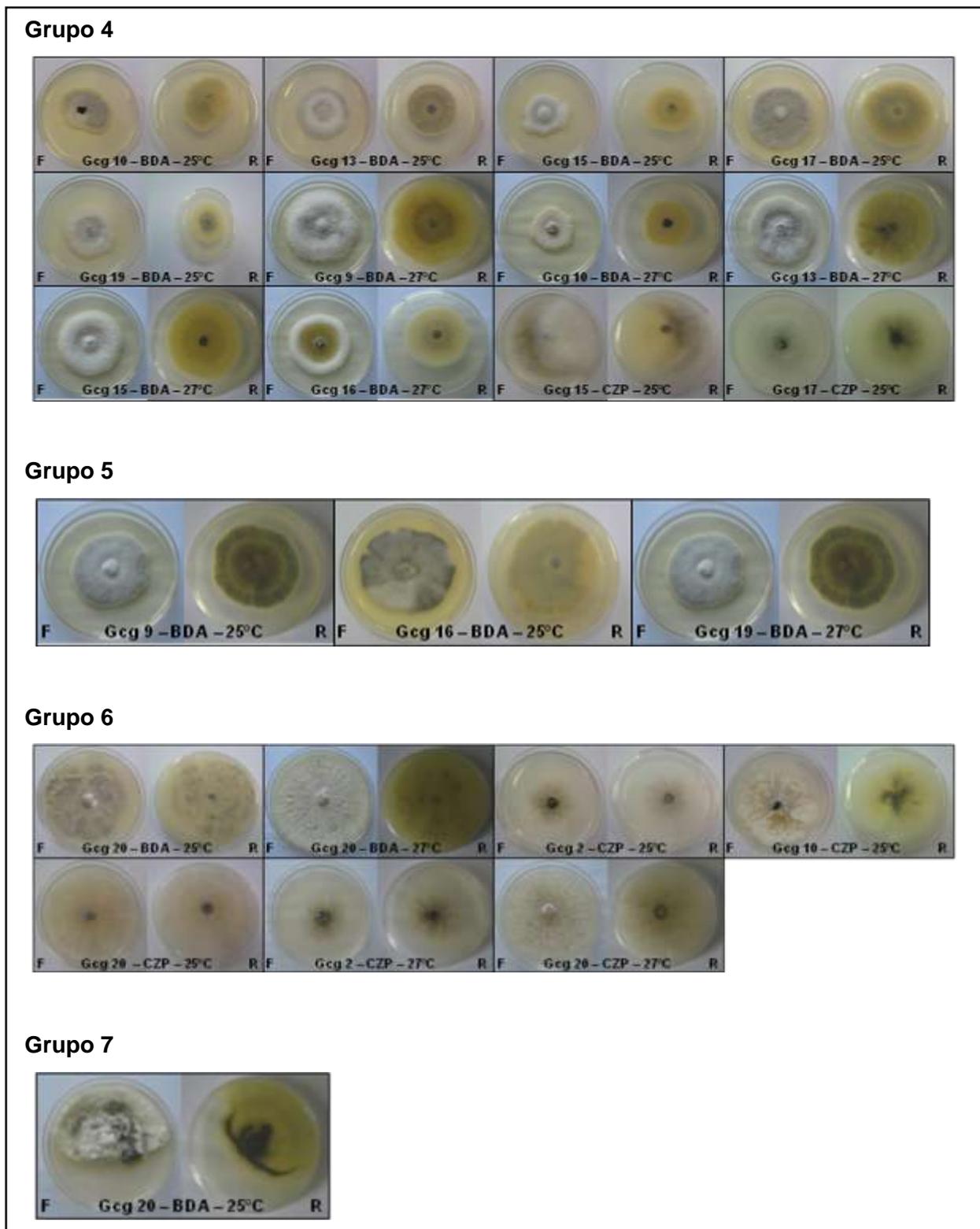
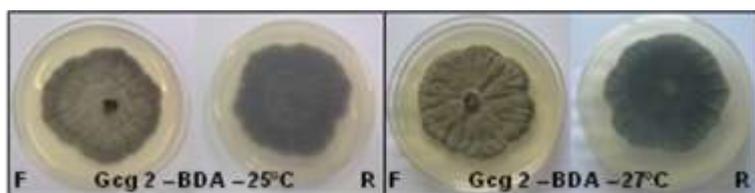
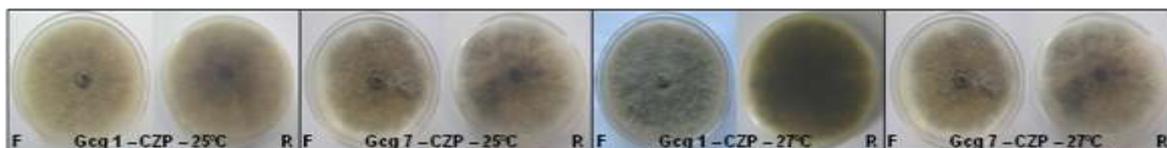


Figura 8. Grupos de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Gcg) segundo características de tipo e coloração de micélio nos meios BDA e Czapeck. Grupos 4 ao 7. F – frente da placa, R-reverso da placa.

Grupo 8



Grupo 9



Grupo 10

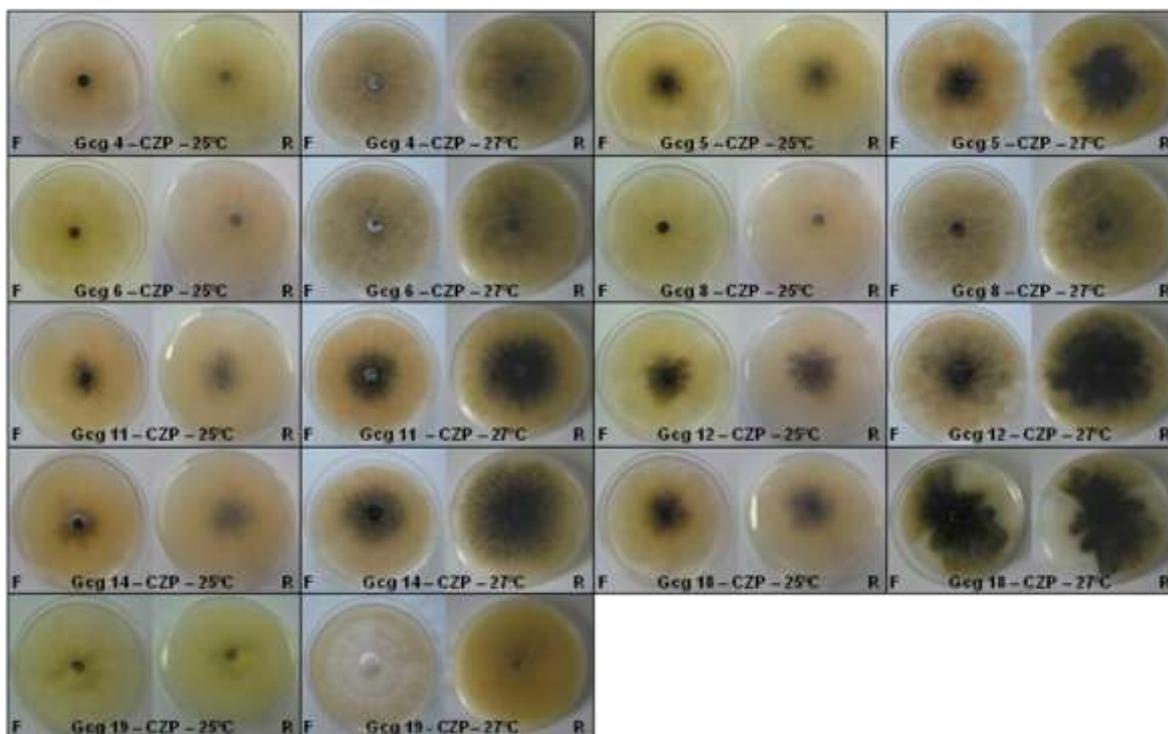


Figura 9. Grupos de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc) segundo características de tipo e coloração de micélio nos meios BDA e Czapeck. Grupos 8 ao 10. F – frente da placa, R- reverso da placa.

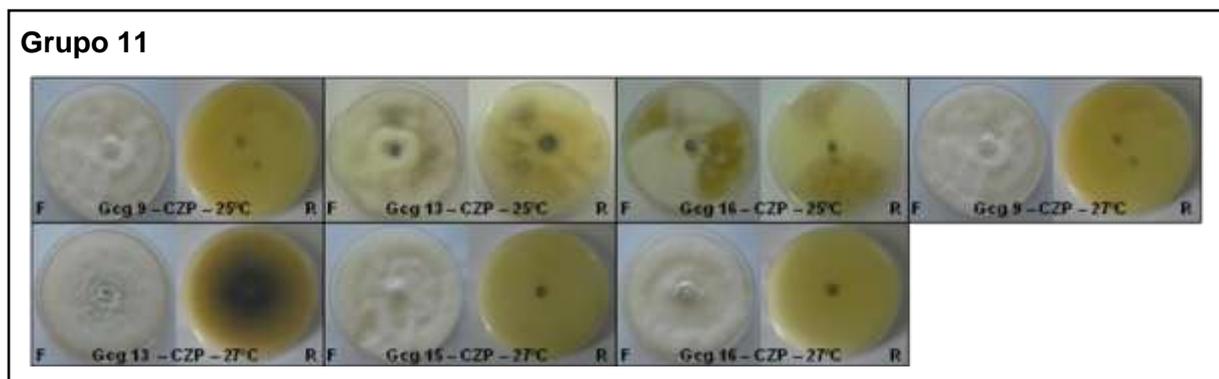


Figura 10. Grupos de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc) segundo características de tipo e coloração de micélio nos meios BDA e Czapeck. Grupo 11. F – frente da placa, R-reverso da placa.

4.2.2. Crescimento das colônias

Os resultados obtidos da análise fatorial de crescimento micelial de Cgc, mostraram que houveram diferenças significativas em todos os fatores avaliados e nas interações entre os fatores, tanto aos cinco quanto aos 10 dias (Tabela 6).

