

**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**

ELLEN NOLY BARROCAS

2008

ELLEN NOLY BARROCAS

**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**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa
de Pós-graduação em Agronomia, área de
concentração em Fitopatologia, para a obtenção
do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. José da Cruz Machado

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Barrocas, Ellen Noly.

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 / Ellen Noly Barrocas. – Lavras : UFLA, 2008.

110 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. 2. *Stenocarpella* sp. 3. Detecção. 4. Fungo. 5. Semente. 6. PCR. 7. Algodão. 8. Milho. 9. Transmissão. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título. CDD – 633.51

ELLEN NOLY BARROCAS

**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**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa
de Pós-graduação em Agronomia, área de
concentração em Fitopatologia, para a obtenção
do título de "Doutor".

APROVADA em 01 de agosto de 2008

Pesquisadora Dr ^a Marta Helena Vechiato	Instituto Biológico-SP
Prof ^a . Dr ^a . Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA
Prof ^a . Dr ^a . Antônia dos Reis Figueira	UFLA
Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro	UFLA

Prof. Dr. José da Cruz Machado
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Ao meu amado filho Lourenço,
À minha mãe guerreira, Marisa

Às minhas queridas irmãs e amigas Elaine, Aline, Laila e Helgan,

Aos meus sobrinhos Ana, Cláudio, Isabel, Luis Fernando,
Nicolau, Laura e Bento,

A todos os meus cunhados,

Ao meu incansável companheiro Anderson (Lobão)

Pelo belo exemplo que tenho de união

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao tempo que passamos aqui na terra.

À Universidade Federal de Lavras-UFLA/Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária pelo tempo liberado para o desenvolvimento da tese,

Ao professor Dr. José da Cruz Machado pelos ensinamentos e pelo carinho com que me acolheu nesses anos.

À professora Édila, pela disponibilidade de seus recursos e funcionários.

À pesquisadora Marta Helena Vechiatto, professora Antonia dos Reis Figueira, professor Hilário Antônio de Castro pela participação na banca examinadora.

Aos professores, bem como os funcionários do departamento de Fitopatologia, que foram responsáveis pela minha formação e pela amizade.

Ao Dr. Edivaldo Cia e Cláudio (Cotton Seeds) pelas sementes cedidas.

À Elenir, Rondon pelo apoio e troca de idéias.

Ao Marcelo, pela ajuda indispensável na análise estatística.

Aos amigos do LAPS Carlinha, Luana, Carol, Mirella, Biotita, Adriano, Dejânia, Ângela, Vivi, Rodrigo, Luciana, Pepe, Cláudio, Adelávio, Neto, Janaína, Chicão, Renato e Ivan pela amizade.

Aos amigos que me acompanharam durante essa etapa: Fabíola, Priscila, Graciele, Renata, Julhinho, Carzinho, Wladimir, Bruno, Lu, Betinho, Dagma, Amanda, Jadir, Ângelo, Hermínio, Pedro, Daniel, Igor.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1	
Efeitos de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de <i>Stenocarpella</i> sp. em sementes de milho inoculadas.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Aspectos gerais das doenças causadas pelos complexos <i>Colletotrichum</i> no algodoeiro e <i>Stenocarpella</i> no milho.....	5
2.1.1 Etiologia, sintomas e aspectos epidemiológicos da ramulose.....	5
2.1.2 Aspectos gerais do complexo <i>Stenocarpella</i> do milho.....	10
2.2. Técnicas empregadas na diagnose de fungos patogênicos transmitidos por sementes.....	13
2.3 Métodos convencionais.....	13
2.4 Emprego de técnicas moleculares.....	17
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO 2	
Efeitos de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em plantas de algodoeiro.....	37
1 RESUMO.....	38
2 ABSTRACT.....	39
3 INTRODUÇÃO.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÕES.....	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
CAPÍTULO 3	
Efeitos de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> em sementes de algodoeiro.....	54
1 RESUMO.....	55
2 ABSTRACT.....	56
3 INTRODUÇÃO.....	59
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.1 Origem, preparo e inoculação das sementes.....	61

4.2 Avaliação dos efeitos de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodoeiro.....	62
4.2.1 Teste de sanidade.....	62
4.2.2 Teste de emergência, Índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial e final e peso de matéria seca.....	
4.3 Determinação do índice de doença e taxa de transmissão sintomática) a partir de sementes de algodoeiro inoculadas com <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	63
4.3.1 Determinação do índice de doença.....	63
4.3.2 Taxa de transmissão sintomática.....	64
4.3.3 Análise estatística.....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
Perfil inicial das sementes.....	66
5.1 Efeito do <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> na qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro.....	66
6 CONCLUSÕES.....	78
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

CAPÍTULO 4

Detecção de <i>Stenocarpella</i> sp. em sementes de milho inoculadas, por meio de PCR.....	85
1 RESUMO.....	86
2 ABSTRACT.....	87
3 INTRODUÇÃO.....	88
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	90
4.1 Fonte dos isolados e manutenção das culturas.....	90
4.2 Preparo e inoculação das sementes	91
4.3 Extração de DNA.....	91
4.4 Amplificação da PCR.....	92
4.5 Checagem da sensibilidade e especificidade da técnica.....	93
4.6 Detecção de <i>Sternocarpella</i> sp. em sementes.....	93
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
6 CONCLUSÕES.....	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108

RESUMO

BARROCAS, Ellen Noly. **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 Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Uma das principais causas que contribuem para reduzir a produtividade das culturas do algodão e milho é a ocorrência de doenças, entre as quais a ramulose e a podridão de espiga e do colmo são destaques. São doenças cujos agentes etiológicos são transmitidos por sementes. A implementação de padrões de tolerância em programas de certificação é uma alternativa que pode auxiliar no controle dessas doenças. Para implementar esta medida, aplica-se o princípio de exclusão, que evita o plantio de sementes infectadas em novas áreas, impedindo a reintrodução dos patógenos em áreas onde ele já existe. Para que estes padrões sejam estabelecidos, é necessário que o diagnóstico seja eficiente e preciso. Metodologias, como inoculação do patógenos em plantas e uso de técnicas moleculares, podem servir como ferramentas para auxiliar na detecção de patógenos em sementes. Neste trabalho, os objetivos foram verificar o efeito da inoculação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em diferentes partes e estádios fenológicos de plantas do algodoeiro, em relação à produção de sintomas típicos da ramulose e checar a viabilidade de detecção do complexo *Stenocarpella* em sementes de milho infectadas, por meio da técnica PCR. Para avaliar a idade e a posição da planta apropriados para a inoculação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, plantas nos estádios V0, V2, B1 dias foram submetidas à inoculação na planta inteira, gema apical e planta inteira, exceto gema apical. Verificou-se que a idade mais favorável para a reprodução dos sintomas de ramulose no estádio V2, com a aplicação do inóculo em toda a planta. A inoculação direcionada especificamente na gema apical de plantas de algodão não foi capaz de induzir a formação de sintomas de superbrotamento ou encurtamento de internódios de nenhuma das plantas avaliadas. Para avaliar o efeito do *C. gossypii* var. *cephalosporioides* sobre o desempenho das sementes, foram consideradas as variáveis germinação em substrato e rolo de papel, índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial e final, altura de plantas, peso de matéria seca, índice de doença, incidência e taxa de transmissão sintomática por meio de cultivos em bandejas plásticas. Verificou-se que, à medida que aumentou o tempo de exposição das sementes ao patógeno, diminuiu a porcentagem de plantas emergidas para os dois genótipos utilizados nesse ensaio. Quando se avaliou a semente osmocondicionada na ausência de

patógenos, foi possível observar decréscimo da porcentagem de plantas a partir do tempo de 24 horas de condicionamento osmótico nos dois genótipos. A germinação em rolo de papel diminuiu à medida que se aumentou o tempo de exposição para a cultivar Delta Pine Acala 90, não havendo modificação para a linhagem IAC 2233. O vigor dos dois genótipos decresceu com o aumento do tempo de exposição, mas a linhagem resistente apresentou menor vigor. O vigor das sementes osmocondicionadas sem fungos apresentou redução a partir do tempo de 24 horas de condicionamento. Estande inicial e final, tanto em sementes inoculadas como somente osmocondicionadas, foram reduzidos com o aumento do tempo de exposição, mas o vigor de sementes inoculadas foi menor. Observaram-se os mesmos resultados para análise de matéria seca, com diferenças menores entre sementes inoculadas ou não na linhagem 2223. Para o índice de doença foi observado aumento gradual para os dois materiais. Foi observado aumento gradativo no índice de doença na cultivar suscetível e aumento menos acentuado para a linhagem resistente. O mesmo padrão foi observado para o índice de infectividade aparente. Para avaliar a detecção do complexo *Stenocarpella* em sementes de milho, as mesmas foram infectadas pela técnica do condicionamento osmótico por 72 horas com níveis de 100%, 20%, 10%, 2%, 1% e 0% de infecção. Os *primers* utilizados foram sensíveis para detectar até 2% de sementes infectadas, mas não foram sensíveis para distinguir as espécies de *Stenocarpella*. O estudo também mostrou que a técnica foi sensível para detectar o patógeno, tanto em cultura pura como em associação com sementes. A concentração de DNA necessária para a detecção de *Stenocarpella* sp. em cultura pura foi de 10 ng.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Co-orientadora)

ABSTRACT

BARROCAS, Ellen Noly. **Effects of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* on seeds and plants of cotton and detection of *Stenocarpella* sp in infected seeds of maize by PCR technique.** 2008. 110 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Phytopathology)-Federal University of Lavras.*

One of the major causes of yield reduction in cotton and maize crops is the occurrence of diseases of which ramulosis and stalk and ear rots are some of the most important. Those are diseases of which their causal agents are seed transmitted and disseminated to variable distance in nature. The establishment of health standards for those pathogens in seed certification programs is an alternative which may help in the prevention of those diseases in practice. By using health seeds of both crops production is certainly higher and sustainability of these activities longer. To set seed health standards it is necessary to make available methods for the detection of the pathogens in seed samples, looking for accuracy and less time consumption in routine analysis. Adequate methodology of inoculation and use of molecular techniques may be of great help in the diagnosis of diseases whose pathogens exhibit similar characteristics in culture. That is the case of both pathosystems under investigation in this study. In this work the purposes were to find an inoculation method which would be able to reproduce the typical symptoms of ramulosis on developing cotton plants and to evaluate the relation between infected seeds two materials with different level of resistance to the pathogen and the performance of this interaction under favorable conditions for the seeds and for the disease development. In addition, this work aimed at checking the viability of use PCR technique for the detection of *Stenocarpella* sp in association with maize seed. For this work, plants with phenological growth stages of V0, V2 e B1 were inoculated with *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* by the application of inoculum on three different positions of the plants. Inoculation of plants on the V2 stage with application of inoculum on the whole plant, was the most adequate method to reproduce the typical symptoms of ramulosis in cotton. An interesting finding was the fact that the pontual inoculation of the apical shoot of plants did not induce the typical symptoms of the disease in the present work. About the effects of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* on the performance of two cotton materials, with different levels of resistance to ramulosis, it was verified that at the highest inoculum potentials the effects of the pathogen on the performance of the infected seeds was higher on the susceptible material, but the increase in the potential did not follow the same proportion of the effects on both hosts. This

work showed also that the transmission based on apparent symptoms of ramulosis was observed in both hosts following the same patterns in relation to increased inoculum potential. Osmopriming of seeds in both cotton materials caused reduced in the performance of the seeds after 24 h incubation, but the reduction rates were lower than in infected seeds. By the roll paper test the germination of seeds in the susceptible cotton material was gradually lower with the increase of the inoculum and was not increased in the resistant material for the same period of incubation. In relation to vigor, the two cotton materials presented lower values with the increase of the inoculum potential, but the reduction was lower in the resistant material. Dry weight of emerged plants and disease index followed the same pattern as observed for vigor, except that the values for the resistant cotton material were always lower than the values of the susceptible material. The evaluation by the PCR technique to detect *Stenocarpella* in association with maize seeds revealed that this procedure was able to detect both species with a sensibility of 2% incidence of them in the seed sample. But the primers used in this work were not able to distinguish the two species. This study showed that the PCR technique was also able to detect both fungi in culture and in association with infected maize seeds. The required concentration of DNA for such detection was 10ng.

* Guidance Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Co-orientadora)

CAPÍTULO 1

**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**

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil vive um momento de expressiva conquista na agricultura. A contribuição do agronegócio no PIB brasileiro é da ordem de 25% (Agência Brasil-Empresa Brasileira de Comunicação, 2008). O ganho em produtividade tem ampliado sua participação na geração de divisas, consagrando o Brasil como um dos maiores produtores agrícolas no mundo. E é graças, principalmente, ao setor primário que esse desempenho tem sido possível.

A lista de obstáculos ao progresso agrícola em nosso país é, entretanto, substancial, alguns advindos de condições externas e outros com características internas inerentes a cada cultura. A ocorrência de doenças em culturas de valor econômico constitui um desses entraves para o ganho de produtividade e o desenvolvimento da agricultura sustentável.

O comércio agrícola favorece a dispersão de doenças entre regiões, países e continentes, por isso barreiras fitossanitárias rigorosas têm sido estabelecidas. A associação de patógenos com sementes é uma preocupação crescente, devido aos reflexos desastrosos, sobretudo para aquelas cujo plantio é feito em larga escala, como as culturas de algodão e milho.

Dentre as doenças que mais têm causado danos e prejuízos a essas culturas estão a ramulose do algodoeiro, causada pelo complexo *Colletotrichum* e a podridão-do-colmo e a da espiga em milho, causada pelo complexo *Stenocarpella*. Diante da importância das espécies *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *S. maydis*, tornaram estes patógenos em organismos com potencial a ser enquadrados na proposição de tolerância em sementes, elaborada para o Brasil (Pozza & Machado, 2005).

Para a implementação de programas de certificação é necessário uma série de trabalhos que respondam a questões relativas à detecção com confiança e rapidez, além de transmissibilidade, disseminação do patógeno, dentre outros.

A diagnose de doenças que ocorrem em complexo é sempre um desafio. Para *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, existem dificuldades de distinção em relação a *C. gossypii*, causador da antracnose do algodoeiro, apresentando ambos características morfológicas e culturais bem semelhantes, mas sintomas no campo bem distintos. Para esse patossistema, o estabelecimento de metodologias de inoculação pode auxiliar na diferenciação dessas doenças.

Para a diferenciação de espécies, no caso do complexo *Stenocarpella*, utilizam-se critérios morfológicos e culturais que, muitas vezes, não são confiáveis. A variação do patógeno pode ser uma dificuldade, assim como o tempo necessário para o crescimento de estruturas que permitam identificar o patógeno com confiança. A utilização de técnicas moleculares pode ser uma alternativa viável para a solução desse tipo de problema.

Com a utilização de *primers* específicos para espécies do gênero *Stenocarpella* é possível aprimorar as técnicas de detecção ao ponto desejável de realizar esta operação diretamente nas sementes, agilizando o processo de diagnose.

Dentro dos critérios de transmissão, existe a necessidade de definir modelos de avaliação, principalmente em relação à infecção para cada patossistema e condições, uma vez que inúmeros fatores podem influenciar a transmissão. Nesses patossistemas, é preciso conhecer os efeitos que os fungos exercem sobre as plantas hospedeiras, quando estão presentes nas sementes em diferentes potenciais.

Neste trabalho procurou-se avaliar o efeito de sementes infectadas com diferentes tempos de exposição ao fungo *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e sua relação com linhagem resistente e cultivar suscetível à ramulose; estabelecer

metodologia segura para a inoculação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, causador da ramulose do algodoeiro e desenvolver metodologia de detecção, em sementes, para espécies do gênero *Stenocarpella*, utilizando isolados brasileiros.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste trabalho são destacadas as relações de patógenos transmitidos pelas sementes das culturas de milho e algodão, diante da importância que têm no cenário nacional. As sementes dessas culturas podem veicular diferentes fitopatógenos, possíveis de causar severos danos nestes cultivos. Dentre eles são abordadas duas doenças de especial interesse: a ramulose-do-algodoeiro, causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e a podridão-do-colmo e da espiga do milho, causada pelo complexo *Stenocarpella*.

2.1 Aspectos gerais das doenças causadas pelos complexos *Colletotrichum* no algodoeiro e *Stenocarpella* no milho

2.1.1 Etiologia, sintomas e aspectos epidemiológicos da ramulose

A ramulose, ou superbrotamento do algodoeiro, é uma doença de grande importância econômica, principalmente para a região Centro-Oeste, onde sua incidência continua aumentando ao longo dos anos. As principais causas para o agravamento da doença são a diminuição do nível de resistência das cultivares mais utilizadas na região, ITA 90/Delta Pine Acala 90, e também a utilização de sementes de baixa qualidade, muitas vezes infectadas pelo fungo (Cia, 2002).

O agente da ramulose, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A.S.Costa, pertence ao filo Ascomycota, grupo Coelomycetes. O gênero *Colletotrichum* é conhecido como causador de antracnose (Bailey & Jeger, 1992), mas a variedade *cephalosporioides*, causadora do sintoma de superbrotamento, descrita por Costa & Fraga Júnior (1937) no estado de São Paulo, não apresentava este tipo de sintomas entre os causadores da antracnose.

A ramulose apresenta sintomas diversos, mas a relação entre eles não é bem entendida (Metha et al, 2005; Metha & Menten, 2006). No início do desenvolvimento da plântula, pode ocorrer tombamento de pré e pós- emergência,

causando redução do estande. Nas folhas, podem ocorrer lesões necróticas nos bordos, no limbo foliar e nas nervuras, formando perfurações de forma estrelada. O crescimento desigual do tecido provoca enrugamento da folha e rompimento das lesões. As lesões no pecíolo da folha ou na haste principal da planta podem provocar a queda das folhas. Posteriormente, observam-se ramificações dos galhos, internódios curtos e intumescidos, deixando a planta com aspecto ramalhudo de superbrotamento, comprometendo a frutificação. (Abrahão & Costa, 1949; Abrahão, 1961; Costa & Fraga, 1937; Kimati, 1980; Juliatti & Ruano, 1997; Cassetari, & Machado, 2005; Mehta & Menten, 2005; Cia & Fuzatto, 2006).