Tabela 6. Quadro de análise fatorial de crescimento micelial de Cgc (ANAVA)

F.V.	5 dias				10 dias			
	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator 1 (F1)	19	58,56603	3,08242	24,4616**	19	119,53879	6,29152	24,2681**
Fator 2 (F2)	1	13,37176	13,37176	106,1163**	1	5,70417	5,70417	22,0026**
Fator 3 (F3)	1	2,59376	2,59376	20,5837**	1	356,97204	356,97204	1376,9413**
Interação F1XF2	19	6,11178	0,32167	2,5527**	19	14,00000	0,73684	2,8422**
Interação F1XF3	19	61,28228	3,22538	25,5962**	19	114,13546	6,00713	23,1712**
Interação F2XF3	1	1,89926	1,89926	15,0722**	1	7,21067	7,21067	27,8136**
Interação F1XF2XF3	19	5,95595	0,31347	2,4877**	19	10,75183	0,56589	2,1828**
Tratamentos	79	149,78082	1,89596	15,0461**	79	628,31296	7,95333	30,6782**
Resíduos	160	20,16167	0,12601		160	41,48000	0,25925	
Total	239	169,94249			239	669,79296		

Fator 1= Isolados; Fator 2= Temperaturas; Fator 3= Meios de cultura; F.V.= Fonte de variação; G.L.= Grau de liberdade; S.Q.= Soma de quadrado; Q.M.= Quadrado médio

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Os resultados obtidos da avaliação de crescimento micelial de Cgc, mostraram que nas médias entre os isolados, o Cgc 2 e Cgc 10 apresentaram menor crescimento aos cinco e dez dias de incubação, enquanto que o Cgc 20 apresentou maior crescimento nas duas situações (Tabela 7).

Tabela 7. Crescimento micelial (cm) de diferentes isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc) em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e Czapek (CZP), incubados durante 5 e 10 dias a 25 e 27 °C.

Isolados	Crescimento Micelial (cm)								Médias dos Isolados	
	Isolados X Temperatura				Isolados X Meio de Cultura				5 dias	10 dias
	5 dias		10 dias		5 dias		10 dias			
	25°C	27°C	25°C	27°C	BDA	CZP	BDA	CZP		
Cgc 1	5.3667 bA	5.7417 abA	7.6167 bA	8.1583 abcdA	5.4583 bA	5.6500 aA	6.7750 bB	9.0000 aA	5.55417 b	7.88750 bc
Cgc 2	3.9583 efA	3.9083 gA	5.8667 dA	5.6083 fA	4.8167 bcdefA	3.0500 fB	6.3917 bcdeA	5.0833 dB	3.93333 f	5.73750 g
Cgc 3	4.0583 defB	5.3917 bcA	7.3917 bB	8.5833 abA	5.2583 bA	4.1917 eB	8.1000 aA	7.8750 bcA	4.72500 de	7.98750 b
Cgc 4	4.7500 bcdA	5.0083 bcdeA	7.0833 bcB	7.7667 bcdeA	5.1250 bcA	4.6333 cdeB	6.3917 bcdeB	8.4583 abcA	4.87917 cde	7.42500 bcdef
Cgc 5	4.3250 cdefA	4.6417 defgA	6.8000 bcdA	7.1750 deA	4.3667 defgA	4.6000 cdeA	5.5167 defgB	8.4583 abcA	4.48333 e	6.98750 ef
Cgc 6	4.9167 bcB	5.4750 bcA	7.6000 bA	7.8667 bcdeA	5.3417 bA	5.0500 abcdA	6.5500 bcdB	8.9167 abA	5.19583 bcd	7.73333 bcde
Cgc 7	4.5000 cdeB	5.1333 bcdA	7.3250 bA	7.6500 bcdeA	5.1333 bcA	4.5000 deB	6.4333 bcdeB	8.5417 abA	4.81667 cde	7.48750 bcdef
Cgc 8	4.6500 bcdeA	5.0333 bcdeA	7.6083 bA	7.6417 bcdeA	5.0917 bcdA	4.5917 cdeB	6.4167 bcdeB	8.8333 abA	4.84167 cde	7.62500 bcdef
Cgc 9	4.4250 cdeB	4.9750 cdefA	7.0833 bcA	7.6250 bcdeA	4.1000 fgB	5.3000 abcA	5.7500 bcdefgB	8.9583 aA	4.70000 de	7.35417 bcdef
Cgc 10	3.6250 fB	4.2583 fgA	6.2250 cdA	5.0333 fB	3.0250 hB	4.8583 bcdeA	3.8000 hB	7.4583 cA	3.94167 f	5.62917 g
Cgc 11	4.5667 cdeB	5.1667 bcdA	7.2833 bcA	7.7833 bcdeA	4.7500 bcdefA	4.9833 abcdA	6.0667 bcdefB	9.0000 aA	4.86667 cde	7.53333 bcdef
Cgc 12	4.4583 cdeB	5.1250 bcdA	7.1500 bcA	7.4167 cdeA	4.4250 cdefgB	5.1583 abcdA	5.6917 cdefgB	8.8750 abA	4.79167 cde	7.28333 bcdef
Cgc 13	4.4667 cdeB	5.2167 bcdA	6.7000 bcdB	7.5167 cdeA	4.1333 fgB	5.5500 abA	5.2167 fgB	9.0000 aA	4.84167 cde	7.10833 def
Cgc 14	4.3750 cdeA	4.7750 cdefA	6.9917 bcA	7.1833 deA	3.9750 gB	5.1750 abcdA	5.4250 efgB	8.7500 abA	4.57500 e	7.08750 ef
Cgc 15	4.4833 cdeA	4.3667 efgA	6.8583 bcdA	7.0667 eA	3.6917 ghB	5.1583 abcdA	4.9667 gB	8.9583 aA	4.42500 ef	6.96250 f
Cgc 16	4.6750 bcdeA	4.8250 cdefA	7.3000 bA	7.2417 cdeA	4.2000 efgB	5.3000 abcA	5.5417 defgB	9.0000 aA	4.75000 de	7.27083 bcdef
Cgc 17	4.8917 bcB	5.7333 abA	7.4167 bB	8.2917 abcA	5.3167 bA	5.3083 abcA	6.7083 bcB	9.0000 aA	5.31250 bc	7.85417 bcd
Cgc 18	4.5167 cdeB	5.0750 bcdeA	7.1417 bcB	7.7750 bcdeA	4.9333 bcdeA	4.6583 cdeA	6.0833 bcdefB	8.8333 abA	4.79583 cde	7.45833 bcdef
Cgc 19	4.1417 defB	4.6417 defgA	7.0833 bcA	7.3083 cdeA	3.8250 gB	4.9583 abcdA	5.3917 efgB	9.0000 aA	4.39167 ef	7.19583 cdef
Cgc 20	6.1333 aA	6.2333 aA	9.0000 aA	9.0000 aA	6.9583 aA	5.4083 abB	9.0000 aA	9.0000 aA	6.18333 a	9.00000 a
DMS para colunas	0.7385		1.0593		0.7385		1.0593		DMS1=	DMS=
DMS para linhas	0.4045		0.5803		0.4045		0.5803		0.5220	0.74901
CV%	5 dias= 7.39508 e 10 dias= 6.94594									

CV% Coeficiente de variação em %

DMS Diferença mínima significativa

*Médias seguidas por letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na interação entre isolados e meios de cultura (Tabela 7 e Figura 11), aos cinco dias, oito isolados cresceram mais em CZP (Cgc 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 e 19), seis em BDA (Cgc 2, 3, 4, 7, 8 e 20) e os demais não apresentaram diferenças de crescimento entre os meios. Aos dez dias, 17 isolados cresceram mais em CZP (Cgcs 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19), um em BDA (Cgc 2) e dois não apresentaram diferenças significativa a 5%.

Em meio BDA, aos cinco dias, o isolado que apresentou maior crescimento foi o Cgc 20 e o que apresentou menor crescimento foi o Cgc 10. Em dez dias (Tabela 7 e Figura 12), os isolados que apresentaram maior crescimento foram Cgc 3 e 20, e o que apresentou menor crescimento foi o Cgc 10. Já em meio CZP, aos cinco dias, o isolado Cgc 1 apresentou maior crescimento e o isolado Cgc 2 menor crescimento, e aos dez dias, os isolados Cgc 1, 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 20 apresentaram maior crescimento e o isolado Cgc 2 novamente apresentou o menor crescimento.

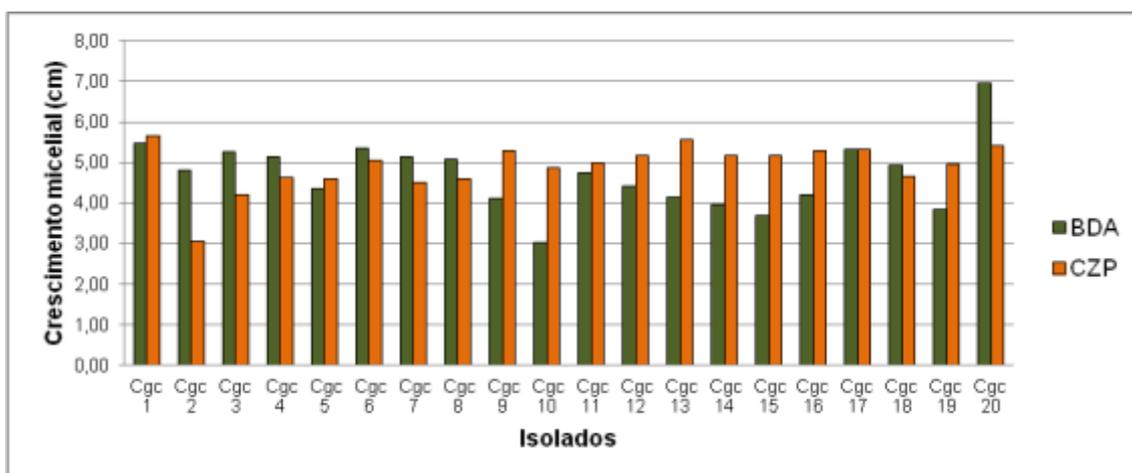


Figura 11. Interação isolados x meios de cultura aos cinco dias após a incubação.

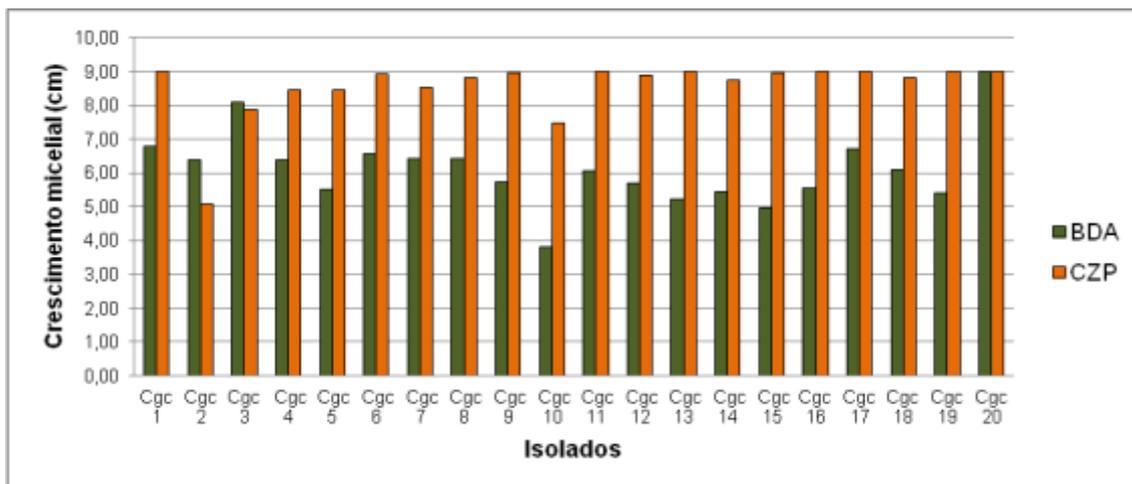


Figura 12. Interação isolados x meios de cultura aos dez dias após a incubação.

Nos resultados de avaliação da interação entre isolados e temperaturas verificou-se que na avaliação aos cinco dias, a 27 °C (Tabela 7 e Figura 13), 11 isolados apresentaram maior crescimento em relação a 25 °C (Cgc 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18 e 19), os demais não diferiram. Aos dez dias (Tabela 7 e Figura 14) cinco isolados apresentaram maior crescimento a 27 °C (Cgc 3, 4, 13, 17 e 18) e um isolado a 25 °C (Cgc 10). Os demais não apresentam diferenças entre as temperaturas.

Em temperatura de 25 °C aos cinco dias, o isolado que apresentou maior crescimento foi o Cgc 20 e o que apresentou menor crescimento foi o Cgc 10. Em dez dias o isolado que apresentou maior crescimento foi o Cgc 20 e o que apresentou menor crescimento foi o Cgc 2. Já à temperatura de 27 °C aos cinco dias, o isolado Cgc 20 apresentou maior crescimento e o isolado Cgc 2 menor crescimento. Aos dez dias o isolado que apresentou maior crescimento foi o Cgc 20 e os que apresentaram menor crescimento foram os Cgc 2 e 10.

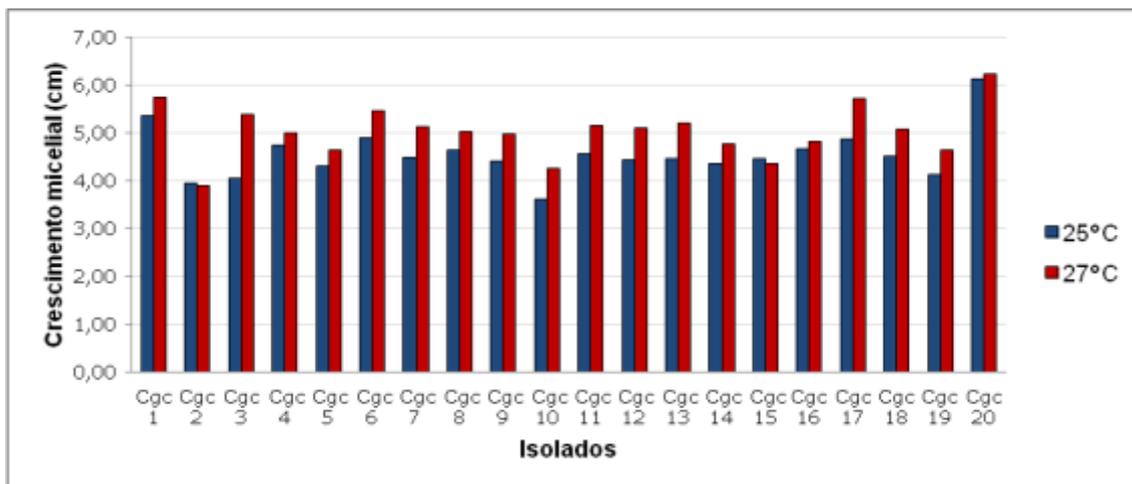


Figura 13. Interação isolados x temperaturas aos cinco dias após a incubação.

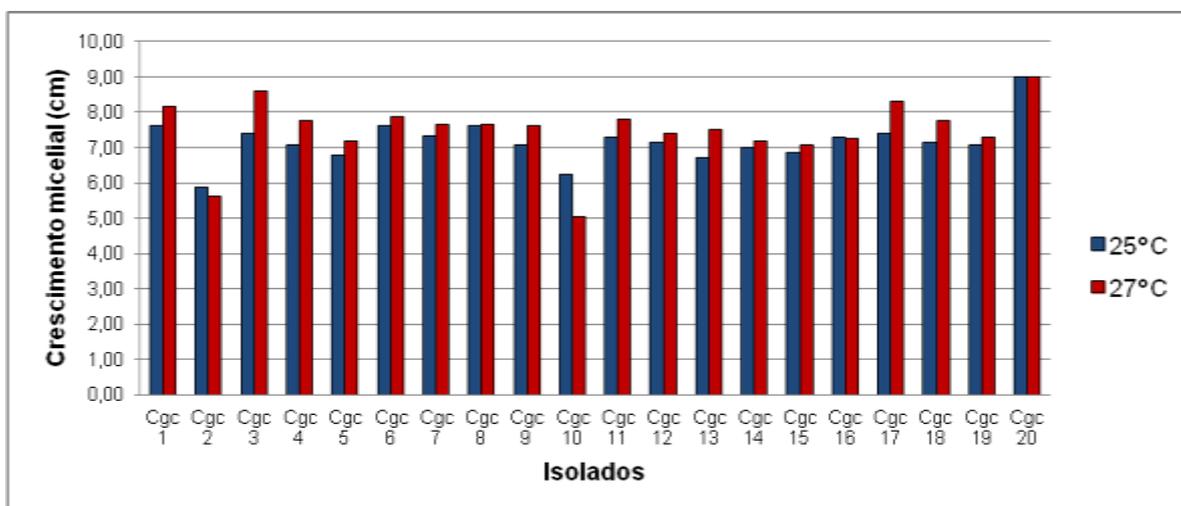


Figura 14. Interação isolados x temperaturas aos dez dias após a incubação.

Os resultados indicaram que isolados de Cgc da mesma variedade apresentam variabilidade tendo em vista as diferenças de crescimento, nos meios BDA e CZP sob as temperaturas 25 e 27 °C.

Ao analisarmos o quadro da interação temperaturas X meios de cultura (Tabela 8), observamos que as médias, entre todos os isolados, apresentaram maior crescimento a 27°C tanto em meio BDA quanto em CZP aos 5 dias . Aos 10 dias em BDA apresentou maior crescimento a 27°C e em CZP não apresentou diferença significativa entre as temperaturas.

Já ao analisarmos os meios de cultura há 5 dias a 25°C não apresentou diferença significativa entre BDA e CZP e a 27°C em meio CZP apresentou maior crescimento do que em BDA. Aos 10 dias tanto a 25°C quanto a 27°C apresentaram maior crescimento em CZP.

Tabela 8. Análise fatorial da interação temperatura e meio de cultura

Médias Temperaturas X Meios de Cultura				
Temperaturas (°C)	5 dias		10 dias	
	Meios de Cultura			
	BDA	CZP	BDA	CZP
25°C	4,5492 bA	4,5792 bA	5,7833 bB	8,5692 aA
27°C	4,8433 aB	5,2292 aA	6,4383 aB	8,5308 aA

*Médias seguidas por letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos do tipo, coloração e crescimento micelial mostraram que os isolados da mesma variedade apresentam variações quanto ao crescimento em diferentes condições de temperatura, meio de cultura e incubação, evidenciando a necessidade do uso de técnicas moleculares para detecção e identificação deste patógeno em sementes.

Vechiato (2002) também observou variação no crescimento de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, agente causal do cancro na haste da soja, quando utilizou como parâmetros as características de tipo, coloração e crescimento micelial nos meios de cultura BDA, Soja e Czapeck.

4.3. Técnicas moleculares

4.3.1. Amplificação da região ITS

Foram amplificados fragmentos da região ITS, de aproximadamente 600 pares de bases (bp) dos isolados de Cgc e Cg. Os produtos foram sequenciados e as sequências obtidas dos 20 isolados de Cgc e três de Cg foram alinhadas, porém não foram visualizadas diferenças nessa região, para os isolados de *Colletotrichum* causadores da antracnose e ramulose do algodoeiro, impossibilitando assim a projeção de iniciadores específicos.

Carvalho (2005) também não conseguiu diferenciar isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporoides* e *Colletotrichum gossypii* com base em estudos das regiões ITS1, 5,8 S e ITS2 do DNAr.

Mehta e Mehta (2010) avaliaram a variabilidade genética entre *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* através da técnica molecular de PCR-RFLP da região ITS DNAr, e obtiveram um perfil de bandas semelhantes para todos os isolados, não conseguindo, assim, a diferenciação entre essas variedades.

Com base nos resultados expostos pode-se afirmar que a região ITS é muito conservada para esses patógenos e, portanto, sua utilização não é adequada para acessar a diversidade genética em isolados de Cgc e Cg.

4.3.2. Amplificação do gene Beta-tubulina

O emprego dos iniciadores Bt2a e Bt2b produziu fragmentos de aproximadamente 537 pb para os isolados de Cgc e Cg. A partir do alinhamento das sequências dos 20 isolados de Cgc, dos três isolados de Cg e de outros *Colletotrichum* disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), observou-se diferenças nas sequências (Figura 15) E a partir disso foi possível o desenho dos iniciadores específicos para Cgc (Cgc-F - 5'-CAGCTCGAGCGCATGAGT-3' e Cgc-R - 5'-ACCAGACTGGCCGAAGACA-3').