O agente da ramulose, muitas vezes, é confundido com *Colletotrichum gossypii*, agente da antracnose do algodoeiro. Como ambos são transmitidos por sementes, 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).

Pela sintomatologia, *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* se mostram distintos (Costa & Fraga Junior, 1937). A sintomatologia descrita para *Colletotrichum gossypii* é a de lesões escuras e deprimidas nas maçãs do algodoeiro, envolvendo todo o fruto. Dessa forma, o fungo infecta as sementes que, posteriormente, originam planta com lesões avermelhadas na região do colo e raiz enegrecida. Dependendo das variedades de algodoeiro empregadas, as planta podem reagir ou morrer, provocando reduções no estande (Bitancourt, 1935; Pizzinato, 1987; Dudienas, 1990; Teixeira, 1995).

Apesar da sintomatologia mencionada e dos critérios morfológicos distintos, observa-se intensa variação entre isolados, inclusive de agressividade, e nem sempre se consegue discernir com clareza quais são os patógenos envolvidos (Dudienas, 1990; Tanaka, 1990; Chitarra, 1996, Iamamoto, 2002; Silva-Mann, 2002).

Diversos autores desenvolveram trabalhos visando à diagnose precisa entre os dois agentes, mas, em geral, não houve consistência de resultados. Ottonello (1992), estudando características culturais, patogênicas e sorológicas sugeriu 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. Mas, a sugestão não se aplica, uma vez que não existem cultivares diferenciadoras para a diferenciação de raças nem trabalhos moleculares que sugiram essa diferença.

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). Estudos de variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* em algodoeiro foram realizados, na maioria, baseados em polimorfismo de fragmentos amplificados aleatoriamente (Chitarra, 1996; Vieira, 1996, Mehta et al., 2005; Silva-Mann et al., 2002a, b) e padrões isoenzimáticos (Vieira, 1996; Carvalho et al., 1997), portanto, com informações pouco conclusivas, principalmente quando visa o desenvolvimento de *primers*. Carvalho (2005) também não conseguiu diferenciar isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporoides* e *C. Gossypii*, com base em estudos das regiões ITS 1, 5,8 S e ITS 2 do DNA ribossomal.

A transmissão de patógenos por sementes pode ocorrer da planta à semente e da semente à planta. No último caso, a semente pode veicular o patógeno, mas poderá não desencadear a doença, já que a associação do patógeno com sementes nem sempre assegura a ocorrência de doença e a transmissão ocorre somente se houver o estabelecimento do patógeno (Neergaard, 1976).

Patógenos sobrevivem por mais tempo em associação com sementes, além de manterem sua viabilidade e características originais nessas condições (Tanaka & Machado, 1985). No caso de espécies de *Colletotrichum* do algodoeiro, podem se associar à semente no tegumento, ou embrião, já que é um

fungo capaz de infectar tecidos vivos ou mortos, influenciando de forma negativa a germinação por meio da redução do tamanho da semente, do vigor e da morte da planta antes de emergir (Gleason & Ferriss, 1987).

A extensão da colonização da semente e o efeito que esta possa ter na transmissão vão depender de características específicas da interação patógeno hospedeiro. Vários fatores influenciam a transmissão, como a quantidade e a posição do inóculo, a temperatura, a umidade, a microflora do solo, o tempo de sobrevivência do patógeno na semente e o genótipo do hospedeiro, dentre outros (Tanaka & Machado, 1985; Machado, 1994; Shah & Bergstrom, 2000). Araújo et al. (2006), quando avaliaram diferentes temperaturas e potenciais de inóculo em sementes infectadas por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, concluíram que a intensidade da doença não é influenciada pelo tempo de exposição, mas a temperatura foi fator determinante para a transmissão do patógeno. Quanto à diferença de genótipos, Tanaka (1990) e Pizzinato et al. (1991) encontraram taxas de transmissão variáveis de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro, dependendo do grau de resistência do hospedeiro

Em alguns patossistemas, sementes severamente colonizadas podem não germinar e morrer, enquanto sementes não tão severamente atacadas podem contribuir para a transmissão do patógenos para a parte aérea. Em outros patossistemas, sementes muito colonizadas não necessariamente resultam na morte da semente ou da plântula e podem ser correlacionadas com alta transmissibilidade (Vishunavat & Kumar, 1993, Gilbert et al. 1995, citados por Shah & Bergstrom, 2000).

Um aspecto importante das espécies do gênero *Colletotrichum* que são transmitidos por sementes é a habilidade de serem transmitidas para a parte aérea da planta, onde ocorre esporulação com lesões características. Essa transmissão aérea pode ser influenciada pelo tipo de germinação epígea ou hipógea (Agarwal

& Sinclair, 1987). No caso do *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides*, o fungo pode ser levado para a parte aérea por meio dos cotilédones.

A transmissão pode ocorrer quando as primeiras folhas entram em contato com os mesmos, que servem como fonte de disseminação de esporos para outras plantas. Os esporos são disseminados e inoculados em tecidos da mesma planta e de plantas vizinhas. A partir daí, o progresso da doença pode ser rápido, se o ambiente for favorável à epidemia e, quanto maior a incidência do patógeno nas sementes, maior será o número de focos no campo de cultivo (Maffia et al. 1988). Por isso, é importante considerar a eliminação ou a redução da infecção via semente.

No caso de fungos mitospóricos, incluindo espécies do gênero *Colletotrichum*, que produzem esporos em acérvulos e dispersos por respingos de chuva, eles produzem doenças do tipo policíclica (Maude, 1996), podendo gerar epidemias. Muitas vezes, a taxa de transmissão, em condições naturais, pode ser baixa, mas cada planta doente representa um foco dentro da área de cultivo, promovendo a disseminação da doença. *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose do feijoeiro, é um exemplo que ilustra o fato de que poucas sementes infectadas podem determinar danos incalculáveis à cultura (Talamini et al., 2001). Como o agente raramente causa a morte de sementes na fase pré-emergente no solo e se dispersa de forma explosiva a partir de plantas jovens infectadas, é recomendado o controle desses patógenos, enquanto permanecer na semente (Machado, 1994).

Altos níveis de severidade da doença nas folhas levam, subsequentemente, à maior disponibilidade de inóculo para infectar a semente. Dessa forma, a infecção da semente vai ocorrer próximo ao fim da epidemia na área foliar (Shah & Bergstrom, 2000). Para *C. gossypii* var. *Cephalosporioides*, o período mais favorável para que ocorra transmissibilidade para a sementes é

quando a planta, com maçãs formadas, é inoculada (Lima et al., 1985; Tanaka, 1990; Tanaka & Menten, 1992; Santos et al., 1993).

Para entender a transmissibilidade de um patógeno via sementes é importante determinar a taxa de infectividade entre semente e planta. Ela corresponde à relação entre a incidência do patógeno na semente, determinado pelo teste de sanidade e a severidade da doença na planta (Machado & Pozza, 2005). É importante lembrar que a taxa de transmissão é um parâmetro usado para estimar a transferência do patógeno de uma geração para outra, não levando em consideração a disseminação entre plantas, que também é outro fator importante, no caso do *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Entender as particularidades da transmissão é importante, por gerar subsídios para o estabelecimento de padrões de tolerância dentro do processo de certificação de sementes. Entende-se por padrões o número mínimo de plantas infectadas, acima do qual os surtos epidêmicos são iminentes (Hewett, 1987; Machado, 1994). A tarefa dessa determinação envolve outros estudos, além da transmissão, como trabalhos de determinação de modelos de desenvolvimento das doenças e métodos precisos de diagnose, dentre outros.

2.1.2 Aspectos gerais do complexo *Stenocarpella* do milho

A podridão do colmo e da espiga é uma importante doença do milho e está amplamente distribuída em todos os locais onde este cereal é cultivado, no Brasil, notadamente nos estados do Sul, do Sudeste e do Centro-Oeste, com intensidade e severidade variadas entre as regiões e, mesmo, dentro da mesma região (Reis & Casa, 1999, 2000; Pinto et al., 1997; Pinto, 2006). Ela é causada por um complexo de fungos, dentre eles as espécies *Stenocarpella maydis* [Sin. *Diplodia* (Berkeley) Saccardo; *D. zae* (Schweinitz) Leveille] e *S. macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earl] (Sutton, 1980), pertence ao filo

Ascomycota, grupo Coelomycetes. A espécie *S. macrospora* ainda está envolvida com a mancha-de-macrospora nas folhas.

Não se conhecem raças de *S. maydis* e *S. macrospora*, mas parece haver certa variabilidade e ação antagônica entre elas. Mario et al. (2003), ao avaliarem reação de híbridos de milho à podridão branca, inocularam uma mistura de isolados de *S. maydis*, mas observaram maior incidência de *S. macrospora* do que de *S. maydis* nos grãos. Casa et al (2006) também relataram a recuperação de somente uma espécie em sementes apodrecidas quando, na verdade, as duas haviam sido inoculadas.

Ambas as espécies de *Stenocarpella* podem infectar os grãos de milho e, quando o fazem em alta frequência e severidade, causam a doença denominada podridão-branca-da-espiga. Os grãos de milho infectados por tais fungos são denominados “grãos ardidos” (Pinto, 2006). Os grãos ardidos, além de impróprios para o consumo e para a formulação de rações, podem estar contaminados por micotoxinas. Cutler et al. (1980) atribuem a produção da toxina diplodiol ao fungo *S. macrospora*, enquanto que *S. maydis* produz a toxina conhecida como diplodiatoxina (Pinto, 2006), ambas responsáveis por relatos de mortalidade de frangos.

Quando ocorre a infecção dos grãos, eles adquirem aspecto marrom, podendo ocorrer a formação de micélio branco entre as fileiras de grãos. A doença inicia-se pela base ou pela ponta da espiga e ocorre a formação de picnídios nos grãos e na palhada, que se localizam imersos nos tecidos.

As espécies de *Stenocarpella* são necrotróficas e sobrevivem em restos de cultura, como micélio dormente no interior das sementes e livre no solo, sob a forma de conídios ou de micélio dormente (Flett & Wehner, 1991; Flett et al., 1992; Pinto et al., 1997). Em sistemas de plantio direto e monocultura, sobretudo sem rotação de culturas, a severidade pode ser maior, uma vez que promovem a manutenção do inóculo no local, facilitando a disseminação da doença. Em

lavouras com fertilidade desbalanceada, problemas de drenagem, danos mecânicos, alta densidade de plantios, cultivares suscetíveis também podem ocasionar incremento na severidade. Segundo Blum et al. (2003), plantios adensados favorecem o aumento da doença, já que ocorre a redução fotossintética da planta, fragilizando os colmos e facilitando a infecção.

A semente desempenha papel fundamental na transmissão e na disseminação das espécies de *Stenocarpella*. A infecção das espigas ocorre em regiões com excesso de chuva no período compreendido entre a fecundação e a colheita. Uma vez que o micélio dormente esteja presente no pericarpo, no endosperma ou no embrião, ele pode reiniciar seu crescimento no momento do plantio, gerando focos de disseminação dos patógenos (Casa et al., 2005, 2006).

A doença pode, ainda, comprometer o desenvolvimento normal da planta e a translocação de água e de nutrientes do solo para os órgãos aéreos, promovendo o acamamento e a morte prematura das plantas (Chambers, 1988; White, 1999; Blum et al. 2003; Casa et al., 2003a; Casa et al., 2006). O contato da espiga com o solo favorece a contaminação dos grãos com outros fungos, além de afetar o rendimento potencial e a qualidade dos grãos e impedir a colheita mecânica.

Normalmente, a doença causada por *S. maydis* é mais severa em regiões com altitudes acima de 700m, temperaturas moderadas e, sobretudo, alta umidade e menos severa em regiões quentes, com altitudes abaixo de 500 m, quando ocorre o aparecimento de *S. macrospora*. Silva & Juliatti (2005) avaliando a temperatura de germinação em colmos de milho, para as duas espécies, concluíram que temperaturas entre 28°C e 33°C propiciaram a maior porcentagem de germinação dos conídios de *S. maydis*, enquanto os conídios de *S. macrospora* apresentaram maior germinação na faixa de temperatura entre 26°C e 29°C.

2.2. Técnicas empregadas na diagnose de fungos patogênicos transmitidos por sementes

2.2.1 Métodos convencionais

A medida mais efetiva de controle, quando se trata de patógenos transmitidos por sementes, emprega o princípio de exclusão (Neegaard, 1976; Schaad et al., 1997; Schaad & Frederick, 2002; Schaad et al., 2003; Walcott, 2003). Seu fundamento baseia-se na prevenção da entrada e no estabelecimento de um patógeno em uma área. Para que essa medida tenha êxito, o uso de sementes sadias é fator da maior importância, já que, na maioria das culturas, utilizam-se sementes como material propagativo.

A correta diagnose dos patógenos é, portanto, uma das ferramentas básicas no controle de doenças transmitidas por sementes (Shaad et al., 1997). Diferentes trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos nessa linha, investigando metodologias que auxiliem na correta detecção, na identificação e até na quantificação de patógenos (Ebbels, 2003), utilizando diferentes métodos, combinados entre si ou não. 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 com um nível aceitável de confiança para a implementação em programas de certificação de qualidade.

O preciso diagnóstico pode servir como suporte para implementar limites de tolerância nos programas de certificação e quarentena, para a tomada de decisões quanto à necessidade de tratamentos de sementes, na determinação da qualidade das sementes, na investigação de baixa germinação, na avaliação do potencial da semente para armazenagem, em programas de melhoramento, visando resistência a doenças, além de indicar o valor das sementes para plantio e

monitoramento da ocorrência de microrganismos em lotes de sementes em função da região, da época de plantio e das cultivares (Maude, 1996; Machado, 1988).

Os critérios utilizados para a detecção de fungos em sementes seguem, de modo geral, as mesmas regras aprovadas pela International Seed Testing Association (ISTA) e, em sua maioria, consistem em estimular os microrganismos a produzirem estruturas que permitam a sua identificação.

Os métodos utilizados em análises de rotina, na detecção de patógenos, baseiam-se em diferentes aspectos que variam desde análise visual da amostra e da fração impura, exame microscópico da suspensão proveniente da lavagem de sementes, exame de embriões, método do rolo de papel, incubação em meios semi-seletivos, incubação em substrato de papel de filtro ou *blotter test* (Neergaard, 1976) e testes serológicos, no caso de sementes que transmitem vírus.

Estes métodos, apesar de padronizados, como testes de rotina, apresentam limitações quando existe a necessidade da diagnose em nível de espécies, subespécie, variedades e raças (Iacomi-Vasilescu et al., 2002; Konstantinova et al., 2002; Taylor et al., 2001; Bates et al., 2001; Guillemette et al., 2004; Xia & Achar, 2001; Jonsson et al., 2000; Shi et al., 1996; Assigbetse et al., 1994; Tanaka, 1995; Vieira, 1996; Tanaka & Menten, 1988).

Na tentativa de resolver o problema, diversas metodologias têm sido adotadas em diferentes patossistemas, para que possam aumentar a confiança da diagnose de patógenos em sementes. Para o complexo *Colletotrichum* no algodoeiro, Tanaka et al. (1996) e Chitarra (1996) estudaram a diagnose com base no hábito de crescimento, mas encontraram resultados variáveis quanto à distinção de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Dudienas (1990), em testes visando à caracterização auxanográfica, verificou que o agente causador de ramulose mostrou-se deficiente nos aminoácidos asparagina ou ácido aspártico, mas não considerou segura sua diagnose, devido à grande variabilidade

dos isolados. Ottonello (1992), estudando características culturais, evidenciou diferença fisiológica entre os dois grupos, porém, relatou a presença de isolados com características intermediárias.

Quando se avalia a diagnose das espécies *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora*, causadoras da podridão-do-colmo e da espiga, teoricamente, parece não haver muita dificuldade, visto que as duas espécies podem ser diferenciadas com base na forma, no tamanho, no número de células, na cor de conídios, na coloração das colônias (Reis et al., 2004) ou no teste de papel de filtro (Casa et al., 2006; Mario & Reis, 2001). A diferenciação das duas espécies, por meio da análise do tamanho de conídios, define *S. macrospora* com conídios 44-82 x 7,5-11,5 µm, com 1 a 3 septos e 2 a 3 vezes maiores que os conídios de *S. maydis*, na maioria das vezes, com apenas 1 septo (Sutton, 1980).

Mário & Reis (2001) desenvolveram método de coloração de colônias para a distinção das espécies. A diagnose é realizada por comparação da cor das colônias dos fungos, desenvolvidas sobre o papel de filtro, 15 dias após a incubação das sementes. As colônias de *S. maydis* são brancas e pardo-escuras, com formação de picnídios e as colônias de *S. macrospora* permanecem com a coloração branca e bege. Mas, no trabalho, não é mencionado quantos isolados diferentes foram utilizados. Na prática, também parece haver dificuldades na diagnose, não somente para diferenciar as espécies de *Stenocarpella*, como também em separá-las de outros agentes.