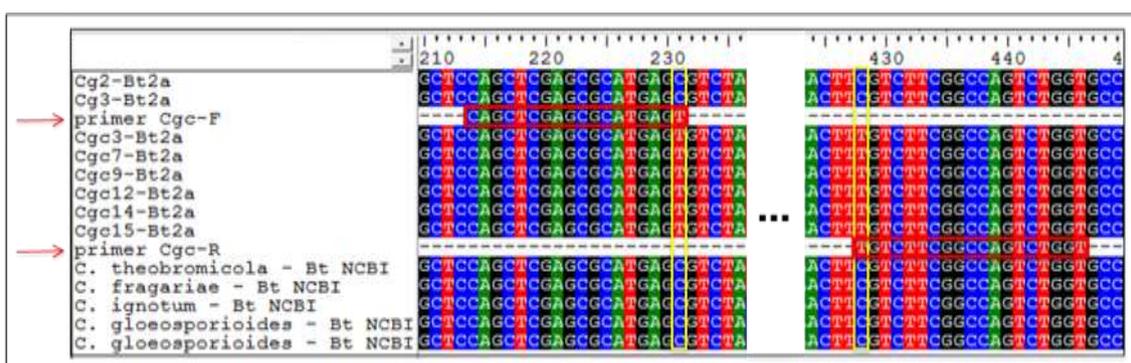


Figura 15. Alinhamento das sequências da região Beta-tubulina de Cg, Cgc e outras espécies de *Colletotrichum*, utilizando o Programa BioEdit. Cg = *Colletotrichum gossypii* e Cgc = *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

4.3.3. Teste de especificidade dos Iniciadores Cgc-F e Cgc-R

A PCR com DNAs genômicos de 24 da espécie de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc); três de *Colletotrichum gossypii* (Cg); nove de *Colletotrichum* de outras espécies (C) (*Colletotrichum trichillum* - C1, *Colletotrichum gloeosporioides* - C2, *Colletotrichum lindemuthianum* - C3, *Colletotrichum boniense* - C4, *Colletotrichum fragariae* - C5, *Colletotrichum coffeanum* - C6, *Colletotrichum acutatum* - C7, *Colletotrichum falcatum* - C8 e *Colletotrichum graminicola* - C9); e oito outras espécies que afetam o algodoeiro (A) (*Rhizoctonia solani* - A1, *Roselinia* sp. - A2, *Macrophomina phaseolina* - A3, *Verticillium dahliae* - A4, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* - A5 ao A7 e *Fusarium solani* - A8), resultou na amplificação de um fragmento com aproximadamente 230 pb, nos 24 isolados de Cgc, enquanto que os isolados de Cg, C e A não apresentaram sinal de amplificação positivo (Figuras 16), indicando que os iniciadores foram específicos para os isolados testados de Cgc.

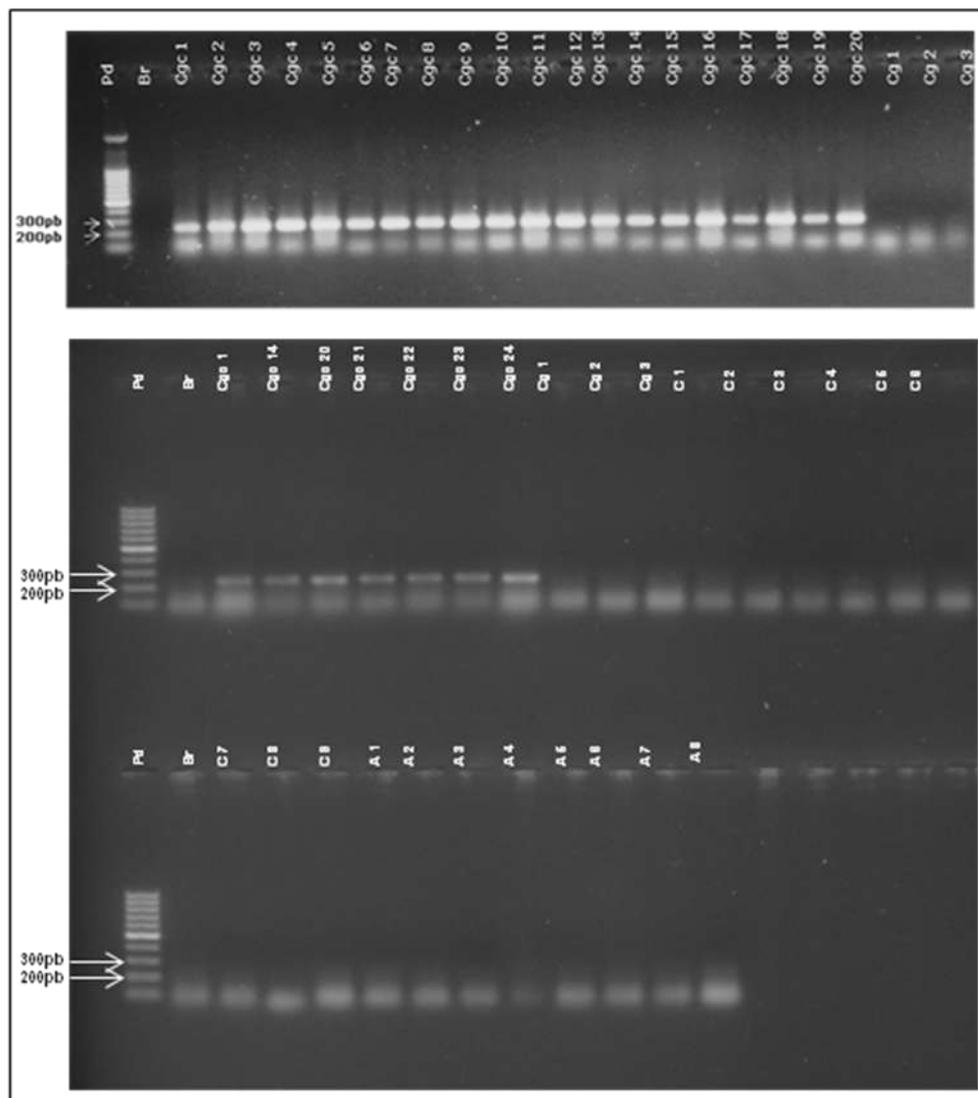


Figura 16. Amplificação com os iniciadores específicos desenvolvidos para *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, Cgc 1 – 20, Cg 1 – 3, C 1 – 9 e A 1 – 8. Pd = Padrão 100 bp, Br = Controle sem DNA, Cgc - *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, Cg - *Colletotrichum gossypii* (Cg), C – outras espécies de *Colletotrichum* e A - outras espécies de patógenos que afetam o algodoeiro (conforme Tabela 2).

4.3.4. Detecção do patógeno em sementes via PCR

As reações de amplificação com DNAs genômicos extraídos das amostras de sementes de algodão utilizando os iniciadores específicos Cgc-F e Cgc-R foram realizadas seguindo-se o protocolo descrito no item 3.5.6. Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose a 2% (Figura 17). Observou-se que nas sementes sem incubação houve a amplificação de um fragmento com aproximadamente 230 pb em amostra com 2% de incidência do patógeno. Em

sementes incubadas por três dias, houve amplificação em amostra com 1% de incidência do patógeno e, aos 5 e 7 dias em amostra com 0,25% de incidência do patógeno.

Esses resultados evidenciaram que quanto maior o tempo de incubação das sementes, que proporciona um maior crescimento do fungo, maior a sensibilidade da PCR para a diagnose.

Para o diagnóstico por PCR de *Ascochyta rabiei* em grão-de-bico foi necessária à incubação por 18 horas em meio Czapek-Dox (PHAN et al., 2002). Para *Magnaporthe grisea*, Chadha e Gopalakrishna (2006) relataram que houve a necessidade da incubação das sementes de arroz por 48 horas em meio BDA. Vechiato et al. (2006), incubaram sementes de soja por 7 dias em substrato de papel (método papel de filtro) para a detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*.

Embora os iniciadores específicos desenvolvidos no presente trabalho tenham proporcionado amplificação para todos os isolados de Cgc utilizados, existe a possibilidade de que novos isolados de Cgc, que possuam pequenas diferenças na sequência de DNA na região de anelamento dos iniciadores, não sejam detectados. Portanto, em casos negativos, a utilização dos métodos tradicionais baseados no isolamento do fungo e re-inoculação de plantas ainda devem ser utilizados para que estes novos isolados possam ser detectados.

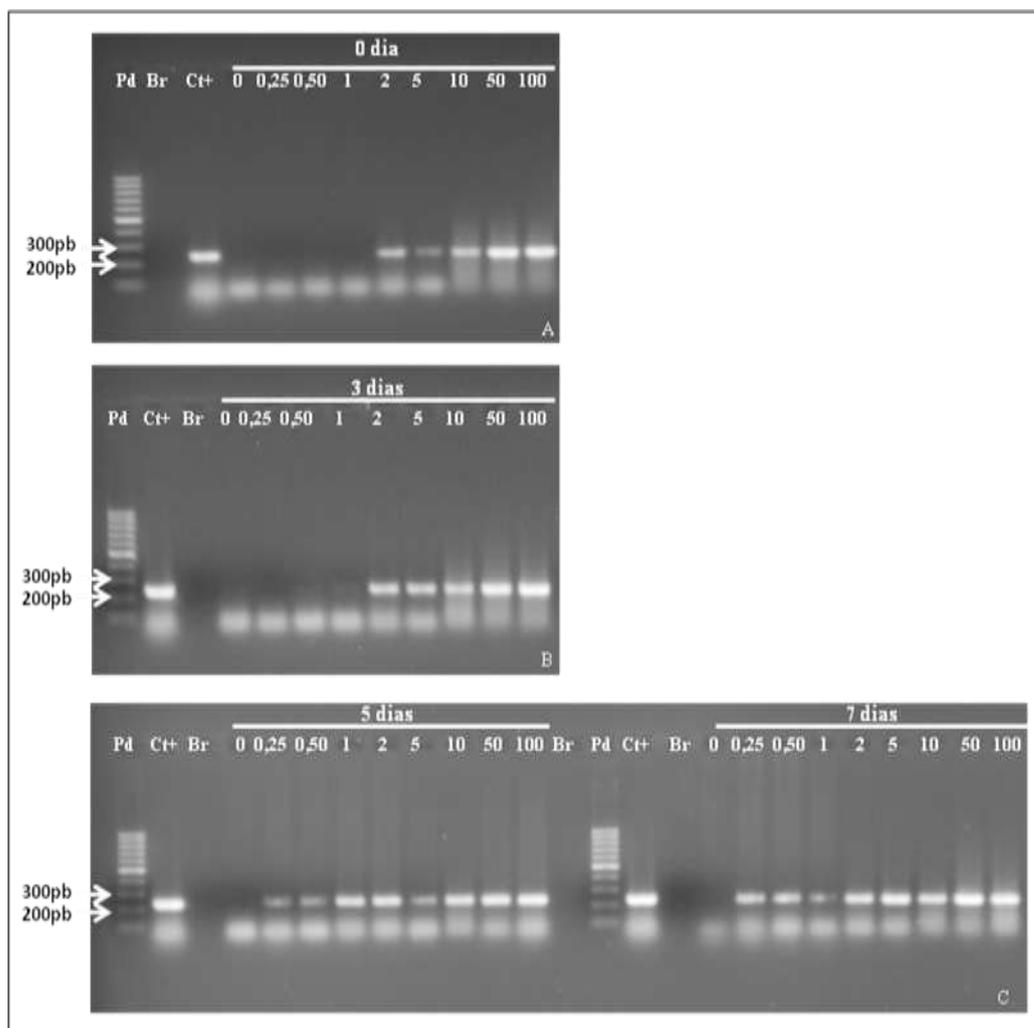


Figura 17. Amplificação por PCR com os iniciadores Cgc-F e Cgc-R e DNAs de Cgc extraídos das amostras de sementes sem incubação e com incubação, nas respectivas incidências (%) do patógeno: 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 50 e 100%. A – Amostras sem incubação, B - Amostras incubadas há 3 dias; C – Amostras incubadas por cinco dias e sete dias. Pd = Padrão 100 pb, Br = Controle sem DNA, Cgc = *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e Cg = *Colletotrichum gossypii*.

4.3.5. Detecção do patógeno em plantas via PCR.

A exemplo do que foi realizado para a detecção de Cgc em sementes de algodão, o mesmo procedimento foi empregado para a detecção do patógeno em plantas utilizando-se os iniciadores específicos Cgc-F e Cgc-R (item 3.5.7). Observou-se amplificação de um fragmento com aproximadamente 230 pb tanto para as plantas inoculadas que apresentaram os sintomas quanto para plantas inoculadas que não apresentaram sintomas, enquanto que as plantas controle (não inoculadas) não apresentaram sinal positivo de amplificação (Figura 18). Estes resultados mostram a

grande sensibilidade do método desenvolvido, permitindo a detecção do patógeno antes mesmo do aparecimento dos sintomas da doença.

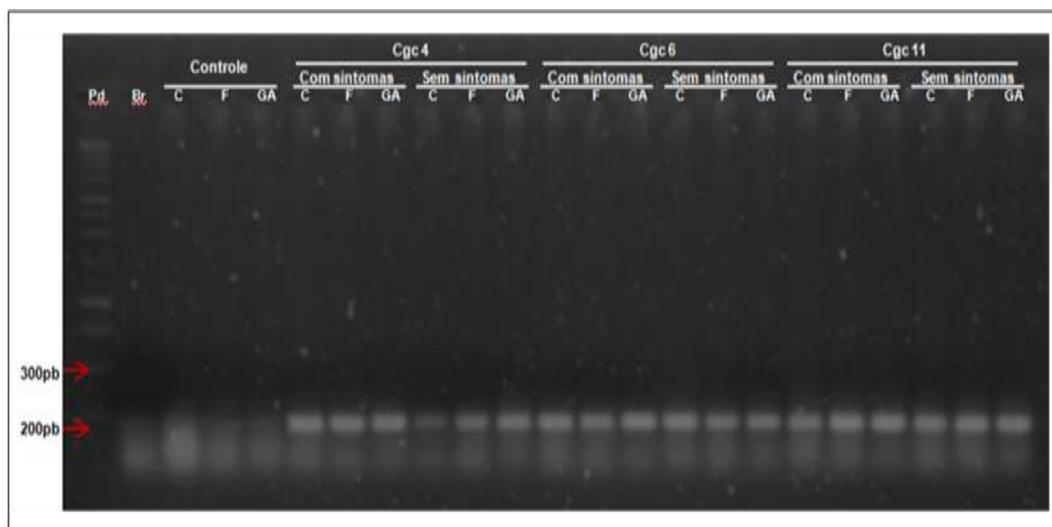


Figura 18. Amplificação dos DNA extraídos das plantas com os iniciadores específicos desenvolvidos para *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioide*. Pd = Padrão 100 bp, Br = Controle sem DNA, Cgc - *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, C = caule, F = folhas e GA = gema apical.

Em 1997, Trout et al. conseguiram a detecção de *Phytophthora infestans* em plantas de batata e tomate utilizando a técnica PCR associada ao RFLP. Moricca et al. (1998) detectaram *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e Shen et al. (2005) detectaram *Phytophthora boehmeriae* em tecidos do algodoeiro. Em 2004, Pasquali et al. conseguiram a detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo. Wang et al. (2008) detectaram *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro por PCR. Em 2006, Chen e colaboradores detectaram *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum truncatum* em soja.

4.4. Pesquisa com produtores de algodão

Ao analisarmos as informações obtidas nos questionários pudemos observar que a maioria dos produtores está no mercado a mais de 30 anos (Figura 19).

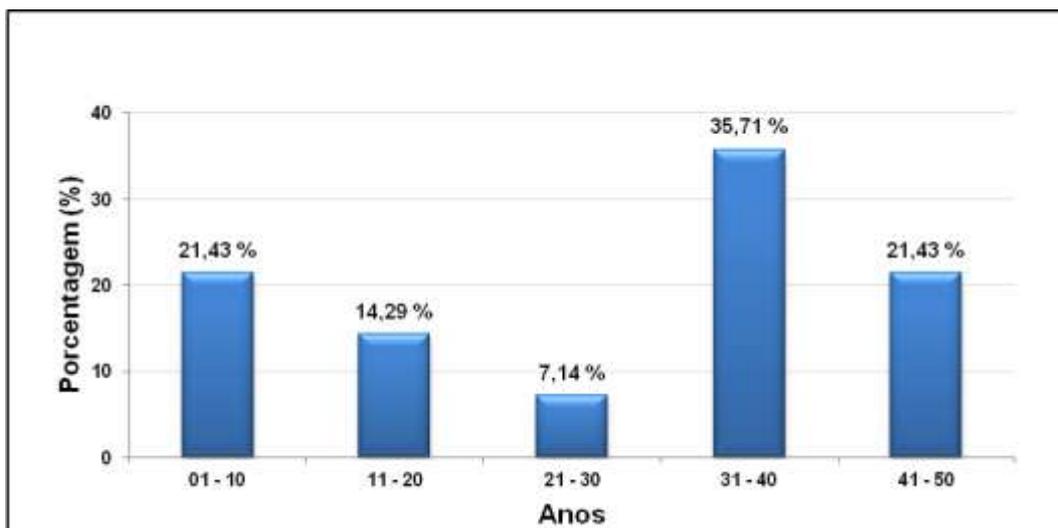


Figura 19. Tempo no mercado como produtor de algodão.

Todos os produtores entrevistados fornecem o produto na forma bruta para cooperativas da região, onde lá serão separados em fibra e caroço.

Os cultivares mais utilizados nos plantios dos produtores entrevistados são os cultivares Fibermax 910, 966 LL, 975 WS e 951 LL da empresa Bayer (Figura 20).

Segundo informações do Manual de Boas Práticas de Manejo do Algodoeiro em Mato Grosso (2012/2013), os cultivares 910, 966 LL, 993 e NuOPAL são medianamente resistentes a ramulose.

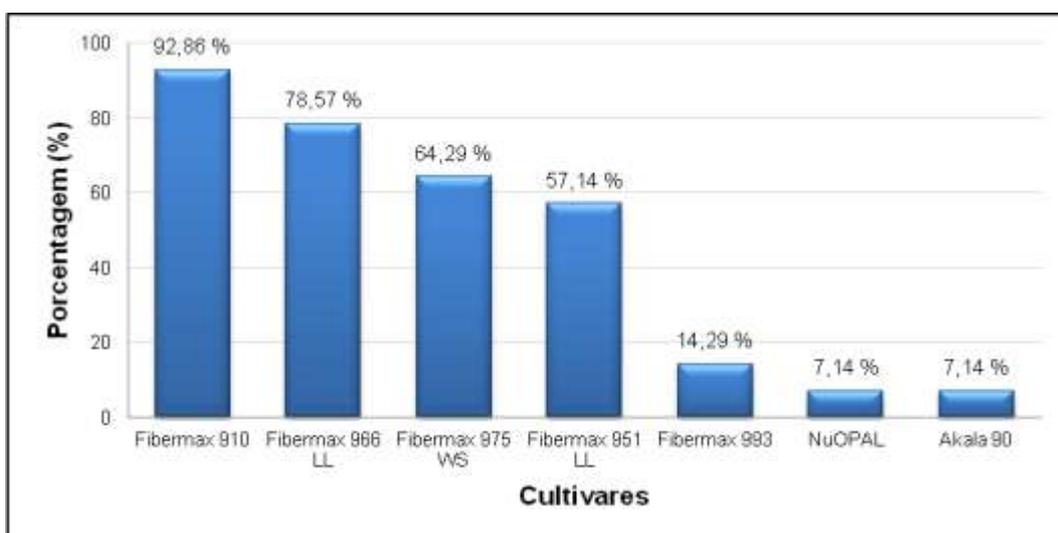


Figura 20. Cultivares de algodão utilizados em plantios nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul.

Quanto ao conhecimento da doença, 93% dos entrevistados já conheciam a ramulose do algodoeiro e os prejuízos que esta pode causar em seu plantio (Figura 21).

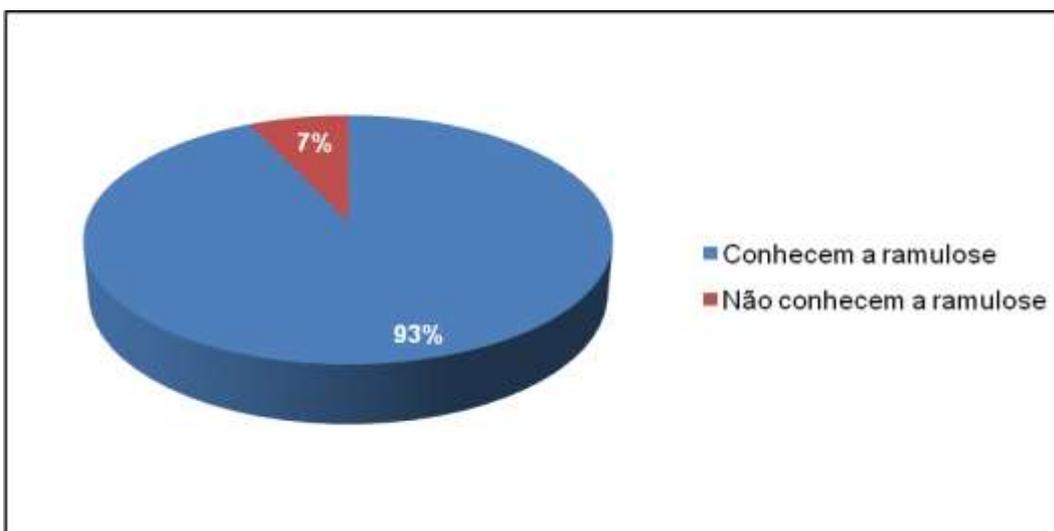


Figura 21. Conhecimento da ramulose entre os produtores de algodão.