Os resultados dos testes de detecção em grãos e em sementes de milho revelam maior frequência na incidência de *S. maydis* (Oliveira & Mello, 1986; Reis et al., 1995). Contudo, é possível que esteja havendo confusão na identificação das duas espécies, em que *S. macrospora* está presente e é detectada como *S. maydis*. A diferenciação desses dois fitopatógenos, com base em características fenotípicas, pode resultar em erros de identificação dos mesmos, em testes de rotina, devido à variabilidade fenotípica dos isolados, (Freitas,

2006). Casa (1997) encontrou dificuldades em separar as duas espécies utilizando o critério da coloração do micélio jovem. Doorance (1999), comparando 47 isolados de *S. maydis*, encontrou variação entre as colônias, mas não encontrou variação quando comparou os mesmos isolados por características enzimáticas.

Na análise de rotina, a presença de outros microrganismos associados às sementes incubadas pode apresentar maior potencial de competição nessas condições, o que prejudica a identificação e a detecção de *S. maydis* e de *S. macropora*, resultando em níveis de detecção subestimados. Além disso, o tempo de 15 dias é muito longo, quando ocorre a formação de picnídios que possibilitam a correta distinção entre as espécies de *Stenocarpella* envolvidas.

Em relação a outros patossistemas, inúmeras outras dificuldades ainda constituem desafio para as pesquisas em patologia de sementes. Muitas espécies de fungos proximamente relacionadas encontram similaridade de características morfológicas, dificultando a identificação precisa, como é o caso de espécies de *Phomopsis* em sementes de soja, *Drechslera* em sementes de arroz e trigo e *Fusarium* sp. em sementes de feijão e algodão.

Iacomí-vasilescu et al. (2002) relatam a dificuldade de se distinguir *A. brassica*, *A. brassicicola*, *A. japonica* e espécies saprófitas de *Alternaria* em sementes de crucíferas, quando avaliaram somente característica morfológica. O mesmo fato é citado por Konstantinova et al. (2002), quando avaliaram *A. radicina* e *A. dauci* em sementes de cenoura.

Aliado ao problema de similaridade entre espécies ainda existe a dificuldade de diagnose quando o patógeno apresenta crescimento lento, como é o caso de *Sclerotinia sclerotiorum* necessitando de longos períodos de incubação.

2.2.2 Emprego de técnicas moleculares

Com o advento da biologia molecular, técnicas mais sensíveis e precisas têm sido desenvolvidas. Como proporcionam alto grau de especificidade, visto que estão diretamente relacionadas com os genomas dos organismos (Martin et al. 2000, Jaccoud et al., 2002), complementam estudos que necessitam de critérios mais acurados.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) 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). Essa técnica tem sido utilizada com diversas aplicações, incluindo o diagnóstico de doenças. Para a PCR, os *primers* (pequenas sondas de oligonucleotídeos) são desenhados para anelar em regiões específicas do organismo alvo. Dessa forma, é possível reproduzir milhões de cópias de uma determinada região e o DNA pode ser observado por meio de eletroforese.

O DNA ribossomal (rDNA) é uma região do DNA nuclear codificante de ribossomos e suas seqüências têm sido muito utilizadas em sistemática de fungos, para identificar espécies e para determinar raças ou origem geográfica.. Os ribossomos são organelas responsáveis pela síntese de proteínas nas células e consistem de duas subunidades, uma pequena e outra grande. Um único gene codifica a subunidade pequena, *the small subunit* (SSU), a subunidade grande, *the large subunit* (LSU) e a região 5.8s. O gene é interrompido pelas regiões espaçadoras internas do rDNA – *Internal Transcribed Spacer* (ITS), que se repetem por várias vezes no cromossomo (Gardes & Bruns, 1993). Geralmente, são bem conservados entre os fungos e podem identificar seqüências do DNA de certos organismos específicos, como determinadas espécies de patógenos.

Isso é interessante para identificar uma seqüência particular de interesse, mesmo quando em associação com outros organismos ou em baixos níveis de infecção. É ainda facilmente amplificada, já que está compreendida entre 600 e 800 pares de base com *primer* universal, complementar à seqüência dos genes do rDNA (White et al., 1990). Além disso, a região ITS do rDNA é bem conservada dentro de uma mesma espécie de fungo e com relativo grau de polimorfismo entre espécies (Gardes et al., 1991; Baura et al., 1992; Lee & Taylor, 1992; Gardes & Bruns, 1993; Iacomini-Vasilescu et al., 2002; Martin & Rygiewicz, 2005). Como o genoma do fungo contém muitas cópias idênticas do rDNA, então, essa região constitui um ótimo alvo para os programas de detecção molecular.

Para a patologia de sementes, a técnica de PCR, associada a outras técnicas, tem sido utilizada com sucesso para o diagnóstico. A técnica de PCR possibilita a diagnose de espécies que apresentam difícil distinção por meio de marcadores morfológicos, fungos com reduzida esporulação, que produzem micélio estéril e os suprimidos por fungos de crescimento mais rápido (Taylor et al., 2001; Iacomini-Vasilescu et al., 2002; Jaccoud et al., 2002).

Konstantinova *et al.* (2003) desenvolveram *primers* específicos, a partir da técnica de RFLP, para a distinção de *Alternaria dauci*, *A. alternata* e *A. radicina*, em sementes de cenoura. Guillemette et al. (2004) obtiveram sucesso na detecção específica de *Alternaria brassicae* em sementes de crucíferas. Pryor et al. (2001), por meio de *primers* obtidos em RAPD combinado com PCR, obtiveram detecção de 0,3% de *Alternaria radicina* em sementes de cenoura naturalmente infectadas e 0,1% em sementes artificialmente infestadas. Iacomini-Vasilescu et al. (2002) desenvolveram método diagnóstico preciso na detecção de *A. brassicicola* e *A. japonica* em sementes de crucíferas, a partir de *primers* desenvolvidos utilizando-se alinhamento de regiões ITS depositadas no banco de genes.

Taylor et al. (2001) desenvolveram *primers* específicos, da região ITS, na detecção de *Pyrenophora graminea* em sementes de cevada. Bates et al. (2001) identificaram, detectaram e quantificaram as espécies *Pyrenophora graminea* e *P. teres*, em sementes de cevada, por meio de PCR em tempo real.

A técnica de PCR também pode ser usada para estimar o potencial toxicológico dos fungos e identificar plantas e sementes infectadas sem sintomas. Knoll et al. (2002) desenvolveram uma técnica rápida para a detecção de espécies de *Fusarium*, potenciais produtoras de micotoxinas, em cereais. Pasquali et al. (2004), identificando um novo grupo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* em margaridas, puderam identificar a presença do patógeno cinco dias após a inoculação artificial. Os sintomas, normalmente, aparecem a partir do décimo terceiro dia para PCR em tempo real. Lee et al. (2001) detectaram *Rhynchosporium secalis* em sementes de cevada sem sintomas. Ioos et al. (2007) verificaram a presença de *Plasmopara hastedii* em sementes de girassol infectadas, sem comprometimento do tamanho.

Apesar da grande sensibilidade da técnica de PCR convencional, os trabalhos envolvendo a diagnose de patógenos associados a sementes encontram dificuldades na detecção de patógenos em sementes, quando estão com baixos níveis de infestação/infecção (Konstantinova et al., 2002). Para contornar o problema, diversos autores utilizam a BIO-PCR, que tem o objetivo de enriquecer a biomassa do fungo na semente, para aumentar a sensibilidade da técnica (Pryor & Gilbertson, 2000). A BIO-PCR envolve etapas, como extração da amostra, plaqueamento no meio de cultura, adição em meio líquido, incubação e centrifugação do meio para a retirada da biomassa. Apesar do acréscimo de mais uma etapa ao processo, para muitos fungos ela é necessária. Para o diagnóstico de *Magnaporthe grisea* em sementes de arroz infestadas é necessária a sua incubação em meio batata dextrose ágar (BDA), por 48 horas, a 25°C, sob agitação constante (Chadha & Gopalakrishna, 2006). Vechiato et al. (2006)

utilizaram o tempo de 7 dias para a detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja. Para a detecção de *Ascochyta rabiei* em grão-de-bico é necessária a incubação das sementes por 18 horas em meio Czapek-Dox (Phan et al., 2002).

A BIO-PCR possui vantagens sobre a PCR convencional, incluindo o aumento de sensibilidade e a 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 saprófitas que podem interferir na detecção do organismo alvo (Schaad et al.1997; Pryoy et al., 2001; Jaccoud et al., 2002; Walcott, 2003; Dombrowski et al., 2006).

Outro problema associado à detecção de patógenos em sementes é a presença de inibidores. As sementes possuem, como constituintes naturais, taninos, componentes fenólicos e 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). A presença de inibidores foi problema para a diagnose de *Alternaria radicina* em sementes de cenoura, mesmo com o acréscimo de tempo de incubação de 5 dias (Pryor & Gilbertson, 2001). Nesse mesmo trabalho, o problema foi minimizado com a utilização de leite desnatado (Difco Laboratories; 10% de solução em água estéril). Outros reagentes, como clorofórmio e fenol, são recomendados para a precipitação de alguns inibidores (Walcott, 2003). O uso de kits comerciais também tem se apresentado como um poderoso aliado para extração de DNA de sementes com componentes inibidores (Guillemette et al., 2004). Dombrowski et al. (2006) não observaram a presença de inibidores quando o DNA das sementes de azevém foi extraído com o kit comercial DNEasy.

A introdução da técnica de PCR em tempo real, nos últimos anos, facilitou o desenvolvimento de trabalhos de quantificação. Durante o

desenvolvimento do método, é medido o acúmulo dos produtos da PCR, o que permite sua quantificação (McCartney et al., 2003). Quando comparado com o PCR convencional, apresenta vantagens como maior rapidez, redução do risco de contaminações cruzadas, eliminação da eletroforese para determinar os resultados da PCR, quantificação do patógeno e diagnóstico de vários patógenos ao mesmo tempo (PCR multiplex). Essas vantagens podem ser promissoras para a detecção de patógenos em sementes.

Guillemette et al. (2004), comparando o uso do PCR convencional com o PCR em tempo real para a detecção de *Alternaria brassicae* em sementes de crucíferas, detectaram 2% de sementes infestadas no PCR em tempo real. Bates et al. (2001) utilizaram o PCR em tempo real para a detecção de espécies de *Pyrenophora* em sementes de cevada infectadas e, concomitantemente, quantificaram o nível de infecção de *P. teres*. Esse nível apresentou boa correlação com o nível de infecção nas sementes, avaliado no *Blotter Test*. Bates et al. (2001b), por meio da técnica *Scorpions Amplified Refractory Mutation System* (ARMS), com PCR em tempo real, conseguiram, em uma mesma reação, distinguir *P. teres* de *P. graminea*, patógenos com alta semelhança entre si. Mc Neil et al. (2004), por meio de modelos de calibração, determinaram quantificações de contaminações de menos de um esporo de *Tilletia caries* por semente de trigo.

Muitos desafios ainda existem para a detecção de patógenos em sementes em testes moleculares. Primeiro, é importante que os *primers* utilizados sejam absolutamente específicos para o patógeno de interesse e não devem amplificar espécies proximalmente relacionadas, ou seja, devem ser confeccionados para uma única sequência do DNA do patógeno alvo (Schaad et al., 2003). A presença de inibidores das sementes deve ser minimizada por meio 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 a 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, em que o uso de sementes saudáveis, ou tratadas, é uma alternativa eficaz e de custo relativamente baixo.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, J. Controle à ramulose tardia do algodoeiro. **O Biológico**, Campinas, v.27, n.6, p.121-123, jun.1961.

ABRAHÃO, J.; COSTA, A. S. Instruções para o reconhecimento da ramulose do algodoeiro. **O Biológico**, Campinas, v.15, n.3, p.59-60, mar. 1949.

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of Seed Pathology**. Florida, USA: CRC, 1987. 176 p.

AGÊNCIA BRASIL ; EMPRESA BRASILEIRA DE COMUNICAÇÃO . Disponível em <http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias>. Acesso 23 jul. 2008.

ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CELANO, F.; CARVALHO, E. M.; CAMARGOS, V. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n.1, p.35-40, jan./fev. 2006.

ASSIGBETSE, K. B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M. P.; GEIGER, J. P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Phytopatology**, St. Paul, v. 84, n. 6, p. 622-626, Feb. 1994.

BAURA, G.; SZARO, T. M.; BRUNS, T. D. *Gastrosuillus laricinus* is a recent derivative of *Suillus grevillei* : molecular evidence. **Mycologia**, New York, v. 84, p. 592-597, 1992.

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

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, July 2001.

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

BLUM, L. E. B.; SANGOI, L.; AMARANTE, C. V. T. ; ARIOLI, C. J.; GUIMARÃES, L. S. Desfolha, população de plantas e precocidade do milho afetam a incidência e a severidade de podridão de colmo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 805-811, set./out. 2003.

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

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

CARVALHO, D. C.; VIEIRA, M. G. C. G.; MACHADO, J. C. Uso de isoenzima para diferenciação de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. isolados de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 2, p. 315-319, 1997.

CASA, R. T. ***Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* associados à sementes de milho**. 1997. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; MOREIRA, E. N. Transmissão de fungos em sementes de cereais de inverno e milho: implicações epidemiológicas. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 502 p.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p.3 55-361, jul./ago. 2003.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. Revisão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 427-439, set./out. 2006.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L.; MOREIRA, E. N. Efeito da temperatura e de regimes de luz no crescimento do micélio, germinação de conídios e esporulação de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 137-142, mar./abr. 2003.

CASSETARI, D.; MACHADO, A. Q. **Doenças do algodoeiro, diagnose e controle**. 2. ed. Várzea Grande: UNIVAG, 2005. 47 p.

CIA, E ; FUZATTO, M .G. Relevância de patógenos varia de acordo com a região. **Visão Agrícola Algodão**, Piracicaba, n. 6, p. 35-39, jul./dez. 2006.

CIA, E. **Relatório FACUAL** : avaliação de cultivares e linhagens avançadas de algodoeiro para resistência a doença. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2002. 20 p.

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

CHAMBERS, K. R. Effect of time of inoculation on diplodia stalk and ear rot of maize in South Africa. **Plant Disease**, St Paul, v. 72, n. 6, p. 529-531, Jun. 1988.

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 em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

CUTLER, H. G.; CRUMLEY, F. G.; COX, R. H.; COLE, R. J.; DORNER, J. W.; LATTERELL, F. M.; ROSSI, A. E. Diplodiol : a new toxin from *Diplodia macrospora*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 1, p 135-138, Jan. 1980.

DEMEKE, T.; ADAMS, R. P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives of PCR. **Biotechniques**, v. 12, n. 3, p. 332-334, Mar. 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**, Madison, v. 46, n. 3, p. 1064-1070, 2006.

DORRANCE, A. E. Comparasion of *Stenocarpella maydis* isolates for isozyme and cultural characteristics. **Phytopathology**, St Paul, v. 83, n. 7, p.675-680, July 1999.

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

EBBELS , D. L. Indexing and diagnosis in plant health. In: EBBELS , D. L. (Ed.). **Principles of plant health and quarantine**. Wallingford,UK: CAB Publishing International, 2003. 302 p.

FLETT, B. C. ; WEHNER, F. C. Incidence of *Stenocarpella* and *Fusarium* cob rots in monoculture maize under different tillage systems. **Journal of Phytopathology**, v. 133, n. 4, p.327-333, Dec. 1991.

FLETT, B. C.; WEHNER, F. C. ; SMITH, M. F. Relationship between maize stubble placement in soil and survival of *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*). **Journal of Phytopathology**, v. 134, n. 1, p. 33-38, Jan. 1992.

FREITAS, M. **Variabilidade, danos e detecção de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em sementes de milho.** 2006.182 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p.113-118, Apr. 1993.

GARDES, M. ; WHITE, T. J. ; FORTIN, J. A. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n.1, p.180-190, 1991.

GLEASON, M. L. ; FERRISS, R. S. Effects of soil moisture and temperature on *Phomopsis* seed decay of soybean in relation to host and pathogen growth rates. **Phytopathology**, St Paul, v. 77, n. 8, p.1152-1157, Aug. 1987.

GUILLEMETTE, T.; IACOMI-VASILESCU, B; SIMONEAU, P. Convencional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. **Plant Disease**, St Paul, v. 88, n., 5, p. 490-496, May 2004.

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

HEWETT, P. D. Detection of seed-borne *Ascochyta pisi* Lib. and test agreement within and between laboratories. **Seed Science and Technology**, v. 15, n.1, p. 271-283, 1987.

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. 2002. 57 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

IOOS, R.; LAUGUSTIN, L.; ROSE, S.; TOURVIEILLE, J.; TOURVIEILLE DE LABROUHE, D. Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, n. 9, p. 209-218, Apr. 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**, Passo Fundo, 2002. v. 10, p. 287-331.

JONSSON, R.; SÄLL, T.; BRYNGELSSON, T. Genetic diversity for Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in two swedish populations of *Pyrenophora teres*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 22, n. 3, p. 258-264, Set. 2000.

JULIATTI, F. C. ; RUANO, O. Algodão (*Gossypium hirsutum* L.) controle de doenças, doenças causadas por fungos e bactérias. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. v. 2, p. 155-609.

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

KNOLL, S.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Identification of fusarium graminearum in cereal samples by DNA detection test strips (TM). **Letters in applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 144-148, 2002.

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, Jan. 2002.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P.; TURKINGTON, T. K. Symptomless infection of barley seed by *Rhynchosporium secalis*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n. 3, p. 315-317, Sept. 2001.

LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 9, p. 636-653, July 1992

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

LIMA, E. F.; CARVALHO, J. M. F. C.; CARVALHO, L. P. ; COSTA, J. N. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides*, através da semente de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n.1, p. 105-115, jan. 1985.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-263, 1994.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes** : fundamentos e aplicações. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107 p.

MACHADO, J. C. ; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 502 p.

MAFFIA, L. A.; MUCHOVEJ, J. J. ; MAFFIA, A. M. C. Fundamentos epidemiológicos no estudo da transmissão de patógeno por sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3., 1988, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1988. p. 41-47.