Com relação a doença, 57% dos produtores entrevistados nunca tiveram problemas com a ramulose, o restante (36%) teve problemas com a doença porém sem prejuízos e 7% com prejuízos (Figura 22).

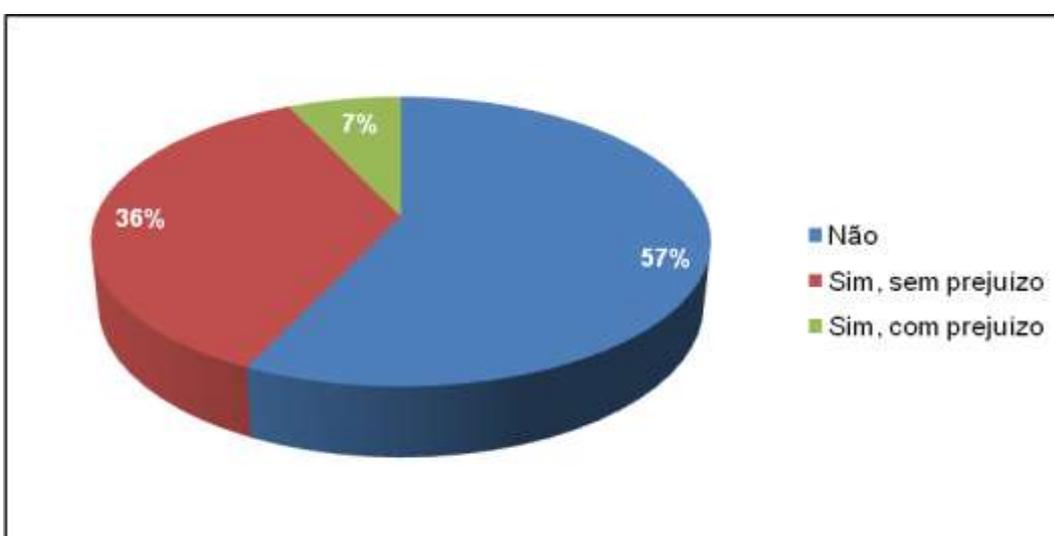


Figura 22. Problemas com a ramulose.

Todos os produtores utilizam sementes sadias e tratadas (certificadas) como método de prevenção de doenças em sua plantação. Outros métodos também utilizados são o tratamento com fungicidas, rotação de culturas, monitoramento das plantas e aeração do solo (Figura 23). Quando há suspeita de alguma doença na plantação, todos os produtores consultam especialistas na área de fitopatologia, para inspeção.

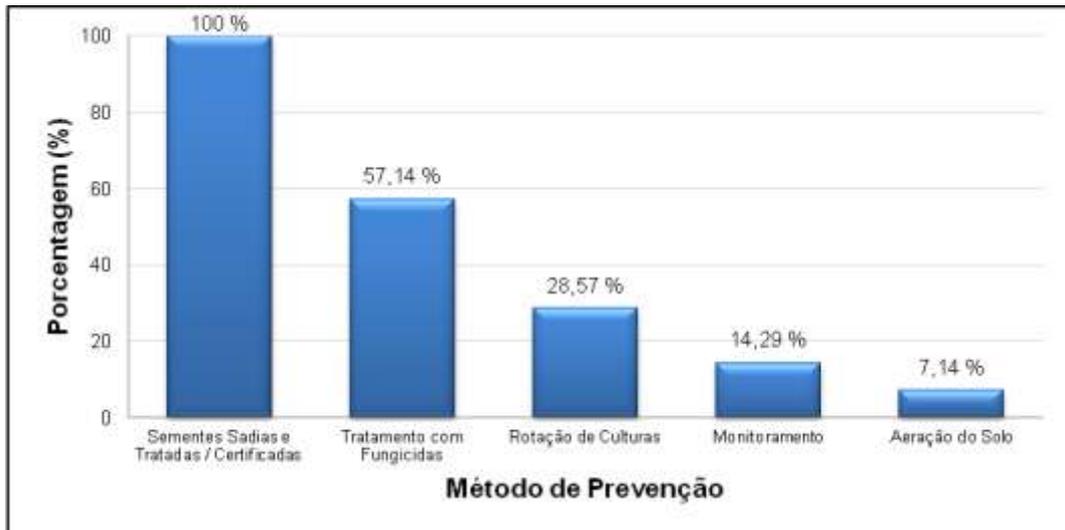


Figura 23. Métodos para prevenção de doenças empregados pelos produtores.

5. CONCLUSÕES

Os isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* apresentaram melhor crescimento com o meio de cultura Czapeck, incubados a 27 °C.

A diferenciação de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, de *Colletotrichum gossypii*, presentes em sementes de algodão não é confiável quando se utiliza como parâmetro as características de tipo, coloração e crescimento micelial em meios de cultura BDA e Czapeck, havendo necessidade do uso de técnicas moleculares.

Os iniciadores específicos desenhados, Cgc-F e Cgc-R mostraram-se específicos para *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

O método de PCR desenvolvido para detecção específica de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* presente nas sementes ou em plantas é confiável para ser utilizado em laboratórios de rotina

A sensibilidade do método para detecção de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão é de uma semente infectada em amostragem de 400 sementes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, J. Instruções para o reconhecimento da “ramulose” do algodoeiro. **O Biológico**, v. 15, n. 3, p. 59-60, 1949.

ABRAHÃO, J. Combate a ramulose tardia do algodoeiro. **O Biológico**, v. 27, p. 121-123, 1961.

ALVES-SANTOS, F. M.; RAMOS B.; GARCÍA-SÁNCHEZ, M. A.; ESLAVA, A. P.; DÍAZ-MÍNGUE, J. M. A DNA-Based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Epidemiology**, v. 92, n. 03, p. 237-244, 2002.

ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 769-779, 2004.

ANDERSON, I. C.; PARKIN, P. I. Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 2, p. 248-253, 2007.

ANUÁRIO BRASILEIRO DO ALGODÃO - 2011. Santa Cruz do Sul: Gazeta do Sul, 144 p., 2011.

ARAÚJO, F. E.; CAVALCANTE, R. D.; CAVALCANTE, M. L. S. Ocorrência de ramulose em algodoeiro herbácea no Ceará. **Fitossanidade**, n. 2, p. 89, 1978.

ARAÚJO, A. E.; FUNGARO, M. H.; SUASSUNA, N. D.; BARROSO, P. A. V. Análise da diversidade genética de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por meio de marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005, Salvador, **Anais...** Salvador, 2005.

ARNDT, C. H. Infection of cotton seedlings by *Colletotrichum gossypii* as affected by temperature. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 34, p. 861-869, 1944.

ASSIGBETSE, K. B.; FERNANDEZ, D.; DUDOIS, M. P.; GEIGER, J. P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Phytopathology**, v. 84, p. 622-626, 1994.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. CAB International, Wallingford, 388 p., 1992.

BAILEY, J. A.; NASH, C.; MORGAN, L. W.; O'CONNELL, K.; TEBEEST, D. O. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, v. 86, p. 1076-1083, 1996.

BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas**. 2008. 110p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2008.

BATES, J. A.; TAYLOR, J. A.; KENYON, D. M.; THOMAS, J. E. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2001.

BATISTA, M. F. Métodos moleculares para a identificação de patógenos. **Revisão Annual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 165-96, 1993.

BECK, J. J.; LIGON, S. M. Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagnospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. **Phytopathology**, v. 85, p. 319-324, 1995.

BELTRÃO, N. E. M.; SOUZA, J. G. Fisiologia e ecofisiologia do algodoeiro. Algodão: tecnologia de produção. Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão. Dourados; p. 54-75; 2006.

BITANCOURT, A. A antracnose e as falhas no plantio de algodão. **O Biológico**, São Paulo, v. 1, n. 11, p. 402-404, 1935.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 399 p., 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 200 p., 2009.

BRIDGE, P. The history and application of molecular mycology. **Mycologist**, v. 16, n. 3, p. 90-99, 2002.

BRUBAKER, C. L.; PATERSON, A. H.; WENDE, J. F. Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. **Genome**, v. 42, p. 184-203, 1999.

BRUNNER, K.; ZEILINGER, S.; MACH, R. L. Molecular Approaches for Studying Fungi in the Environment. *In*: Kubicek, C. P.; Druzhinina, I. S. **Environmental and Microbial Relationships**, 2nd Edition, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2007.

CARVALHO, E. **Relações entre *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro: efeito de inibidores da germinação em testes de sanidade e a caracterização morfológica do patógeno**. 2005. 105p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

CARVALHO, L. P. O gênero *Gossypium* e suas espécies cultivadas e silvestres. *In*: BELTRÃO, N. E. M.; BARRETO, A. N.; SILVA, C. A. D. **O agronegócio do algodão na Brasil**, Brasília: EMBRAPA, Cap. 8, p. 232-252, 1999.

CARVALHO, L. P.; CAVALCANTI, F. B.; LIMA, E. F.; SANTOS, E. O. Influência da ramulose nas características de fibras e produção do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 593-598, 1984.

CARVALHO, L. H.; CHIAVEGATO, E. J. A cultura do algodão no Brasil: fatores que afetam a produtividade. *In*: Cultura do Algodoeiro. CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. Ed. Piracicaba: POTAFOS, p. 121-131, 1999.

CHADHA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seeds using polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1147 – 1153, 2006.

CHEN, B. Y.; JANES, H. W. **PCR Cloning Protocols**. Second edition. New Brunswick, NJ: Humana Press, 2002.

CHEN, L. S.; CHU C.; LIU, C. D.; CHEN, R.; TSAY, S. J. G. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 654 – 662, 2006.

CHEN, Y. Y.; CONNER, R. L.; GILLARD C. L.; BOLAND G. J.; BABCOCK, C.; CHANG K. F.; HWANG S. F.; BALASUBRAMANIAN, P. M. A specific and sensitive method for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. **Plant Disease**, v. 91, p. 1271-1276, 2007.

CHIAVEGATO, E. J. Importância potencial de doenças do algodoeiro nas regiões produtoras do Brasil. In: Congresso Brasileiro de Algodão, 3., 2001, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Algodão, p. 215-218, 2001.

CHILVERS, M. I.; TOIT, L. J. DU; AKAMATSU, H.; PEEVER, T. L. A real-time quantitative PCR assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot onion. **Plant Disease**, v. 91, p. 599-608, 2007.

CHITARRA, G. S. **Variabilidade cultural de *Colletotrichum* associado a sementes de algodão e sua diversidade genética através de marcadores RAPD sob condições padrões do teste de sanidade**. 1996. 56 p. (Dissertação – Mestrado) - UFLA, Lavras, 1996.

CIA, E. Ocorrência e reconhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. *Summa Phytopathologica* v. 3, p. 167-193, 1997.

CIA, E.; FUZATTO, M. G. Manejo de doenças na cultura do algodão. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. (Ed.) **Cultura do algodoeiro**. Piracicaba: Potafós, 1999, p. 121-131.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium spp.*). In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Vol 2: Doenças das Plantas Cultivadas, p. 331-341.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium spp.*). In: Kimati (Ed.) **Manual de Fitopatologia**, 1997, p. 33-48.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do Algodoeiro. In:_____ **Manual de fitopatologia**, São Paulo: Ceres, 2005. p. 41-52.

COELHO, A. B. **A cultura do algodão e a questão da integração entre preços internos e externos**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo, São Paulo, 136 p., 2002.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, abril 2013 / Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília: Conab, 2013.

COSTA, A. S. Infestação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* South. e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Jornal de Agronomia**. Piracicaba, v. 2, p.265-272, 1939.

COSTA, A. S.; FRAGA Jr., C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 12, n. 5/7, p. 249-259, 1937.

COSTA, A. S.; FRAGA Jr., C. G. Sobre a natureza da “ramulose” ou “superbrotamento” do algodoeiro. **Jornal de Agronomia**, v. 2, p. 151-160, 1939.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DEMEKE, T.; ADAMS, R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives of PCR. **Biotechniques**, v. 12, p. 332-334, 1992.

DOMBROWSKI, J. E.; BALDWIN, J. C. AZEVEDO, M. D.; BANOWETZ, G. M. A sensitive PCR-based assay to detect *Neotyphodium* fungi in seed and plant tissue of tall fescue and ryegrass species. **Crop Science**, v. 46, n. 3, p. 1064-1070, 2006.

DUDIENAS, C. **Caracterização morfológica, auxanográfica e patogênica de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* Costa.** 1990. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1990, 67 p.

DUDIENAS, C.; KIMATI, H. Caracterização auxanográfica de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v. 19, p. 152-156, 1993.

EBBELS , D. L. Indexing and Diagnosis in Plant Health. In: **Principles of Plant Health and Quarantine**. CAB International, Wallingford, UK. 302 p., 2003.

EINAX E.; VOIGT K.; Oligonucleotide primers for the universal amplification of Beta-tubulina genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 3, p. 185 – 194, 2003.

FERREIRA, M. F.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: Embrapa, 220 p., 1998.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de castellani para preservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, p. 9-13, 1967.

FNP Consultoria e Comércio. **Agrianual 2002: anuário estatístico da agricultura brasileira**. Algodão. Programas incentivam a cotonicultura no Mata Grosso e Bahia. São Paulo, p. 141-154, 2002.

FREDERICK, R. D.; SNYDER, K. E.; TOOLEY, P. W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; PETERSON, G. L.; BONDE, M. R.; SCHAAD, N. W.; KNORR, D. A. Identification and differentiation of *Tilletia indica* and *T. walkeri* using the polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v. 90, p. 951-960, 2000.

FREDERICK, R. D.; SNYDER C. L.; PETERSON, G. L.; BONDE, M. R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P.meibomia*. **Mycology**, v. 92, p. 217-227, 2002.

FREIRE, E. C.; ANDRADE, F. P.; SANTANA, J. C. F. Cultivar derivada de híbrido de mocó x herbáceo – EMBRAPA 113 – Algodão 7MH. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, I., 1997, Fortaleza. **Anais...** Campina Grande: Embrapa-CNPA, p. 414-417, 1997.

FUNGARO M. H. P., PCR na micologia. **Biotecnologia: Ciências & Desenvolvimento**, v. 3, p. 12 – 16, 2000.

GAEIRAS, L. A. Doenças do algodoeiro. **Informe Agropecuário**, v. 41, p. 44-47, 1978.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes do algodoeiro com fungicidas. In: Embrapa Agropecuária Oeste. **Algodão: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, p. 140-158, 2001.

GUILLEMETTE, T.; IACOMI-VASILESCU, B.; SIMONEAU, P. Convencional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. **Plant Disease**, v. 88, p. 490-496, 2004.

GUZMÁN, P.; GEPTS, P.; TEMPLE S.; MKANDAWIRE, A. B. C.; GILBERTSON, R. L. Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers. **Plant Disease**, v. 83, p. 37-42, 1999.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 81–109, 1993.

IACOMI-VASILESCU, B.; BLANCARD, D.; GUÉNARD, M.; MOLINERO-DEMILLY, V.; LAURENT, E.; SIMONEAU, P. Development of PCR-based diagnostic assay for detecting pathogenic *Alternaria* species in cruciferous seeds. **Seed Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 87-95, 2002.

IAMAMOTO, M. M. **Ramulose do algodoeiro (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*): Reação de genótipos e variabilidade do patógeno**. Unesp - Jaboticabal-SP. (Tese – Doutorado) Produção Vegetal, 57 p., 2002.

Index Fungorum, <http://www.IndexFungorum.org>, (18/09/2012).

IOOS, R.; LAUGUSTIN, L.; ROSE, S.; TOURVIEILLE, J.; LABROUHE de TOURVIEILLE, D. Development of PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara hastedii* in sunflower seeds. **Plant Pathology**, v. 56, p. 209-218, 2007.

JACCOUD, D. S. F. MATIELLO, R. R.; TAYLOR, E.; BATES, J.; LEE, D.; MORAIS, M. H. Diagnose molecular de fungos em sementes. In: LUZ, W.C., ed. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 10, p. 287-331, 2002.

JOHANSON, A.; TURNER, H. C.; MCKAY, G. J.; BROWN, A. E. A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzaesativae*. **Microbiology Letters**, v. 162, p. 289-294, 1998.

JONSSON, R.; SÄLL, T.; BRYNGELSSON, T. Genetic diversity for Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers in two Swedish populations of *Pyrenophora teres*. **Can. J. Plant Pathol.**, v. 22, p. 258-264, 2000.

JULIATTI, F. C.; RUANO, O. **O Algodão – Controle de doenças**. In: F. X. R. Vale and L. Zambolim (Ed.) Controle de Doenças de Plantas. Viçosa. UFV, p. 555-558, 1997.

KIMATI, H. Doenças do Algodoeiro- *Gossypium* spp. In: GALLI.F.(Ed.) **Manual de Fitopatologia**. São Paulo; Editora Ceres, v. 2, p. 28-48, 1980

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: vol. 2: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, p. 690-719, 1997.

KONSTANTINOVA, P.; BONANTIS, P. J. M.; GENT-PELZER, M. P. E.van ; ZOUWEN, P.van der; BULK, R. van der. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. **Mycological Research**, v. 106, n. 1, p. 23-33, 2002.

KUBIAK, D. M. **Influência da palhada de milho na ocorrência de ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* Costa) no algodoeiro**. 2003. 68p. Dissertação (Mestrado na área de Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P.; TURKINGTON, T. K. A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. **Plant Disease**, v. 85, p. 220-225, 2001.

LÉVESQUES, C. A. Molecular methods for detection of plant pathogens- What is the future. **Canadian journal Plant Pathology**, v. 24, p. 333-336, 2001.

LIMA, E. F. **Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A. S. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose** (Tese de Doutorado). Viçosa, Universidade Federal da Viçosa, 1981.

LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S.; VIEIRA, R. M. Principais doenças do algodoeiro e seu controle. In: BELTRÃO N.E.M. (Ed.). **O Agronegócio do Algodão no Brasil**. Brasília. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 1999. p. 717-752.

LOPES, F. C. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos**. 2011. 130p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande

do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2011.

LOPPNAU, P. A.; BREUIL, C. Species level identification of conifer associates *Ceratocystis sapstain* fungi by PCR-RFLP on a β -tubulin gene fragment, **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, p. 143-147, 2003.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: Fundamentos e aplicações**. Brasília, Ministério da Educação. Lavras: ESAL/FAEPE. 107 p. 1988.

MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. 2012. 94p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, RS, 2012.

MALAGUTI, G. La escobilla del algodón en Venezuela. **Agronomia Tropical**, v. 5, p. 73-86, 1955.

MARTIN, R. R.; JAMES, D. LÉVESQUE, C. A. Impact of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Review Phytopathology**, v. 38, p. 207-239, 2003.

MATHIESON, J. T.; MANGANO, V. Ramulose, a new cotton disease in Paraguay caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v. 11, p. 115-118, 1985.

MEHTA, Y. R.; AVANZI, C. A., CALVGO, E. Molecular characterization of *Colletotrichum gossypii* isolates from cotton. In: Congresso Brasileiro de Algodão, 3, 2001. **Anais**. Embrapa Agropecuaria Oeste: Mato Grosso, p. 32-35, (resumo), 2001.

MEHTA, Y. R.; MEHTA, A. Variabilidade genética entre isolados de *Colletotrichum gossypii* do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 40-44, 2010.

MENTEN, J. O. M. Importância da semente na transmissão de patógenos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRA DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 27-40.

MICHAELSEN, A.; PINZARI, F.; LUBITZ, W.; PIÑAR, G. Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonizing paper material, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 58, p. 133 – 141, 2006.