MARIO, J. L.; REIS, E. M.; BONATO, E. R. Reação de híbridos de milho à podridão branca da espiga. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 155-158, mar./abr. 2003.

MARIO, J. L. ; REIS, E. M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 670-672, set. 2001.

MARTIN, K. J.; RYGIEWICZ, P.T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 1-11, May 2005.

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, Sept. 2000.

MAUDE, R. B. Detection of seedborne organisms. In: MAUDE, R.B. (Ed.). **Seedborne disease and their control** : principles e practice. Wallingford, UK: CAB International, 1996. 280 p.

MCCARTNEY, H. A.; FOSTER, S. J.; FRAAIJE, B. A.; WARD, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 59, n.2, p. 129-142, Feb. 2003.

MCNEIL, M.; ROBERTS, A. M. I.; COCKERELL, V.; MULHOLLAND, V. Real-time PCR assay for quantification of *Tilletia caries* contamination of UK wheat seed. **Plant Pathology**, v.53, p.741-750, 2004

MENTEN, J. O. M. Danos de patógenos em sementes. In: _____. (Ed.) **Patógenos em sementes** : detecção, danos e controle químico. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1991. p 115-136.

METHA, Y. R.; MENTEN, J. O. M. Doenças e seu controle. In: FUNDO DE APOIO À CULTURA DO ALGODÃO. **Algodão** : pesquisas e resultados para o campo. Cuiabá: FACUAL, 2005. v. 2, p. 156-205.

METHA, Y. R.; ZANDONÁ, C.; BIBANCO, K. R.; ALMEIDA, W. P.; TEIXEIRA, E. A.; CUNHA, H. C.; ERIVALDO, J. Resposta diferencial de cultivares de algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, n. 2, p. 142-145, 2005.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan, 1979. v. 2, 839p.

OTTONELLO, A. M. P. **Caracterização cultural, patogênica e serológica de *Colletotrichum* da antracnose e da ramulose do algodoeiro**. 1992. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

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, n. 1, p. 51-57, 2004.

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, n.1, p. 31-39, 2002.

PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T. ; OLIVEIRA, E. Milho (*Zea mays* L.) : controle de doenças. In: VALE, F. X. R. ; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. cap. 17, p. 821-863.

PINTO, N. F. J de A. Podridão branca da espiga do milho. **Boletim Técnico Comunicado Técnico**, Sete lagoas, n.141, p. 1-6, dez. 2006.

PIZZINATO, M. A.; CIA, E.; FUZZATTO, M. G. Transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes de algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 17, p. 208-217, jul./dez. 1991.

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**, Botucatu, v. 13, p. 15, 1987.

PRYOR, B. M.; GILBERTSON, R. L. A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 1, p. 18-23, Jan. 2001.

REIS, E. M.; CASA, R.T.; BRESOLI, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. Lages, SC: Graphel, 2004.144 p.

REIS, E. M.; CASA, R. T. Ciclos biológicos e epidemiologia : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Diplodia* e *Fusarium*. In: SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃOS, 1999, Brasília. **Resumos de Palestras...** Brasília: Fundação Cargill/ Fundação ABC, 1999. p. 21-39.

REIS, E. M.; CASA, R. T. Controle de doenças fúngicas na cultura do milho em plantio direto. In: SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DO MILHO, 2000, Passo Fundo, RS. **Resumo de Palestras...** Passo Fundo: Aldeia Norte, 2002. p. 62-71.

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**, Botucatu, v. 19, p. 177-180, 1993.

SCHAAD, N. W.; BONDE, M. R.; HATZILOUKAS, E. Bio-PCR : a highly sensitive technique for detecting seedborne fungi and bacteria. In: HUTCHINS, J. D. ; REEVES, J. C. (Ed.). **Seed health testing** : progress toward the 21 st century. Wallingford, UK: 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, n. 3, p. 250–258, Sept. 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, Sept. 2003.

SCHENA, 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, n. 9, p. 893–908, 2004.

SHAH, D. A. ; BERGSTROM, G. C. Epidemiologia e manejo de patógenos transmitidos por sementes, com ênfase nos fungos que formam picnídios. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, n. 3, p. 339-364, 2000.

SHI, Y. L.; LOOMIS, P.; CHRISTIAN, D.; CARRIS, L. M.; LEUNG, H. Analysis of the genetic relationships among the wheat bunt fungi using RAPD and ribosomal DNA markers. **Phytopathology**, St Paul, v. 86, n. 3, p. 311-318, 1996.

SILVA, A. R.; JULIATTI, F. C. Esporulação de *Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* em diferentes meios de cultura. **Journal of Bioscience**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p.127-131, set./dez. 2005.

SILVA-MANN, R. **Diversidade do complexo de *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares**. 2002. 146 p. Tese

(Doutorado em Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação me plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n.1, p. 27-32, jan./fev. 2002.

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

TALAMINI, V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, F. A. Epidemiologia de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidas por sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 10, p. 219-248, 2001.

TANAKA, M. A. S. ; MACHADO, J. C. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 40-46, 1985.

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.; MACHADO, J. C. Hábito de crescimento de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 55, n.1, p.95-104, 1996.

TANAKA, M. A. S ; MENTEN, J. O. M. Relação entre a resistência do algodoeiro a ramulose e a transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pelas sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 18, p. 227-234, 1992.

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

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, 1995. p. 93-108.

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, 1991. p. 171-178.

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, n.3, p. 347-355, 2001.

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

VECHIATO, M. H. ;MARINGONI, A. C. ; MARTINS, E. M. Desenvolvimento de iniciadores para a detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. ***meridionalis*** em sementes de soja. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, 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.)**. 1996. 114 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

WHITE, D. G. **Compendium of corn diseases**. Minnesota, St. Paul: The American Phytopathological Society, 1999. 78 p.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols : a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. p.315-322.

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, n. 1, p. 35-44, Jan. 2001.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DE *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* EM PLANTAS DE ALGODOEIRO

1 RESUMO

Barrocas, Ellen Noly. Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em plantas de algodoeiro. In:_____. **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. Cap. 2, p.37-53. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras.*

A ramulose é uma das doenças mais importantes do algodoeiro causando danos em todas as posições da planta provocando prejuízos econômicos muitas vezes inaceitáveis. Os sintomas são representados por manchas necróticas nas folhas e pecíolo, morte da gema apical, nanismo e superbrotamento. O estabelecimento de uma metodologia de inoculação para esta doença é um alvo ainda a ser alcançado. Nesse trabalho procurou-se comparar alguns métodos de inoculação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* considerando-se diferentes posições da planta e estádios fenológicos do algodoeiro em relação a produção de sintomas típicos da doença. Plantas de algodoeiro da linhagem NU 15 no estádio V0, V2 e B1 foram submetidas a inoculação com suspensão de conídios ajustada à concentração 10^6 /ml em três posições da planta distintas a saber: planta toda, planta toda exceto gema apical e gema apical. As plantas foram protegidas no local inoculado durante toda a condução do ensaio. As avaliações de severidade de manchas foliares e queimadura de ápice foram realizadas aos 10 dias após a inoculação, enquanto que, a severidade de redução do porte e superbrotamento foram avaliados aos 35 dias após a inoculação. O delineamento experimental foi em blocos casualizado, com 3 repetições. As testemunhas foram inoculadas com água destilada e conduzidas da mesma forma que as inoculadas. Para a avaliação desses sintomas adotou-se a escala de notas descrita por Metha (2005) com modificações. Verificou-se que o estádio fenológico mais apropriado para a inoculação do agente da ramulose V2 e a parte da planta mais adequada sendo a planta inteira. A inoculação direcionada somente a gema apical de plantas de algodão, não foi capaz de induzir a formação de sintomas de superbrotamento ou encurtamento de internódios de nenhuma das plantas avaliadas.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Co-orientadora)

2 ABSTRACT

Barrocas, Ellen Noly. Effect of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* in cotton plants. In **Effects of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* on seeds and plants of cotton and detection of *Stenocarpella* sp in infected seeds of maize by PCR technique.**. 2008. Chap. 2, 37-53. Thesis (Doctorate in Agronomy/Phytopathology)-Federal University of Lavras.*

Ramulosis caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* in cotton is one of the most devastating diseases in this crop causing variable and severe losses in Brazil. In addition to damping-off, necrotic leaf spot, the disease causes different kind of damages by reducing plant size, apical blight and intensive branching with short internodes. The reproduction of those symptoms through artificial inoculation is a target to be reached for the correct diagnosis of this disease in practice. In this study the major objective was to compare some methods to inoculate *C. gossypii* var. *cephalosporioides* in cotton, considering different ages and parts of the plants for deposition of inoculum, having in mind the reproduction of typical symptoms of such disease under controlled conditions. Inoculation was done by applying an inoculum suspension of 10^6 conidia/ml on plants, phenological growth stages of V0, V2 e B1, addressing the inoculum to the whole plant, to apical shoot and to the whole plant except the apical shoot. Inoculated and non inoculated parts of the plants were protected with celophane bags throughout the experiment development. The severity of the disease was evaluated considering the production and intensity of the symptoms as described in literature for that disease. The experimental design was randomized blocks with 3 replicates. The control treatments consisted of application of water on the plants following the same procedures as described for inoculated plants. The final assessment of the disease was made following the rating scale described in literature with slight modification. From the results it was verified that the most appropriate method for inoculation in the present case consisted in the use of cotton plants, V2 phenological growth stage, with application of inoculum on the whole plant. The inoculation addressed to the apical shoot only was not able to reproduce the most typical symptoms of ramulosis such as intensive branching and short internodes of infected plants.

* Guidance Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Co-orientadora).

3 INTRODUÇÃO

A ramulose, causada pelo patógeno *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A. S. Costa, é uma das principais doenças do algodoeiro, podendo causar danos de difícil controle. É uma das doenças que mais têm requerido atenção, por parte dos produtores, em diferentes regiões onde esta oleaginosa é cultivada. Pela sua forma característica de atacar plantas suscetíveis, chega a causar prejuízos dos mais elevados, muitas vezes intoleráveis, do ponto de vista econômico. Seus sintomas são variados, podendo apresentar folhas com áreas cloróticas ou necróticas, arredondadas, alongadas ou angulares, e perfurações. As lesões, principalmente nas nervuras, acarretam o desenvolvimento desigual dos tecidos foliares, ocasionando o enrugamento da superfície do limbo. O encurtamento dos entrenós, galhos contorcidos e dilatados, nanismo e superbrotamento dos galhos dão à planta um aspecto ramalhudo, característico da doença (Araújo et al., 2003; Cia & Salgado, 1995; Cia et al., 2002; Pizzinato & Tanaka, 1996; Pizzinato & Cia, 1994; Tanaka & Menten, 1992; Zandoná et al., 2006).

Diversos autores atribuem esses sintomas à morte do meristema apical e à formação excessiva de galhos (Costa & Fraga Junior, 1937; Abrahão, 1961; Drumond, 1961; Dudienas, 1990; Tanaka, 1995; Cia & Salgado, 1997), mas segundo Metha et al. (2005), a relação desses sintomas ainda não é bem esclarecida.

Sua disseminação pode ocorrer por restos culturais, por meio de plantas contaminadas ou por sementes. Nesse caso, as plantas apresentam lesões deprimidas e pardo-escuras atingindo colo e raiz, causando tombamento de pré e pós-emergência (Goulart, 2005).

O desenvolvimento de metodologias de inoculação consiste numa importante etapa na seleção e na avaliação do grau de resistência de cultivares, quando em programas de melhoramento genético. É também importante nos estudos de variação patogênica, além de garantir diagnose precisa em testes de rotina, quando se pretende diferenciar os agentes da ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) e antracnose (*Colletotrichum gossypii*).

Geralmente, a metodologia de inoculação para a ramulose inclui pulverização de suspensão de conídios com diferentes concentrações e idades em toda a planta (Santos et al. 1993), mas os efeitos de inoculações em posições isoladas da planta ainda não foram estudados. As avaliações dessa metodologia, geralmente, são baseadas em escalas de notas incluindo todos os sintomas conhecidos.

Neste trabalho, procurou-se avaliar o efeito da inoculação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, em diferentes posições e estádios fenológicos do algodoeiro, em relação à produção de sintomas típicos da ramulose, no intuito de estabelecer uma metodologia segura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes da linhagem NU 15, cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas, SP, foram deslintadas com ácido sulfúrico (PA) e submetidas à assepsia, com hipoclorito de sódio 2%, por 1 minuto. A germinação das sementes em rolo de papel (Brasil, 1992) foi de 90%, não sendo verificada, no teste de sanidade ('blotter test'), a presença de *C. gossypii*.

Em seguida, foi feita a semeadura em vasos de 8 litros contendo mistura de areia, terra e esterco, na proporção 1,5:3:1,5 e adubadas a cada 20 dias com a mistura de 1grama de sulfato de amônio, 1grama de KCL e 3 gramas de superfostato simples por vaso.

Plantas no estágio fenológico V0 (15dias), V2(28 dias) e B1(40 dias) (Rosolem, 2006) foram inoculadas com suspensão de inóculo ajustada à concentração 10^6 conídios/mL (Metha et al.,2001) de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em planta inteira, planta inteira exceto gema apical e somente gema apical. O método de inoculação utilizado consistiu no pincelamento da suspensão de conídios, acrescida de 5% de ágar, nos três posições pré-estabelecidos, sendo cada parte protegida com sacos de papel celofane, durante todo o período de condução do experimento. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura ajustada a $25\pm 5^\circ\text{C}$.

As avaliações de severidade da doença em folhas, caules e requeima da gema apical foram realizadas 10 dias após a inoculação, enquanto a severidade da redução de entrenós e o superbrotamento foram avaliados aos 35 dias após a inoculação. A escala de notas adotada foi descrita por Metha et al. (2005), conforme Tabela 1, com modificações. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 3 repetições. As testemunhas foram inoculadas com água destilada e conduzidas da mesma forma que as plantas inoculadas.

TABELA 1. Escala de notas adaptada para a avaliação dos sintomas em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Dados em percentagem de índice de doença

Grau de importância dos sintomas*	Sintomas	Severidade**
1	Lesões necróticas nas folhas, pecíolo e nervuras	0-3
2	Morte do ápice, hiperplasia, morte dos meristemas laterais	0-3
3	Redução no porte da planta (encurtamento dos entrenós)	0-3
4	Superbrotamento	0-3

*Peso 1 = menos importante e peso 4 = mais importante. **0 = ausência de sintomas; 3 = sintomas mais severos.

A queima de ápice e as lesões nas folhas foram avaliadas por meio de escala de severidade entre 0 e 3, em que: 0 = sem sintomas; 1 = <10% da área foliar infectada (AFI); 2 = 11%-25% AFI e 3 = >25% AFI. A severidade de redução do porte da planta foi avaliada pela escala 0-3, em que: 0 = nenhuma redução; 1 = <10%; 2 = 11%-25% de redução em relação à planta testemunha. Os dados foram ponderados aplicando-se a fórmula descrita por McKinney (1923).

$$ID (\%) = [\sum(f.v)/n.x]*100$$

em que: ID = índice de doença; f = número de plântulas com determinada nota; v = nota observada; n = número total de plântulas avaliadas; x = grau máximo de severidade da escala.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2) pelo teste F ($p < 0,001$), referente à análise da interação entre posições de inoculação e diferentes idades da planta no índice de ramulose. Foi possível observar a idade e parte de inoculação mais apropriados para a diagnose da ramulose.

Em relação ao estágio fenológico, foi possível verificar maior severidade, representada pelo índice de doença, em plantas no estágio V2 (Figura 5), seguidas de plantas no estágio B1 e V0 dias pós-emergência (Tabela 2). Embora os sintomas típicos da ramulose tenham aparecido quando a planta inteira foi inoculada no estágio V2 e B1, os sintomas em plantas no estágio V0 comprometeram o seu desenvolvimento em comparação com plantas não inoculadas (Figura 1 e 2), impedindo o seu desenvolvimento. Santos et al. (1993) também atribuem a idade entre 25 e 35 dias como a mais favorável para inoculação de *C. gossypii* var. *cephalosporoides*.

Em geral, os trabalhos de inoculação no estágio V0 são realizados por meio de pulverizações com diferentes concentrações de conídios sobre toda a planta. Dessa forma, é provável que a inoculação com o método de pincelamento, acrescido de 5% de ágar, tenha mantido alta umidade no local, permitindo aos conídios depositados no momento da inoculação, melhor adesão e, conseqüentemente, condições mais favoráveis para a penetração e desenvolvimento. Daí a produção de sintomas mais severos no estágio V0. Constata-se, na prática, que os trabalhos realizados com inoculações para se obter sintomas típicos de ramulose não levam em consideração o estágio fenológico da planta e a concentração de conídios mais adequados. Nascimento et al. (2006) e Silva-Mann et al. (2002) quando avaliaram a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporoides* em diferentes genótipos, pulverizaram plantas no estágio V0 com suspensão na concentração de 10^5

conídios por mL e conseguiram reproduzir sintomas de ramulose. Já Lima et al. (1984) obtiveram os mesmos sintomas com plantas inoculadas entre 25 e 30 dias após semeadura, o que corresponde ao estágio V2. Bürkle et al. (1999) conseguiram os mesmos resultados com a inoculação das plantas de algodão aos 21 dias (estádio V1), com suspensão de 9×10^3 conídios por mL

Neste trabalho, plantas inoculadas no estágio fenológico B1 apresentaram menor índice de doença que as inoculadas no estágio V2. É importante ressaltar que é justamente a partir dessa fase, quando ocorre o início da formação de capulhos, que ocorre o maior índice de infecção de sementes (Santos, et al., 1993).

TABELA 2. Índices de doenças, em porcentagem, em função dos estádios fenológicos e das posições de plantas inoculadas, linhagem NU-15, inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Posições de inoculação na planta**	Estádio fenológico			
	V0	V2	B1	Media**
Testemunha	0 dA	0 dA	0 dA	0 d
Planta toda, exceto gema apical	6 cB	19 cA	17 cA	14 c
Gema apical	40 bA	30 bB	30 bB	33 b
Planta toda	59 aC	90 aB	80 aA	76 a
Média	0,26C	0,34A	0,31B	

**Significativo, pelo teste F, a 1%; letras minúsculas iguais na coluna e letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5%.



FIGURA A e B. Plantas de algodoeiro totalmente inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* no estágio V0 (Figura 1A) e estágio V2 (Figura 1B) e testemunhas (2A e 2B).

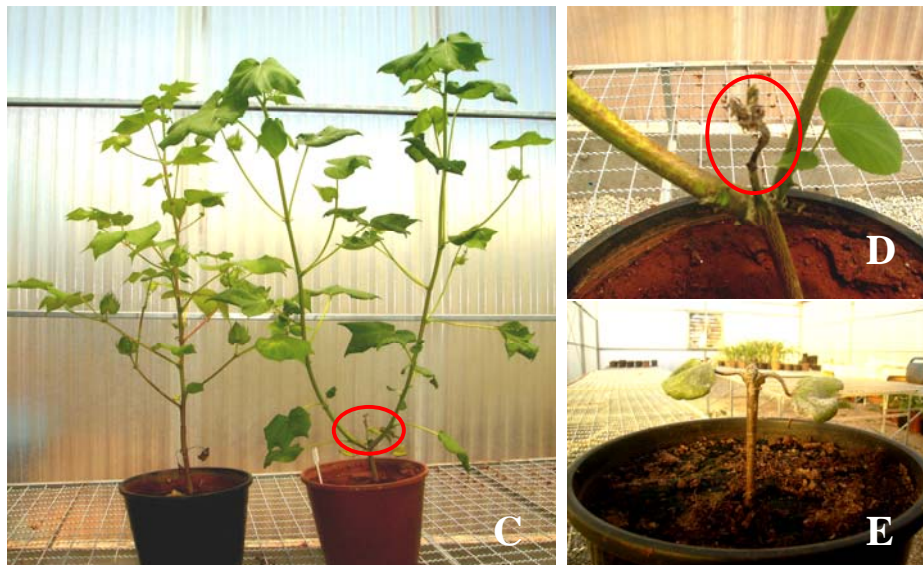


FIGURA C,D e E. Planta de algodoeiro inoculada na gema apical com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* no estágio V2 (Figura C), detalhe da gema apical morta (Figura D) e planta de algodoeiro totalmente inoculada *C. gossypii* var. *cephalosporioides* no estágio V0 (Figura E).

Em relação a parte da planta mais apropriado para efetuar a inoculação do agente da ramulose, foi possível observar maior severidade quando a planta foi totalmente inoculada, seguida de inoculação somente na gema apical e plantas que tiveram suas gemas apicais protegidas (Tabela 2).

Embora as plantas inoculadas somente na gema apical apresentassem alta severidade da doença, com base na escala de notas empregada, ficou claro que os sintomas típicos da ramulose, na forma de superbrotamento, não foram predominantes no quadro geral avaliado conforme a Tabela 2. Houve morte da gema apical em todas as plantas, mas elas não ocasionaram sintomas de superbrotamento ou encurtamento de entrenós. Essas plantas continuaram seu desenvolvimento normal, com modificação de sua arquitetura e produziram flores e capulhos, conforme indicado nas Figuras 3 e 4. De modo geral, postula-se que a inoculação deva ser direcionada para atingir o ápice da planta, por ser esta estrutura mais sensível à ramulose (Nascimento et al., 2006; Santos et al., 1994; Tanaka & Menten, 1992). No entanto, neste trabalho ficou evidenciado que a morte da gema apical pode ser apenas um componente para o desenvolvimento da doença, mas não é o responsável principal para o desenvolvimento da doença. A literatura atribui o desenvolvimento da doença à morte do meristema apical e ao desenvolvimento das gemas axilares, conferindo, assim, o formato de superbrotamento, característico da doença (Costa & Fraga Junior, 1937; Abrahão, 1961; Drumond, 1961; Dudienas, 1990; Tanaka, 1995; Cia & Salgado, 1997).

Segundo Metha et al. (2005), a formação de sintomas da ramulose em algodoeiro é governada por diferentes genes, havendo certa especificidade destes de acordo com a sintomatologia, seja nas folhas ou em relação ao superbrotamento. Da mesma forma, é possível postular que os sintomas de morte apical possam ser governados também por genes específicos, distintos dos demais referenciados.

Ainda segundo Metha et al (2005), o sintoma de superbrotamento pode ser provocado por metabólitos secundários produzidos pelo próprio patógeno. Sintomas desta natureza, assim como hipertrofia, hiperplasia, formação de galhas, nanismo, crescimento excessivo de raízes, entre outros, geralmente, são atribuídos a variações nos níveis hormonais (Agrios, 2005). Os patógenos podem produzir os mesmos hormônios que as plantas ou, ainda, produzir inibidores de hormônios, substâncias que estimulem ou retardem a ação dos promotores ou inibidores (Perley & Stowe, 1966; Manulis & Gafni, 1990; Glickmann et al., 1998; Navarre & Damann, 1990; Vandeputte et al., 2005). Doenças, como a vassoura-de-bruxa, em cacaueteiro, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* e a malformação da mangueira, causada por espécies de *Fusarium*, apresentam sintomas semelhantes. Para estes casos, o nível de entendimento é ainda incipiente (Staden & Nicholson, 1989).

A inoculação das plantas com a proteção da gema apical também não promoveu os sintomas típicos da ramulose em nenhuma das três idades avaliadas. Quando se inocularam plantas no estágio V0, a inoculação foi realizada somente no pecíolo, já que as plantas com essa idade apresentam somente as folhas cotiledonares. Nesse caso, a manifestação da doença ocorreu somente nos pecíolos na forma de lesões necróticas. Plantas no estágio V2 e B1 apresentaram morte das gemas laterais e manchas necróticas sem, no entanto, haver produção dos sintomas típicos da ramulose.

Neste trabalho ficou evidenciado, portanto, que, para o desenvolvimento da ramulose, é necessário avaliar um conjunto de fatores que dispõem a planta à doença, mas a avaliação de sintomas isolados não é conclusiva para a sua diagnose segura.

6 CONCLUSÕES

A inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em plantas no estágio fenológico V2, por meio do pincelamento de conídios em toda a sua superfície é mais adequada para a produção de sintomas típicos de ramulose na forma de superbrotamento, redução de tamanho e encurtamento de internódios.

Inoculação direcionada com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* somente à gema apical de plantas de algodão não é capaz de induzir a formação de sintomas de superbrotamento ou encurtamento de internódios.

Plantas de algodoeiro no estágio fenológico V0, inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, pelo método de pincelamento de conídios, não induzem sintomas típicos desta doença, mas causam outros tipos de sintomas de forma severa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. How pathogens attack plants. In: _____. **Plant pathology**. New Cork: Academia, 2004. p. 175- 205.

ABRAHÃO, J. Controle à ramulose tardia do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 121-123, jun. 1961.

BÜRKLE, R.; MEHTA, Y. R.; FONSECA JUNIOR, N. S. Reaction of cotton cultivars to *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p.278-281, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 1992. 360 p.

CIA, E.;FUZATTO, M. G.; PIZZINATO, M. A.; BORTOLETTO, N. Uma escala para classificação da resistência de cultivares a doenças do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n.1, p. 28-32, 2002.

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. v. 2, p.331-341.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H. AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia : doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 33-48.

COSTA, A. S.; FRAGA JUNIOR, C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 7, n. 5/6, p. 249-259, 1937.

DRUMOND, O. A. A ramulose em Minas Gerais. **Boletim de Agricultura**, Belo Horizonte, v. 10, n. 3/12, p. 95-97, 1961.

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

GLICKMANN, E; GARDAN, L.; JACQUET- HUSSAIN, S.; ELASRI, M.; PETIT, A.; DESSAUX, Y. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 11, n. 2, p.156-162, 1998.

GOULART, A. C. P. Doenças iniciais do algodoeiro : identificação e controle. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 502 p.

LIMA, E. F.; CARVALHO, L. P. de ; SANTOS, E. O. dos ; CARVALHO, J. M. F. C. Avaliação de germoplasma de algodoeiro para resistência à ramulose causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n.1, p. 84, out. 1984.

MANULIS, S; GAFNI, Y. Identification of plasmid DNA probe for detection of strain of *Erwinia herbicola* pathogenic on *Gypsophila paniculata*. **Phytopathology**, St Paul, v. 81, n. 1, p. 54-57. 1990.

METHA, Y. R.; PAES, W. A.; FREIRE, E. C. Reação de algumas cultivares do algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO**, 3., 2001. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa-Algodão, 2001.p.584-586.

METHA, Y. R. Z. C; ZANDONÁ, C.; BIBANCO, K. R.; ALMEIDA, W. P.; TEIXEIRA, E. A.; CUNHA, H.C.; ERIVALDO, J. Resposta diferencial de cultivares de algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, n. 2, p.142-145, 2005.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-219, Nov. 1923.

NASCIMENTO, J. F.; ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; BERGER, P. G. ; CECON, P. R. Resistência do algodoeiro a ramulose e variabilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 9-15, jan./mar. 2006.

NAVARRE, D. A. ; DAMANN, K. E. Synthesis of indole-3-acetic acid by *Ustilago maydis*. **Phytopathology**, St Paul, v. 80, p.1055, 1990. Supplement.

PERLEY, J. E. ; STOWE, B. B. On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine. **Plant Physiology**, v. 41, p. 234-237. 1966.

PIZZINATTO, M. A.; CIA, E. Relação entre a severidade de ramulose do algodoeiro em condições de campo e a presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes produzidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 50-54, mar. 1994.

PIZZINATTO, M. A.; TANAKA, M. A. de 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**, Botucatu, v. 22, n. 2, p.122-127, 1996.

SANTOS, G. R.; ZAMBOLIM, L. ; BATISTA, U. G. Transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes do algodoeiro em função do período de inoculação das plantas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 19, n. 3/4, p. 17180, 1993.

SANTOS, G. R.; ZAMBOLIM, L. RIBEIRO DO VALE, F. X.; MAFFIA, L. A.; VIEIRA, J. M. Progresso e gradiente da ramulose do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p.390-393, set. 1994.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação me plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n.1, p. 27-32, jan./fev. 2002.

STADEN, J. van. ; NICHOLSON, R. I. D. Cytokinins and mango flower malformation II : the cytokinin complement produced by *Fusarium moniliforme* and the ability of the fungus to incorporate [8-¹⁴] adenine into cytokinins. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 423-431, Nov. 1989.

TANAKA, M.A. S. ; MENTEN, J. O. M. Relação entre resistência do algodoeiro à ramulose e a transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pelas sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 18, p. 227-234, jul./dez.1992.

TANAKA, M. A. S. ; MENTEN, J. O. M. Variação patogênica e fisiológica de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 18, p. 1388-145, abr./jun. 1992.

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

VANDEPUTTE, O. ; ODEN, S.; MOL, A.; VEREECKE, K. G.; EL JAZIRI, M.; PRINSEN, E. Biosynthesis of auxin by the gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p.1169–1177, Mar. 2005.

ZANDONÁ, C.; NOVAES, T. G.;METHA, Y. R.; SCHUSTER, I.; TEIXEIRA, E. A.; CUNHA, H. Herança de resistência a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* am algodoeiro brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 76-78, jan./fev. 2006.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DE *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* EM SEMENTES DE ALGODOEIRO

1 RESUMO

Barrocas, Ellen Noly. Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro. In **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. Cap. 2, p.54-84. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras.*

A ramulose é uma doença que pode ocasionar perdas de até 75% na produção do algodoeiro. Um dos principais meios de entrada do patógeno em área de cultivo é a partir de sementes infectadas e ou contaminadas. Por essa razão, é importante avaliar os efeitos do *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, agente da ramulose, a partir de sementes de algodoeiro. Neste estudo foram usadas sementes da cultivar Delta Pine Acala 90 e linhagem IAC 2223, consideradas suscetível e resistente, respectivamente as quais foram submetidas à inoculação com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* pela técnica do condicionamento osmótico com potencial osmótico, ajustado a -0,8MPa por meio da adição de manitol. Todas as sementes foram expostas ao patógeno pelos tempos de 0, 24, 36 72 e 108 horas. Os tratamentos controle consistiram na exposição das sementes ao BDA acrescido de manitol pelo mesmo período de incubação. As variáveis analisadas foram emergência em substrato Plantimax®, germinação em rolo de papel, índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial e final, índice de doença, incidência e taxa de transmissão sintomática de plantas em bandeja plástica. Verificou-se que, à medida que aumenta o tempo de exposição ao patógeno, diminui a porcentagem de plantas emergidas, para ambos materiais genéticos. Quando se avaliou a semente osmocondicionada sem fungo, foi possível observar decréscimo da porcentagem de plantas a partir do tempo de 24 horas de condicionamento nos dois genótipos. A germinação em rolo de papel diminuiu à medida que aumentou o tempo de exposição para o material suscetível e permaneceu inalterada para o material resistente. O vigor das sementes dos dois genótipos decresceu com o aumento do tempo de exposição, sendo observado menores valores nas sementes da linhagem suscetível. Quando se analisou o vigor das sementes osmocondicionadas sem fungo, constatou-se redução a partir do tempo de 24 horas de condicionamento. Estande inicial e final, tanto em sementes inoculadas como não inoculadas, foram reduzidos com o aumento do tempo de exposição, mas o vigor de sementes inoculadas foi menor. Observou-se a mesma tendência para matéria seca, com diferenças menores entre sementes inoculadas ou não, no material resistente. Para o índice de doença, foi observado aumento gradual para os dois materiais de algodão. Houve também aumento gradual no índice de doença na cultivar suscetível e aumento gradual leve para a linhagem

resistente. O mesmo padrão foi observado para a taxa de transmissão sintomática. Nos dois materiais avaliados plantas infectadas foram observadas e confirmaram a transmissão do patógeno em todos os potenciais de inóculo testados.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Co-orientadora)

2 ABSTRACT

Barrocas, Ellen Noly. Effect of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* in cotton seeds. In **Effects of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* on seeds and plants of cotton and detection of *Stenocarpella* sp in infected seeds of maize by PCR technique**. 2008. Chap. 2, p.54-84. Thesis (Doctorate in Agronomy/Phytopathology)-Federal University of Lavras.*

Ramulosis disease may be responsible for reduction of cotton yield at levels of 75% of the total production. One of the major means by which that disease may be introduced and disseminated in nature is the use of infected seeds. For that reason it is important to evaluate the relationship between the incidence of that pathogen in seeds and the effects of that interaction on the performance of the host. For this study, seeds of two cotton materials, one considered resistant and other susceptible to ramulosis, were inoculated with *C. gossypii* var. *cephalosporioides* through the osmopriming technique which consists in keeping seeds in contact with fungal colonies on agar substrate containing mannitol at osmotic potential of -0,8 MPa for periods of 0, 24, 36 72 and 108 hours under favorable conditions for the pathogen development. Control treatments consisted in keeping seeds on agar substrate without fungal colonies for the same periods of incubation. Infected and non infected seeds were submitted to different tests in laboratory and in growth chambers for evaluation of standard germination, vigor, disease symptoms, size and height of emerged plants in plastic boxes containing soil substrate. From the results, it was observed that the germination, plant emergence and disease indexes for both cotton materials were reduced at the highest periods of contact between seed and pathogen. Effects of the pathogen were slightly higher in the susceptible cotton material. For the control treatments in which seeds had no contact with the pathogen, values of those variables were also reduced at periods longer than 24 h of incubation, but in lower proportions. By the germination test in laboratory, the effect of the pathogen was gradually higher in the susceptible material and less negative in the resistant material. The effects of the pathogen, at different inoculum potentials, or periods of seed-pathogen contact, on the performance of the resistant material of cotton used in this study, presented the same pattern in relation to the pathogen, but with lower relative values compared with susceptible material. In both materials, infected

plants were observed which confirms the transmission of the pathogen in all inoculum potentials tested.

* Guidance Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Co-orientadora)

3 INTRODUÇÃO

A ramulose é uma das mais importantes doenças da cultura do algodoeiro e o seu principal método de introdução ou reintrodução em áreas cultivadas é por meio do plantio de sementes contaminadas ou infectadas. Trata-se de uma doença que, dependendo das condições climáticas e nível de tecnologia de cultivo, pode ocasionar prejuízos dos mais elevados. Na literatura, encontram-se relatos de perdas de produção da ordem de 38 até 75 % (Siqueri, 2003). Para algumas regiões e ano de cultivo, é uma doença que causa impacto econômico inaceitável. Pelo seu potencial de risco, é uma doença cujo agente etiológico tem sido proposto como uma praga não quarentenária regulamentada, sujeita, portanto, a padrão sanitário em programas de certificação de sementes (Machado & Pozza, 2005). O agente causal desta doença, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, pode ser transportado tanto interna quanto externamente nas sementes e ainda sobreviver em restos culturais, especialmente onde o algodoeiro é cultivado sem esquema de rotação de cultura (Watkins, 1981; Carvalho et al., 1985; Lima et al., 1985; Tanaka & Machado, 1985; Pizzinato et al., 1988; Pizzinato et al. 1991; Tanaka, 1990; Tanaka & Menten, 1992a; Santos, 1993; Santos et al., 1993; Cia & Salgado, 1997; Juliatti & Ruano, 1997; Cassetari Neto, & Machado, 2000; 2005; Goulart, 2005)

A taxa de transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* de semente a progênie do algodão pode ser bastante elevada e por essa razão o uso de sementes portadoras do patógeno torna-se um sério risco para seus produtores (Goulart, 2005). A transmissão pode ser influenciada por inúmeros fatores como temperatura, umidade, profundidade de plantio, variedade, localização do inóculo, potencial de inóculo, dentre outros (Teixeira & Machado, 2003; Teixeira, 1995; Araújo et al., 2006; Cia & Fuzatto, 2006).