MONTEIRO, J. E. B. A. **Índice de favorabilidade agrometeorológica da ramulose (*Colletotrichum gossypii* pv. *cephalosporioides*) e da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro**. 2007. 109p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A.; KASUGA T.; MITCHELSON. Detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in cotton tissue by polimerase chain reaction. **Plant Pathology**, v. 47, p. 486-494, 1998.

MOUKHAMEDOV, X.; HU, X.; NAZAR, R. N.; ROBB, A. Use of Polimerase Chain Reaction – amplified ribossomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. **Phytopathology**, v. 84, p. 256-259, 1994.

NEALE, D. B., DEVEY, M. E., JERMSTAD, K. D. Use of DNA markers in forest tree improvement research. **New Forest**, n. 5. p.1-17, 1992.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London, The Macmillan Press, 1977, 839 p.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London, The Macmillan Press, 1979. 839 p.

NICHOLSON, P.; LEES, A. K.; MAURIN, N.; PARRY, D. W.; RIZANOOR, H. N. Development of PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* fsp *nivale* and *Microdochium nivale* fs *majus* in wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 48, p. 257-271, 1996.

NICHOLSON, P.; PARRY, D. W. Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat. **Plant Pathology**, v. 45, p. 872-883, 1996.

OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, F. R. A.; OLIVEIRA, M. K. T.; FRIRE, A. G. Sensibility of cotton crops to mepiquat chloride under saline conditions. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, v. 43, n. 3, p. 484-492, 2012.

OOSTERHUIS, H. J. W. Growth and development of cotton plant. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; PAIVA, F. A.; ASMUS, G. L.; ARAÚJO, A. E. Doenças In: EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Algodão: tecnologia de produção**. Dourados, 1999. p. 245-272.

OTTONELLO, A. M. P. **Caracterização cultural, patogênica e serológica de *Colletotrichum* da antracnose e da ramulose do algodoeiro**. ESALQ, Piracicaba-SP. 1992. 68 p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia), 1992.

PAIVA, F. A.; ASMUS, G. L.; ARAÚJO, A. E. Doenças In: Embrapa Agropecuária Oeste. **Algodão: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2001. p. 245-272.

PARRY, D. W.; NICHOLSON, P. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. **Plant Pathology**, v. 45, p. 383-391, 1996.

PASQUALI, M.; MARENA, L.; FIORA, E.; PIATTI, P.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Real – time PCR for the identification of a highly pathogenic group of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* on *Argyranthemum frutescens* L. **Journal of Plant Pathology**, v. 86, p. 51-57, 2004.

PASQUALI, M.; PIATTI, P.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Development of a real-time polymerase chain for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from basil seed roots. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 632-636, 2006.

PHAN, H. T. T.; FORD, R.; BRETAG, T.; TAYLOR, P. W. J. A rapid and sensitive polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Ascochyta rabiei*, the cause of ascochyta blight of chickpea. **Australasian Plant Pathology**, v. 31, p. 31-39, 2002.

PINHEIRO, M. **Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para a detecção de fungos produtores de aflotoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju**. Brasília, 2004. 149f. – Universidade Católica de Brasília- UCB, Brasília, 2004.

PIZZINATO, M. A.; CIA, E. Relação entre incidência de ramulose do algodoeiro em campo e detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 13, p. 15, 1987.

PIZZINATO , M. A.; CIA, E.; FUZATTO, M. G. Relação severidade de ramulose do algodoeiro em condições de campo e a presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes produzidas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 50-54, 1994.

PIZZINATTO, M. A.; TANAKA, M. A. S. Método para identificação de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro baseado no hábito de crescimento. II. Avaliação em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 22, p. 122-127, 1996.

PRYOR, B. M.; GILBERTSON, R. L. A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. **Plant Disease**, v. 85, p. 18-23, 2001.

ROCHELLE, T. C. P. **Relações de preço no Mercado de algodão em pluma e desenvolvimento do mercado futuro de algodão no Brasil**. 2000. 163p. Tese de Doutorado, ESALQ/USP, Piracicaba, 2000.

SALVATIERRA, D. K. **Ocorrência da Ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* Costa) sob semeadura convencional e direta relacionada ao microclima, crescimento e desenvolvimento da cultura do algodoeiro**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2008.

109p. Dissertação (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba, São Paulo, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings National Academy of the Science**.v. 74, p. 463-467, 1977.

SANTOS, G. R., ZAMBOLIM, L. & BATISTA, U. Transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes do algodoeiro em função do período de inoculação das plantas. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.177-180, 1993.

SANTOS, G. R. **Progresso da ramulose do algodoeiro e transmissão de *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa pelas sementes.** Viçosa, 1993. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

SCHAAD, N. W.; BONDE, M. R.; HATZILOUKAS, E. Bio-PCR: a highly sensitive technique for detecting seedborne fungi and bacteria.In: **Seed health testing. Progress Toward the 21 st Century.** Ed. HUTCHINS, J.D. e REEVES, J.C.CAB International, 1997, 263 p.

SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal Plant Pathology**. v. 24, p. 250 – 258, 2002.

SCHAAD, N. W.;FREDERICK, R. D.; SHAW, J.; SCHNEIDER, W. L.; HICKSON, R.; PETRILLO, M. D.; LUSTER, D. G. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. **Annual Review of Phytopathology**. v. 41, p. 305-324, 2003.

SCHEHA, L.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; GALLITELLI, D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 893–908, 2004.

SCHILLING, A. G.; MÖLLER, E. M.; GEIGER, H. H. Polymerase Chain Reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. **Phytopathology**, v.86, p. 515-522, 1996.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 311-313, 2006.

SEELANAN, T.; SCHNABEL, A.; WENDEN, J. F. Congruence and consensus in the cotton tribe (Malvaceae). **Systematic Botany**, n. 22, p. 259-290, 1997.

SHEN, G.; WANG Y. C.; ZHANG W. L.; ZHENG, X. B. Development of a PCR assay for the molecular detection of *Phytophthora boehmeriae* in infected cotton. **Journal Phytopathology**, n. 153, p. 291 – 296, 2005.

SHI, Y. L. et al. Analysis of the genetic relationships among the wheat bunt fungi using RAPD and ribosomal DNA markers. **Phytopathology**, v.86, n.3, p.311-318, 1996.

SILVA, F. A. C. **Estudo molecular e bioquímico de cultivares de algodão em resposta a *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A. S. Costa.** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008. 108p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, 2008.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Variabilidade genética de isolado de complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculações em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 27-32, 2002.

SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C.; BERNARDINHO FILHO, J. R.; SALGADO, K. C. C.; STEVENS, M. R. AFLP markers differentiate isolates of *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 169-172, 2005.

SMITH, O. P.; PETERSON, G. L.; BECK, R. J.; SCHAAD, N. W.; BONDE, M. R. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of carnal bunt of wheat. **Phytopathology**, v. 86, p. 115-222, 1996.

SUASSUNA, N. D. **Caracterização de populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, controle químico e resistência em algodão.** Viçosa:

Universidade Federal de Viçosa, 2005. 90p Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, Minas Gerais, 2005.

SUASSUNA N. D.; MORELLO C. L.; MAFFIA L. A.; MIZUBUTI E. S. G.; COUTINHO W. M. Determinação de série diferenciadora de raças de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, V., 2005, Salvador. **Algodão, uma fibra natural - Anais...** Campina Grande: EmbrapaAlgodão, 2005. CD-ROM.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

TANAKA, M. A. S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro**. 1990. 111p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1990.

TANAKA, M. A. S. Transmissão planta-semente e semente-plântula do agente causal da ramulose do algodoeiro. In: MENTEN, J.O.M.(Ed). **Patógenos em sementes – detecção, danos e controle químico**. Piracicaba, ESALQ, FEALQ, p.171-178, 1991.

TANAKA, M. A. S. Problemas da detecção do agente causal da ramulose em sementes de algodão. In: MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, p. 93-108, 1995.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. n. 13, v. 2, p. 125, 1988.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. Variação patogênica e fisiológica de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro, **Summa Phytopatologica**, v.18, p. 138-177. 1992.

TANAKA, M. A. S.; PIZZINATTO, M. A.; SOAVE, J. Método para identificação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes

de algodoeiro baseado no hábito de crescimento. I. Avaliação em laboratório. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 22, p.116-122, 1996.

TAYLOR, E. J. A.; STEVENS, E. A.; BATES, J. A.; MORREALE, G.; LEE, D.; KEYON, D. M.; THOMAS, J. E. Rapid – cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. **Plant Pathology**, v. 50, p. 347-355, 2001.

TEIXEIRA, H. ***Colletotrichum gossypii* South. Em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L) transmissibilidade e controle.** 1995. 74p. (Dissertação – Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

TROUT, C. L.; RISTAINO, M.; MADRITCH, M.; WANGSOMBOONDEE, T. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. **Plant Disease**, v. 81, p. 1042-1048, 1997.

VECHIATO, M. H. **Detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja por PCR.** 2002. 115 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

VECHIATO, M. H.; MARINGONI, A. C.; MARTINS, E. M. F. Desenvolvimento de iniciadores para a detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 161-169, 2006.

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.),** Lavras-MG, 1996, 114 p. (Doutorado-Fitotecnia), 1996.

WALCOTT, R. R. Detection of seed pathogens. **Horttecnology**. v. 13, n. 1, p. 40-46. 2003

WANG W.; TANG, J. H.; WANG, Y. C. Molecular Detection of *Colletotrichum lindemuthianum* by Duplex PCR. **Journal of Phytopathology**, v. 156, p. 431 – 437, 2008.

WATKINS, G. M. Compendium of cotton diseases. Ed. St. Paul, MN, USA, **American Phytopathological Society**, 1981.

WHITE, T. J., BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. **PCR protocols, a guide to methods and applications**. San Diego, California: Academic Press, p. 315-322, 1990.

XIA, Z.; ACHAR, N. Random amplified polymorphic DNA and polymerase chain reaction markers for the differentiation and detection of *Stenocarpella maydis* in maize seeds. **Journal Phytopathology**, v. 149, p. 35-44, 2001.

ZAMBOUNIS, A. G.; PAPLOMATAS, E.; TSAFTARIS, A. S. Intergenic spacer – RFLP analysis and direct quantification of Australian *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* isolates soil and infected cotton tissues. **Plant Disease**, v. 91, p. 1564-73, 2007.

ZHANG, A. W.; HARTMAN, G. L.; CURIO-PENNY, B.; PEDERSEN, W. L.; BECKER, K. B. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicola* from soybean seeds. **Phytopathology**, v. 89, p. 796-804, 1999.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