Em condições de clima favorável, com temperaturas de 25 a 30°C e umidade atmosférica elevada, a doença pode avançar rapidamente tornando-se uma epidemia. Araújo et al. (2006) observaram aumento da taxa de transmissão da doença à medida que se aumentou a temperatura, mas não observaram diferenças quando houve aumento do potencial de inóculo.

Um dos parâmetros utilizados para a recomendação de cultivares de algodoeiro é a avaliação do comportamento desses cultivares à ramulose por meio de índice de doença em diferentes regiões (Tanaka & Menten, 1992b; Fuzatto & Cia, 2004; Metha & Menten, 2005). Esses trabalhos podem também servir como orientação para a implementação de padrões de tolerância em programas de certificação para patógenos não quarentenários regulamentados (Machado, 1994; Machado & Pozza, 2005; Menten, 2005).

Os trabalhos com condicionamento osmótico, ou fisiológico, tem auxiliado no entendimento mais aprofundado do comportamento de doenças a partir de sementes, já que esta técnica permite a exposição das sementes ao patógeno por tempos controlados e mais prolongados, possibilitando obter um controle do processo de colonização das sementes pelo patógeno e assim determinando diferentes índices de infecção das mesmas (Kikuti et al. 2002; Machado, 2002; Costa et al, 2003).

Dessa forma, nesse trabalho, o objetivo foi verificar a relação entre a ocorrência de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, em diferentes potenciais de inóculo em sementes de dois genótipos de algodão, com grau variado de resistência a ramulose, e seus efeitos a partir da semeadura até a fase vegetativa V3 das plantas emergidas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem, preparo e inoculação das sementes

Sementes de algodão, linhagem IAC 2226, com línter e cultivar Delta Pine Acala 90, já deslintadas, consideradas resistente e suscetível, respectivamente, foram, inicialmente, submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio a 1% durante 1 minuto e, em seguida, secas em câmara de fluxo laminar, sobre papel germitest durante 24 horas. As sementes da linhagem IAC 2226 foram previamente deslintadas com ácido sulfúrico, seguido da neutralização com carbonato de cálcio 2% (Kikuti et al., 2002). Todas as sementes foram selecionadas por densidade em água. Somente as sementes de maior peso nestas condições foram utilizadas nos testes de germinação.

A qualidade sanitária e fisiológica inicial do lote foi determinada de acordo com os testes indicados nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992) e pela International Seed Testing Association.

Para o desenvolvimento desse trabalho utilizou-se um isolado de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. A suspensão de inóculo, ajustada à concentração de 10^6 conídios/ mL, foi depositada e distribuída uniformemente em placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo BDA com potencial osmótico de -0,8 MPa por meio da adição de manitol, de acordo com o *software* SPPM (Michel & Radcliffe, 1995). As placas foram colocadas em BOD à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias.

Após esse período, as sementes de ambos materiais genéticos foram depositadas separadamente sobre o substrato agarizado, nas placas. Sementes sem crescimento fúngico foram colocadas sobre o meio BDA + manitol com intuito de avaliar somente o efeito do condicionamento sobre as sementes. Os tempos de exposição das sementes à colônia fúngica e ao meio de cultura com adição de

manitol, como restritor hídrico, foram de 0, 24, 36, 72 e 108 horas,. As sementes foram retiradas conforme os tempos citados e secas em câmara de fluxo laminar por 24 horas. Após a secagem foram armazenadas em câmara fria e seca para posterior utilização em testes de avaliações de emergência, sanidade, índice de velocidade de emergência (IVE), estandes inicial e final, altura de plântulas, peso seco da parte aérea, índice de doença e taxa de infectividade.

4.2 Avaliação dos efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodoeiro

4.2.1 Teste de sanidade

No teste de sanidade, as sementes inoculadas e não inoculadas foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio 1%, por 1 minuto, secas em câmara de fluxo laminar por 24 horas. Após a secagem as sementes foram incubadas em substrato de papel, modificado pela adição de BDA diluído e ajustado ao potencial hídrico de -0,8MPa por meio da adição de manitol, conforme descrito anteriormente. Após sete dias de incubação em temperatura de 22±2°C e fotoperíodo de 12 horas, as sementes foram analisadas com microscópio estereoscópico.

A incidência de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* foi dada a partir da avaliação de 200 sementes, para cada tempo de exposição de sementes, inoculadas e não inoculadas.

4.2.2 Teste de emergência, Índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial e final, altura de plantas e peso de matéria seca

Para as avaliações de teste de emergência em solo, índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial, estande final, altura de plântulas e peso seco da parte aérea foram semeadas 200 sementes da cultivar Delta Pine Acala 90 e linhagem IAC 2224, inoculadas e não inoculadas, em caixas de polietileno com dimensões de 48 x 29 x 10 cm, contendo substrato PLANTIMAX[®]. Após a semeadura as sementes foram cobertas com uma camada de 3 cm do mesmo substrato. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento vegetal com temperatura de 25±3°C e fotoperíodo de 12 horas, por 30 dias após a semeadura (d.a.s). O delineamento foi de blocos ao acaso com quatro repetições.

Os valores de altura de plantas (cm) e peso de matéria seca foram obtidos a partir de medição e pesagem de 15 plântulas retiradas aleatoriamente, por repetição. Para avaliar o peso de matéria seca as plantas foram cortadas na altura do coleto e submetidas ao processo de secagem em estufa com fluxo de ar forçado, à temperatura de 50°C. Após 72 horas, o material foi pesado em balança semi-analítica e os resultados apresentados em gramas.

4.3 Determinação do índice de doença e taxa de infectividade (taxa de transmissão sintomática) a partir de sementes de algodoeiro inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

4.3.1 Determinação do índice de doença

Para todas as plantas utilizadas para o experimento anterior foi avaliado o índice de doença (ID), taxa de infecção (TI) e taxa de transmissão sintomática (TTS).

O índice de doença foi calculado a partir dos sintomas observados nas plantas a partir da escala de notas, sugerida por Teixeira (1995) com modificações:

0- sem sintoma

1- Lesão no coleto até 1 cm (superficial)

2- Lesão no coleto > 1 cm (deprimida)

3- Pontuações , mancha necrótica, lesão no pecíolo

4- Prefurações na folha

5- Morte do meristema apical

6- Planta em colapso (morte)

Os dados foram ponderados aplicando-se a fórmula descrita por McKinney (1923).

$$ID (\%) = [\sum(f.v)/n.x]*100$$

em que,

ID = índice de doença; f = número de plântulas com determinada nota; v = nota observada; n = número total de plântulas avaliadas; x = grau máximo de severidade da escala.

4.3.2 Taxa de transmissão sintomática

Para determinar esta taxa de transmissão, com base em sintomas visuais, utilizou-se a metodologia descrita por Teixeira (1995).

$$TTS(\%)=I.D(\%)/T.I(\%)\times 100$$

T.T.S.(%)= Taxa de transmissão sintomática

I.D.(%)= Índice de doença médio conforme descrição anterior

T.I.(%)= Taxa de incidência em sementes, determinada pelo “Blotter Test”

Para a certificação dos sintomas e confirmação da infectividade ou transmissão sintomática foram retirados pequenos fragmentos dos sintomas de todas as plantas com sintomas e depositados em placas de Petri com meio BDA. As placas foram mantidas em BOD à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias, quando foram observados crescimento micelial e presença de conídios de *Colletotrichum* em microscópio estereoscópico.

4.3.3 Análise estatística

Uma abordagem iterativa foi utilizada para ajustar coeficiente com base em um modelo jacobiano e algoritmo “trust-region”. As variáveis significativas foram submetidas à análise de regressão linear e não linear. Realizou-se regressão não linear e linear dependendo da complexidade do fenômeno a ser explicado pelo ajuste dos modelos.

No caso da regressão linear o método dos quadrados mínimos foi utilizado no ajuste das equações. No caso da regressão não linear foram utilizados o modelo ‘Power’ $f(x) = a \cdot x^b$ ou $f(x) = a \cdot x^{b+c}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil inicial das sementes

As sementes de algodoeiro da cultivar Delta Pine Acala 90, considerada suscetível e as da linhagem IAC 2226, resistente apresentaram 84 e 72% de germinação, respectivamente. Embora não tenha sido detectada a presença de *Colletrotrichum gossypii* var *cephalosporioides* em nenhum dos dois lotes, a linhagem IAC 2223 apresentou 10% de *Fusarium* sp., 9,25% de *Alternaria* sp., 0,25% de *Nigrospora* e 0,25% de *Phoma* sp. E ambos apresentaram os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp em níveis variáveis de 15 a 25%, sendo maior na linhagem.

5.1 Efeito do *C. gossypii* var. *cephalosporioides* na qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro

As variáveis independentes, período de avaliação, período de incubação e tempo de exposição apresentaram interação significativa ($p < 0,01$) para a característica de germinação de ambos materiais.

Observou-se, na cultivar resistente e na linhagem suscetível, diminuição nos valores de germinação à medida que se aumentou o período de exposição das sementes ao fungo *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Embora a germinação da linhagem IAC 2226 tenha sido inicialmente menor, ela também teve sua germinação reduzida com o aumento do período de exposição ao patógeno (Figura 1). Araújo et al. (2006) avaliaram o mesmo patossistema e também observaram diminuição da porcentagem de plantas de algodoeiro com o aumento do tempo de exposição ao patógeno. Celano (2004), constatou que sementes de algodão inoculadas com o agente da ramulose, nos tempos de exposição de 36, 72

e 108 horas, apresentaram germinação média de 61%, 56% e 46%, respectivamente, confirmando desta maneira, a ação dos potenciais de inóculo na germinação das sementes.

Observou-se também diminuição na emergência de plantas à medida que se aumentou o tempo de avaliação na cultivar suscetível e aumento quando se avaliou a linhagem resistente (Figura 1). Essa diferença pode ser explicada pela diferença de vigor inicial entre os dois materiais. Como sementes da IAC 2226 apresentaram qualidade inicial bem inferior a outra avaliada, as sementes continuaram germinando ao longo do tempo avaliado. A comparação de valores do estande inicial e final dessa linhagem sugeriram o mesmo efeito (dados não mostrados), confirmando a tendência da superfície de resposta apresentada. Postula-se também a influência do genótipo da linhagem IAC, considerada mais resistente.

Observou-se que mesmo as sementes da cultivar suscetível que tiveram um rápido contato com a colônia fúngica sofreram ação do patógeno, observada na relação entre o tempo de exposição zero horas e o número de plantas emergidas ao longo do período de avaliação (Figura 1A). Tanaka (1995) também encontrou efeito do patógeno sobre a semente mesmo com um rápido contato entre semente e a cultura de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

A análise da influência do condicionamento osmótico em relação ao aumento dos tempos de exposição, permitiu verificar que tanto na cultivar suscetível quanto na linhagem resistente o efeito foi negativo a partir de 24 horas de exposição (Figura 2.). Ainda assim, pode-se observar um certo efeito “priming” sobre as sementes nos dois gráficos (2A e 2B) com base na análise e uniformidade de germinação dentro de cada tempo de exposição ao longo dos dias avaliados.

No âmbito da tecnologia de sementes o condicionamento osmótico é utilizado para aumentar a velocidade e uniformidade de germinação de

sementes, mas ele pode ser afetado por fatores como temperatura, luminosidade, secagem ou não das sementes, disponibilidade de oxigênio e contaminação microbiana (Rovieri et al., 1999). Por isso os efeitos entre espécies, cultivares e lotes podem ser variáveis (Brocklehurst & Dearman, 1983; Ali et al., 1990; Bradford et al., 1990; Cantliffe & Elballa, 1994). Nesse trabalho nos tempos maiores de exposição foi possível observar o desenvolvimento de outros fungos como *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicilium* sp. e no caso da linhagem o desenvolvimento de espécies como *Alternaria* sp, *Nigrospora* sp, *Fusarium* sp. dentre outras que podem comprometer as condições fisiológicas da semente. Esse fato pode explicar o menor número de plantas, nos tempos de exposição maiores, nos dois lotes estudados, do que quando em associação com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Nunes et al. (2000) também observaram o estímulo de crescimento de fungos em sementes de cebolas, quando submetidas ao condicionamento osmótico até 12 dias. Esse fato é esperado, visto em tempos maiores de exposição à condição de umidade e temperatura durante o tratamento, são favoráveis ao desenvolvimento fúngico.

Para fins de aplicação da técnica de condicionamento osmótico em patologia de sementes, no presente caso, o valor de germinação em torno de 70% correspondendo ao período de exposição de 72 horas pode ser considerado satisfatório. A mesma tendência foi observada por Celano (2004) nesse mesmo patossistema, mesmo utilizando isolado e cultivar distintos dos que foram usados nesse trabalho.

É possível considerar que se as sementes de algodão utilizadas não apresentassem contaminações microbianas e alta qualidade fisiológica os percentuais de germinação das sementes nos períodos de tempos mais prolongados, provavelmente seriam mais elevados.

Com base nos resultados do teste de germinação em rolo de papel (Figura 3), ficou evidenciado que o aumento do tempo de exposição promoveu uma redução gradual no percentual de germinação para a cultivar Delta Pine Acala 90. Para a linhagem IAC 2226 não houve diferença significativa entre os tempos avaliados. Neste caso, o aumento do tempo de exposição não comprometeu a germinação.

O teste de germinação em rolo de papel usado na avaliação da qualidade fisiológica das sementes proporciona uma estimativa do potencial de germinação do lote de sementes em condições ideais. Quando se avalia a germinação da semente com fungo os resultados podem ser subestimados, uma vez que esse encontra condições ótimas para o seu desenvolvimento, sem considerar situações que podem limitar a sua ação dos patógenos.

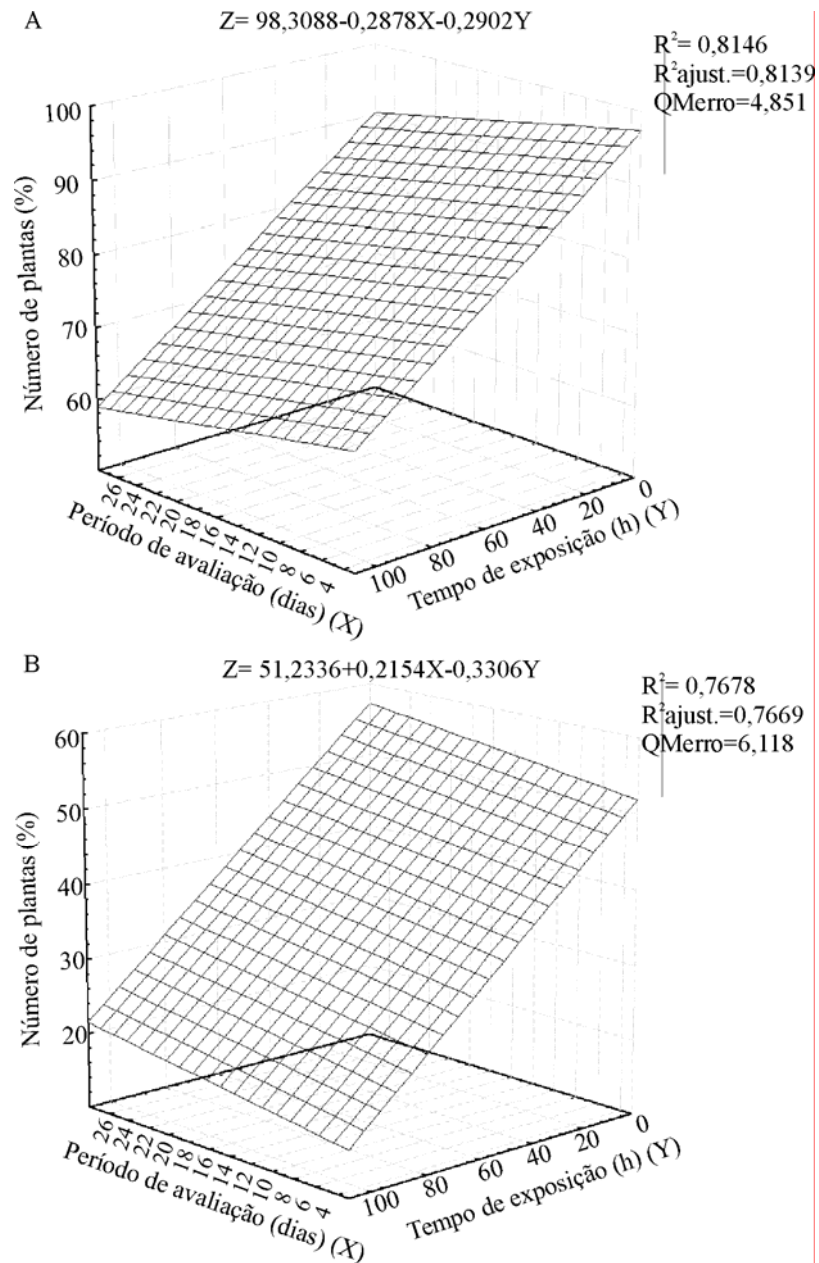
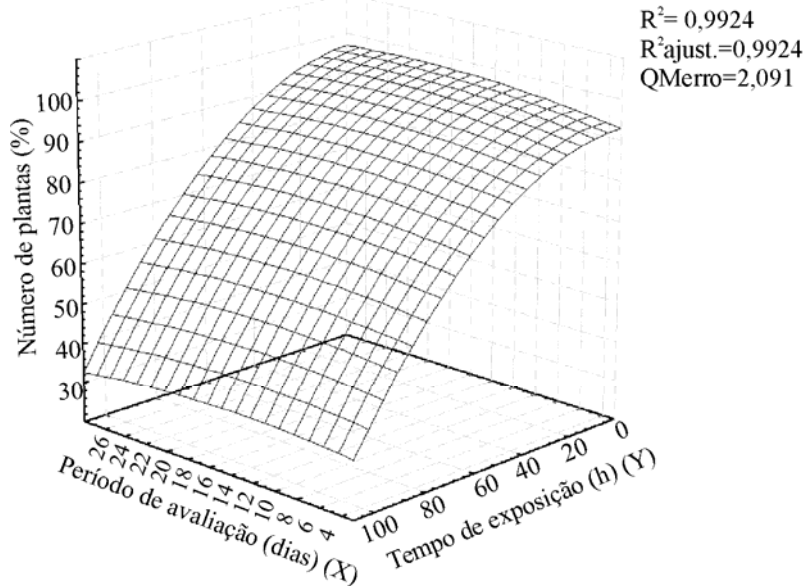


FIGURA 1. Emergência de plantas em função do tempo de incubação e do período de avaliação, para as cultivares Delta Pine Acala 90 (A) e IAC 2226 (B) inoculadas. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A $Z = 91,2374 + 0,5767X + 0,0121Y - 0,0134X^2 - 0,0021XY - 0,0051Y^2$



B $Z = 71,7045 - 0,1727X - 0,0764Y - 0,0034X^2 - 0,0008XY - 0,0017Y^2$

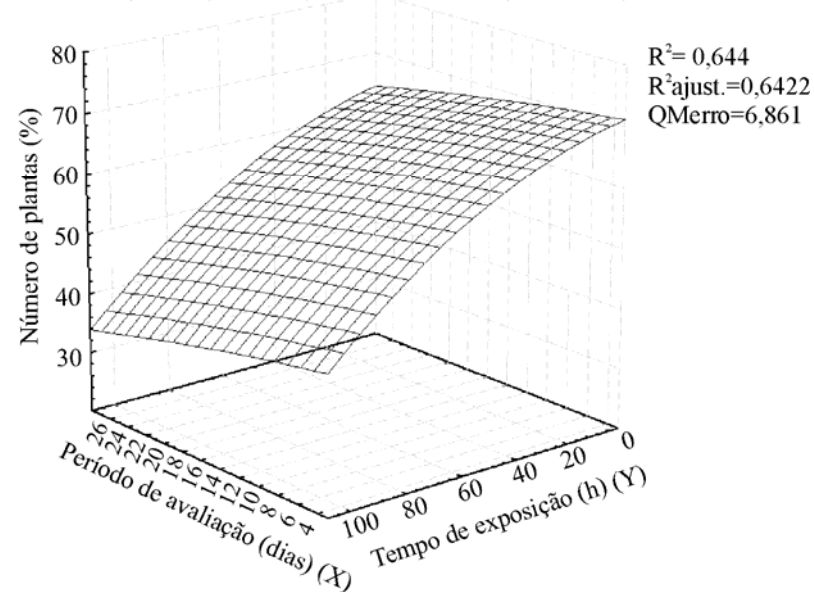


FIGURA 2. Emergência de plantas em função do tempo de incubação e do período de avaliação, para as cultivares Delta Pine Acala 90 (A) e IAC 2226 (B) não inoculadas. UFLA, Lavras, MG, 2008.

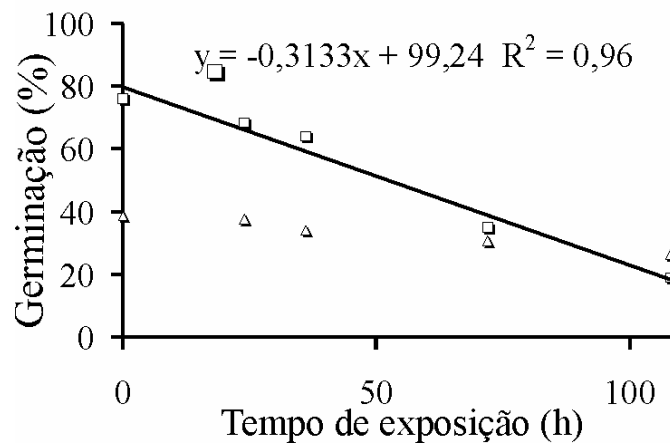


FIGURA 3. Germinação de sementes cultivar Delta Pine Acala 90 (□) e linhagem IAC 2223 (Δ) de algodoeiro, em função do tempo de exposição das sementes a *C. gossypii* var. *cephalosporoides*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Com base nos resultados do índice de velocidade de emergência ficou evidenciado que houve decréscimo de vigor à medida que se aumentou o tempo de exposição da semente ao patógeno na cultivar Delta Pine Acala 90 bem como, na linhagem IAC 2226 (figura 4A). Lotes de sementes que obtêm maiores índices de velocidade de emergência no campo são considerados mais vigorosos que aqueles que apresentam menores índices, estes apresentando emergência mais lenta (Bruno, 1995, citado por Suñé et al. 2002). Como a qualidade fisiológica inicial e sanitária da linhagem resistente era inferior, o desempenho da cultivar Delta Pine Acala 90 nesse quesito foi superior, mesmo sendo ela considerada mais suscetível à doença.

Já no gráfico de sementes sem a presença do fungo (Figura 4B), observou-se diminuição do vigor à medida que se aumentou o tempo de exposição. Nos tempos maiores houve efeito negativo, como já foi observado na superfície de resposta de sementes osmocondicionadas em relação ao número de plantas e período de avaliação (Figura 2). Em estudos de tecnologia de sementes

utiliza-se o condicionamento osmótico, em tempos, geralmente menores, para potencializar o desempenho da semente. Já na patologia de sementes, o alvo é encontrar uma relação entre o melhor tempo de exposição e a máxima infecção da semente de modo a atender os objetivos dos trabalhos nessa área.

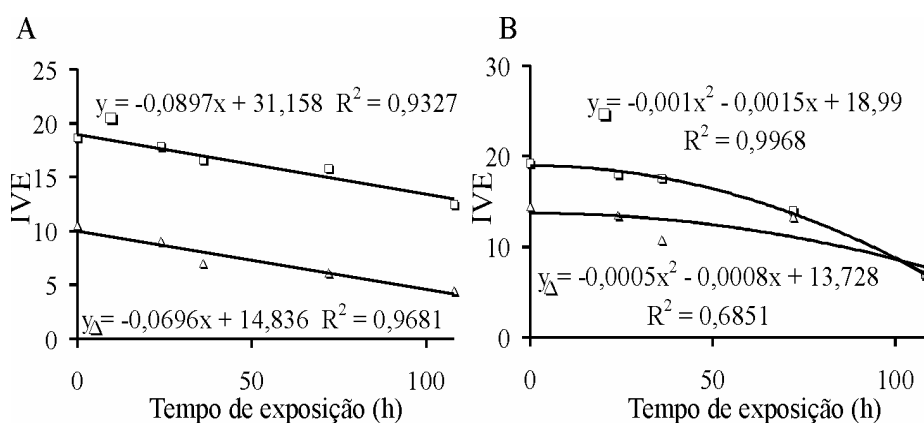


FIGURA 4. Índice de velocidade de emergência de plantas de algodoeiro (IVE) da cultivar Delta Pine Acala 90 (□) e da linhagem IAC 2226 (Δ), em função do tempo de exposição de sementes inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (A) e não inoculadas (B), sob condicionamento osmótico. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Em relação ao estande inicial e final, foi possível observar diminuição de valores dessas variáveis, tanto na cultivar Delta Pine Acala 90 como na linhagem IAC 2226 (Figura 5). Foi possível também observar a diferença de qualidade entre os dois materiais avaliados. De acordo com Eira e Marcos Filho (1990), um dos mais importantes sintomas do declínio da qualidade fisiológica é a lentidão do processo de germinação das sementes, acompanhada pelo aumento do período decorrido entre a germinação da primeira e da última semente de um lote e conseqüente desuniformidade entre plântulas de um mesmo lote. Além disso, quanto maior o tempo requerido para a emergência das plântulas, eleva-se os riscos oferecidos por estresses abióticos e bióticos no campo (Khan et al., 1992).

A linhagem IAC 2226 apresentou valores baixos de estande inicial, final e IVE em todos os tempos de exposição ao patógeno, percentual de germinação, quando analisadas no teste de rolo de papel, demonstrando baixa qualidade fisiológica desse material.

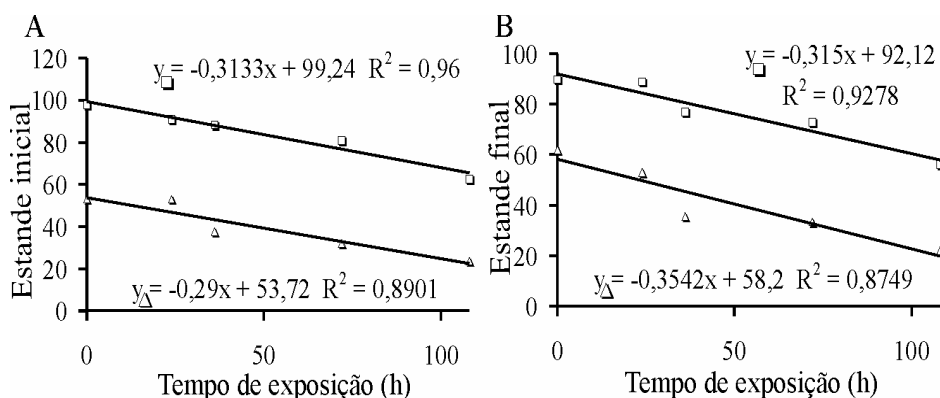


FIGURA 5. Estande inicial (A) e estande final (B) cultivar Delta Pine Acala 90 (□) e linhagem IAC 2223 (Δ) de algodoeiro, em função do tempo de exposição das sementes a *C. gossypii* var. *cephalosporoides*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

O efeito do aumento do tempo de exposição ao fungo *C. gossypii* var. *cephalosporoides* sobre a matéria seca da parte aérea (Figura 6), seguiu a mesma tendência para ambos materiais testados neste trabalho, a exemplo do que ocorreu com as demais variáveis consideradas. Houve também diminuição dos valores de peso de matéria seca de plantas da cultivar Delta Pine Acala 90 proveniente de sementes infectadas pelo patógeno comparada às plantas oriundas de sementes que foram apenas osmocondicionadas. Essa diferença foi bem menor para o caso da linhagem IAC 2226 nas mesmas condições. Embora a variação do tamanho das plantas para essa linhagem fosse extremamente heterogêneo, ao contrário da cultivar Delta Pine Acala 90, quando avaliou-se matéria seca os valores passaram

a representar a média dentro de cada tempo de exposição e permitiu a observação da diferença entre os dois lotes.

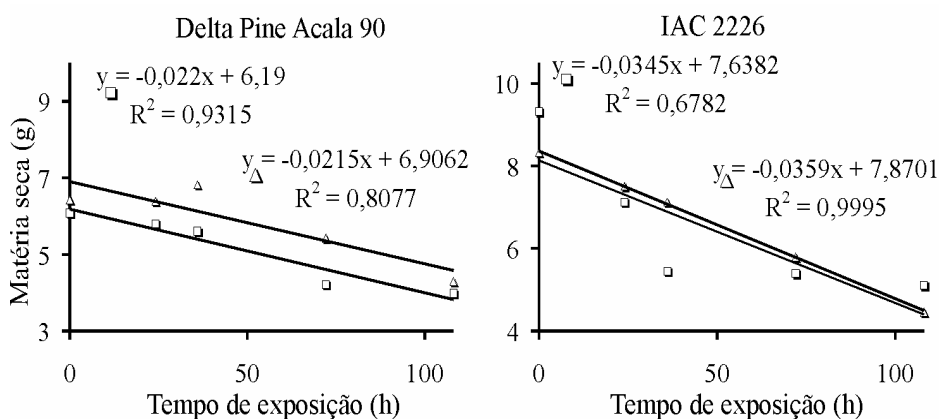


FIGURA 6. Matéria seca de plantas de algodoeiro em função do tempo de exposição de sementes inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (□) e não inoculadas (Δ), sob condicionamento osmótico. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Quando se avaliou o efeito do tempo de exposição sobre a incidência de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, avaliada pelo teste de sanidade pode ser observado que houve um incremento gradual dos valores de incidência nos materiais utilizados. A partir de 24 horas de exposição este incremento foi mais reduzido (Figura 8). Na cultivar suscetível a ocorrência de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* foi superior a ocorrência na resistente, o que pode ser explicado pela característica de resistência da linhagem. Esses dados sugerem que para a obtenção de sementes infectadas os tempos de exposição a partir de 24 horas são suficientes. É oportuno ressaltar que no presente caso levou-se em consideração apenas a incidência do fungo, não sendo analisada a intensidade do mesmo nas sementes inoculadas. Isto sugere que novos estudos sejam conduzidos para checar este aspecto. Machado et al. (2004) concluíram que o tempo de 48 horas foi suficiente e adequado para a inoculação de sementes de algodão para

esse mesmo patossistema. Tanaka et al. (1989), por sua vez, verificaram que a partir de 12 de horas de contato das sementes com a colônia fúngica, já ocorre infecção, mas que o período de 24 horas de exposição seria mais adequado para se obter maiores taxas de infecção, em substrato sem restrição hídrica. Estes resultados deixam claro que inúmeros fatores podem interferir neste tipo de estudo, fazendo com que a seleção de material hospedeiro e do patógeno devam ser criteriosa.

Na análise da severidade da doença (Figura 7), avaliada por meio do índice de doenças (ID), foi possível observar aumento deste índice com o aumento do tempo de exposição, no caso da cultivar suscetível. Já para a linhagem resistente, foi possível observar aumento no índice de doença de forma gradual com o aumento do tempo de exposição da semente ao fungo, para se manter constante em tempos de exposição maiores. Esse fato pode confirmar a tendência de resistência da linhagem IAC 2226 a ramulose e de suscetibilidade da cultivar Delta Pine Acala 90.

A relação do índice de doença e incidência do fungo nas sementes, em cada tempo de exposição proporciona o cálculo da taxa de infectividade. Para a cultivar, os valores dessa taxa foram crescentes até o final do tempo de avaliação, sendo reduzida gradualmente para a linhagem.

Em outros patossistemas chama atenção o fato que há aumento mais acentuado da incidência dos tempos de contato das sementes com os mesmos. Exemplos são os patossistemas *F.oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijão (Costa et al. 2003) e *F.oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Araújo et al.2006).

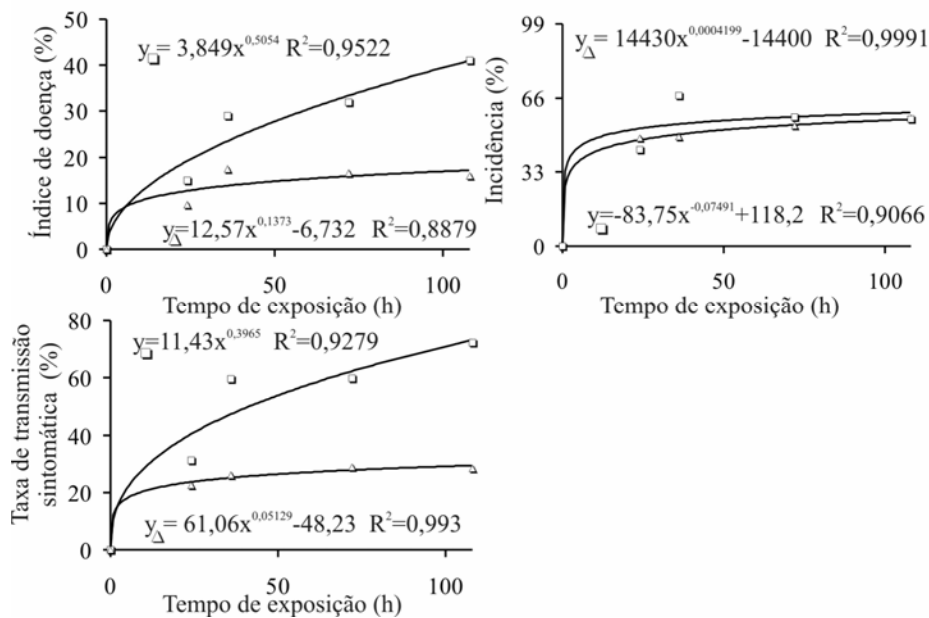


FIGURA 7. Índice de doença, sanidade e taxa de transmissão sintomática de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* da cultivar Delta Pine Acala 90 (□) e da linhagem IAC 2226 (Δ), em função do tempo de exposição de sementes inoculadas sob condicionamento osmótico. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Por meio dos resultados obtidos neste trabalho, foi observado que há um componente diferencial entre cultivares, no caso de algodão, e especificamente de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, em relação à taxa de transmissão sintomática. Isto se torna bastante importante no estabelecimento de padrões sanitário exigidos em programas de certificação. Percebe-se que no estabelecimento desses padrões fatores como genótipos do hospedeiro, potencial do inóculo, dentre outros fatores devem ser considerados.

6 CONCLUSÃO

A cultivar Delta Pine Acala 90, considerada suscetível a ramulose e a linhagem IAC resistente, comportaram-se de maneira diferente expressando estas características no que tange às variáveis: emergência de plantas, índice de doença e taxa de infectividade aparente.

O efeito do condicionamento osmótico, por meio de manitol a -0,8 MPa, em sementes de algodão, cultivar Delta Pine Acala 90 e linhagem IAC 2226, na ausência do patógeno, causou reduções do percentual de emergência de plantas a partir de 24 horas nestas condições. Na presença do fungo, a redução da emergência de plantas foi mais acentuada em comparação com sementes não infectadas.

Pela técnica de condicionamento osmótico foi possível observar que o agente da ramulose provocou efeito negativo crescente no desempenho das sementes infectadas.

A incidência do patógeno nas sementes apresentou um aumento gradual com o aumento do tempo de exposição das sementes ao fungo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A.; SOUZA MACHADO, V.; HAMILL, A. S. Osmoconditioning of tomato and onion seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 43, n. 3/4, p.213-224, July 1990.

ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CELANO, F.; CARVALHO, E. M.; CAMARGOS, V. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n.1, p.35-40, jan./fev. 2006.

BRADFORD, K. J.; STEINER, J. J.; TRAWATHA, S. E. Seed priming influence on germination and emergence of pepper seed lots. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 3, p. 718-721, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 1992. 360 p.

BROCKLEHURST, P. A.; DEARMAN, J. Interactions between seed priming treatments and nine seed lots of carrot, celery and onion. II : seedling emergence and plant growth. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 102, n. 3, p.585-593, 1983.

CANTLIFFE, D. J.; ELBALLA, M. Improved germination of carrot at stressful high temperature by seed priming. **Proceedings of the Florida State Horticulture Society**, Lake Alfred, v. 107, p.121-128, 1994.

CARVALHO, J. M. F.; CARVALHO, L. P.; COSTA, J. N. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p.105-115, 1985.

CASSETARI NETO, D., MACHADO, A. Q. **Doenças do algodoeiro : diagnose e controle**. Várzea grande: UNIVAG, 2000, 47 p.

CELANO, F. A. de O. **Desempenho de sementes de algodão durante o armazenamento, após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pela técnica de restrição hídrica.** 2004. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CIA, E.; FUZATTO, M. G. Relevância de patógenos varia de acordo com a região. **Visão Agrícola Algodão**, Piracicaba, n. 6, p. 35-39, jul./dez. 2006.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H. ; AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed). **Manual de fitopatologia : doenças das plantas cultivadas.** 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, p 33-48.

COSTA, M. L. N.; MACHADO, J. C. ; GUIMARÃES, R. M.; POZZA, E. A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out. 2003.

EIRA, M.T.S. ; MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de alface : II desempenho sob estresse hídrico salino e térmico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.12, n.1, p.28-45, 1990.

FUZATTO, M. G. ; CIA, E. Avaliação de cultivares e linhagens avançadas de algodoeiro para resistência a doenças. In: FUNDAÇÃO MATO GROSSO. (Ed.). **Relatório facual.** Rondonópolis, 2004.13 p.

GOULART, A. C. P. Doenças iniciais do algodoeiro : identificação e controle. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes qualidade fitossanitária.** Viçosa, MG: UFV, 2005. 502 p.

JULIATTI, F. C. ; RUANO, O. Algodão(*Gossypium hirsutum* L.) : controle de doenças: doenças causadas por fungos e bactérias. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas.** Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1997. v. 2, p. 555-570.

KHAN, A. A.; ABAWI, G. S. ; MAGUIRRE, J. D. Integrating matricconditioning and fungicidal of table beet seed to improve stand establishment and yield. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 1, p. 231-237, 1992.

KIKUTI, A. L. P.; OLIVEIRA, J. A.; MEDEIROS FILHO, S.; FRAGA, A. C. Armazenamento e qualidade fisiológica de sementes de algodão submetidas ao condicionamento osmótico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 439-443, mar./abr. 2002.

LIMA, E. F.; CARVALHO, J. M. F.; CARVALHO, L. P.; COSTA, J. N. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* através da semente de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, n.1, p. 99-109, fev.1985.

MACHADO, A. Q. **Uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro**. 2002. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A. de O. ; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 62-67, 2004.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. In: LUZ, W. C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 1994. v. 2, p. 229-263.

MACHADO, J. C. ; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 502 p.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-219, Nov. 1923.

MENTEN, J. O. M. Situação dos padrões de sanidade de semente no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, p. 142-147, 2005. Suplemento.

METHA, Y. R.; MENTEN, J. O. M. Doenças e seu controle. In: FUNDO DE APOIO À CULTURA DO ALGODÃO. **Algodão** : pesquisas e resultados para o campo. Cuiabá: FACUAL, 2005. v. 2, p.156-205.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, Jan./Fev. 1995.

NUNES, U. R.; SABNTOS, M. dos R.; MANTOVANI, E. A.; DIAS, D. C. F. S. Efeito do condicionamento osmótico e do tratamento com fungicida na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 22, n.1, p.239-246, 2000.

PIZZINATTO, M. A.; CIA, E. ; FUZATTO, M. G. Estudos preliminares sobre a transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes de algodão e sua disseminação em campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n.2, p. 111, jul. 1988.

PIZZINATO, M. A.; CIA, E. ; FUZATTO, M. G. Transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 17, p. 207-217, jul./dez. 1991.

ROVIERI, J. S. C. B.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M.; RODRIGUES, R. Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de pimentão submetidas ao condicionamento osmótico, utilizando diferentes agentes osmóticos e meios de embebição. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 2, p.217-223, 1999.

SANTOS, G. R. **Progresso da ramulose do algodoeiro e transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pelas sementes.** 1993. 53 p.

Dissertação. (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SANTOS, G. R.; ZAMBOLIM, L. ; BATISTA, U. G. Transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes do algodoeiro em função do período de inoculação das plantas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 19, n. 3/4, p. 171-80, 1993.

SIQUERI, F. V. Avaliação de modos e épocas de aplicação de fungicidas para o controle e doenças foliares na cultura do algodoeiro. In: FUNDAÇÃO MATO GROSSO (Ed.). **Relatório facual**. Rondonópolis, 2003.43 p.

SUÑÉ, A. D.; FRANKE, L. B.; SAMPAIO, T. G. Efeitos do condicionamento osmótico na qualidade fisiológica de sementes de *Adesmia latifolia* . **Revista Brasileira de Sementes**, Pelota, v. 24, n.1, p.18-23, 2002.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MARIANNO, M. I. A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.15, p. 233-237, jul./dez.1989.

TANAKA, M. A. S. ; MENTEN, J. O. M. Relação entre a resistência do algodoeiro à ramulose e a transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pelas sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 18, p. 227-234, jul./dez. 1992a.

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

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, 1995. p. 93-108.

TANAKA, M. S.; MENTEN, J. O. M. Variação patogênica e fisiológica de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 18, p. 139-145, 1992b.

TEIXEIRA, H. *Colletotrichum gossypii* South em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum.*): transmissibilidade e controle. 1995. 58 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n. 5, p.1045-1052, set./out. 2003.

WATKINS, G. M. (Ed.). **Compedium of cotton diseases**. St.Paul: APS, 1981.87 p.

CAPÍTULO 4

DETECÇÃO DE *Stenocarpella* sp. EM SEMENTES DE MILHO INOCULADAS, POR MEIO DE PCR

1 RESUMO

Barrocas, Ellen Noly. Detecção de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas, por meio de PCR. In **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. Cap. 4, p.85-107. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras.*

Sementes de milho infectadas pelo complexo *Stenocarpella* constituem um meio eficaz de introdução dos patógeno em novas áreas, causando a podridão do colmo e da espiga e manchas foliares. A garantia da sanidade de sementes é uma importante tática de manejo dessa doença. Todavia, o número de sementes infectadas, a dificuldade dos métodos de detecção e a possibilidade da presença assintomática dessa doença na fase inicial do milho, podem comprometer o seu diagnóstico preciso. As detecções atuais se baseiam na observação das sementes incubadas no teste de papel de filtro, mas, o teste pode ser demorado e nem sempre confiável. O objetivo nesse trabalho foi avaliar a viabilidade da técnica PCR para a detecção de *Stenocarpella* sp. em sementes infectadas. Para isso sementes de milho foram infectadas pela técnica do condicionamento osmótico por 72 horas e misturadas com sementes saudáveis nos níveis de 100, 20, 10, 2, 1 e 0% de infecção. A técnica PCRA foi sensível para a detecção de até 2% de sementes infectadas, mas não foram sensíveis para distinguir as espécies de *Stenocarpella*. A técnica foi sensível para detectar os patógenos *S. maydis* e *S. macrospora* em cultura pura e/ou associado à sementes. A concentração de DNA necessária para a detecção de *Stenocarpella* sp. em cultura pura foi de 10ng.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Co-orientadora)

2 ABSTRACT

Barrocas, Ellen Noly. Detection of *Stenocarpella* sp in infected seeds of maize by PCR technique. In: _____ **Effects of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* on seeds and plants of cotton and detection of *Stenocarpella* sp in infected seeds of maize by PCR technique.** 2008. Chap. 4, p. 85-107. Thesis (Doctorate in Agronomy/Phytopathology)-Federal University of Lavras.*

Seeds of maize infected by species of *Stenocarpella* are important source of inoculum for the dissemination and introduction of those fungi in cultivating areas of that crop. The use of health seeds in that case is therefore an important strategy for the preventive control of such disease. However, one of the current difficulties in the health quality control programs for maize seeds is the availability of a reliable and quick method for the detection of those fungi in routine analysis. The current methods are time consuming and the evaluation of the fungi by analysts is rather subjective. Based on that, the present work was proposed having in sight the possibility to use the PCR technique, as an alternative method for the precise detection of those pathogens in maize seeds. That technique has already proved to be reliable for the detection of *Stenocarpella maydis* in other countries. For the conduction of this work, seeds of maize were artificially infected by those pathogens through the osmopriming technique as described in literature. In the present case seeds were incubated on the fungal colonies developed in agar media containing mannitol at -1,4 MPa for 72 h under favorable conditions for both fungi development. Seed samples to be submitted to analysis were prepared to contain infected seeds at the incidences of 100, 20, 10, 2, 1 and 0%. The primers used were able to detect both fungi in association with seeds with a maximum sensibility of 2% i.e. 2 infected seeds in mixture with 98 non infected seeds. However those primers were not able to distinguish both species. The minimum concentration of DNA required to produce clear bands in the eletrophorese gel was 10 ng. This study showed that the PCR technique was able to detect the *Stenocarpella* complex not only in pure cultures but also in seeds, which is the major target of the routine seed analysis for several pathogens of economical importance in Brazil.

* Guidance Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) e Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Co- Adviser).

3 INTRODUÇÃO

Os fungos *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sacc. e *Stenocarpella macrospora* Earle são importantes patógenos da cultura do milho, incitando podridões do colmo, raízes e espigas e também a morte de plântulas (Casa et al., 2006). No Brasil a doença está presente em todas as regiões produtoras e ocasiona perdas no rendimento e redução na qualidade dos grãos, além de serem produtoras de micotoxinas (Eddins, 1930; Dorrance et al., 1998).

As espécies do gênero *Stenocarpella* são necrotróficas, apresentam fase parasitária na planta viva e fase saprofítica em restos culturais (Casa et al., 2003; Casa et al., 2006). Dessa forma, podem formar picnídios nos restos culturais e sobreviver no interior das sementes como micélio, constituindo importantes fontes de inóculo primário (Casa et al., 1998). A semente infectada constitui a principal forma de introdução do complexo *Stenocarpella* em novas áreas.

A garantia do uso de sementes sadias é uma importante estratégia de manejo da doença. Para isso, é necessário que a diagnose seja rápida e confiável. A metodologia de detecção dessas espécies baseia-se em coloração de suas colônias desenvolvidas sobre papel-de-filtro (Mario & Reis, 2001), bem como a observação de características morfológicas, conforme os métodos recomendados pela *International Seed Testing Association* – ISTA.

Todavia a diagnose de *Stenocarpella sp.* pode ser comprometida com o rápido crescimento de outros microorganismos, principalmente quando a semente é acometida de infecções múltiplas de diferentes patógenos ou é portadora de organismos saprofíticos (Phan, et al., 2002), além do tempo necessário para a formação de picnídios que auxiliam na correta identificação entre espécies do referido gênero.

Devido a sua grande importância, a espécie *S. maydis* é o único patógeno potencial do milho a ser enquadrado na proposição de tolerância em sementes, elaborada para o Brasil (Machado & Pozza, 2005).

A detecção baseada na reação de polimerase em cadeia (PCR) pode ser uma alternativa viável para uma diagnose rápida com alta sensibilidade e possível de ser adaptada à análise de rotina (Lee et al., 2002). O método tem sido utilizado para detectar, identificar e quantificar fitopatógenos. Na última década, diversos trabalhos foram desenvolvidos, com sucesso, para a detecção de patógenos associados, em sementes em combinação com outras técnicas ou não, incluindo bactérias (Song et al., 2004; Berg et al., 2006), vírus (Pahalawatta et al., 2007; Post et al., 2003; Gillaspie et al., 2001) e fungos (Chilvres, et al., 2007; Ioos et al., 2007; Rios et al., 2007; Chadha & Gopalakrishna, 2006; Pasquali et al., 2006; Pethybridge et al., 2006; Guillemette et al., 2004; McNeil et al., 2004; Lee et al., 2002; Bates et al., 2001; Lee et al., 2001; Pryor & Gilbertson, 2001; Frederick et al., 2000; Zhang et al., 1999)

O objetivo do trabalho foi avaliar a potencialidade do uso de PCR, utilizando regiões ITS do genoma na detecção de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho com isolados brasileiros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos isolados e manutenção das culturas

Colônias puras dos fungos patogênicos ao milho (Tabela 1) foram obtidas de diferentes fontes e transferidas para meio de batata dextrose ágar (BDA) e mantidas em incubação, à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h por sete dias. O micélio de cada isolado fúngico, crescido superficialmente, foi raspado, lavado com água estéril, seco e armazenados em nitrogênio líquido.

Posteriormente, cada micélio foi macerado com pistilo em almofariz de louça contendo nitrogênio líquido para posterior extração de DNA.

TABELA1. Isolados de fungos patogênicos de milho usados no trabalho.

Fungo	Código	Origem	Contribuição
<i>S.maydis</i>	MY1	Sete Lagoas,	CNPMS ^b
<i>S.maydis</i>	MY2	Sete Lagoas	CNPMS ^b
<i>S.maydis</i>	CML594	Brasil	CML ^a
<i>S.maydis</i>	CML 603	Brasil	CML ^a
<i>S.maydis</i>	CML 697	Brasil	CML ^a
<i>S.maydis</i>	CML 698	Brasil	CML ^a
<i>S.macrospora</i>	MC1	Sete Lagoas	CNPMS ^b
<i>S.macrospora</i>	MC2	Sete Lagoas, Brasil	CNPMS ^b
<i>S.macrospora</i>	MC-M	Monsanto, Brasil	
<i>F.graminearum</i>	CML 780	Brasil	CML ^a
<i>F. verticillioides</i>	CML 323	Brasil	CML ^a

^a Coleção Micológica de Lavras-Universidade Federal de Lavras, Brasil;^b Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Milho e Sorgo, Brasil.

4.2 Preparo e inoculação das sementes

Sementes de milho híbrido 3041 (Monsanto) foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2%, por 1 min, secas à sombra e inoculadas com o isolado CML 697 de *S.maydis*, pelo método de restrição hídrica (Machado et al., 2001). A metodologia constou da adição de suspensão de conídios, em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo manitol (96,4 g/L) em meio BDA, com potencial hídrico ajustado para -1,4 MPa, segundo cálculo do software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995). As placas foram mantidas em incubação à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, por sete dias, quando as sementes foram colocadas sobre cultura fúngica e permaneceram em incubação por 72 h, nas mesmas condições. Em seguida foram secas à sombra para posterior mistura com sementes sadias.

4.3 Extração de DNA

As amostras das sementes foram maceradas em moinho refrigerado, até a obtenção de um fino pó. Foram retirados aproximadamente 1 grama de cada amostra/isolado, macerado em nitrogênio líquido e, para cada repetição, foram pesado 0,04 gramas para a extração de DNA. Este foi imediatamente extraído com Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Os pares de *primers* ITS1/ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG/TCCCTCCGCTTATTGATATGC) e P1/P2 (GTTGGGGGTTTAAACGGCACG/GTTGCCTCGGCACAGGCCGG) foram utilizados para as ampliações da PCR para todos os isolados em culturas puras. Para a amplificação em sementes inoculadas, utilizaram-se somente os *primers* P1 e P2.

A qualidade dos DNAs foi observada em gel de agarose 0,8% em tampão 1xTBE (40mM Tris-borato, 1mM EDTA, pH 8,0), sendo corados com brometo

de etídio ($0,5 \text{ mgL}^{-1}$), visualizados sob luz UV. O DNA foi quantificado no Spectrophotometer ND 1000 Nano Drop.

4.4 Amplificação da PCR

Os *primers* universais ITS1 e ITS4 foram utilizados para amplificar regiões ITS do rDNA de todos os fungos trabalhados. Os *primers* P1/P2 descritos por Xia & Achar (2001), foram utilizados para amplificar as regiões presentes somente nos isolados de *S. maydis*. A amplificação foi realizada em $25\mu\text{l}$ da reação contendo tampão da PCR (tampão IB - Phoneutria, Brasil) 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100, 15 MgCl_2 , dNTPs ($2,5 \text{ mM}$ de cada dNTP), *primers* ($10 \mu\text{M}$ de cada *primer forward* ou *reverse*) e $5\text{u}/\mu\text{l}$ unidades *Taq* DNA polimerase (Phoneutria, Brasil). Para a amplificação dos isolados utilizou-se 20 ng de DNA e para a amplificação das sementes inoculadas, utilizaram-se $2\mu\text{l}$ do DNA concentrado.

A amplificação constou, inicialmente, de desnaturação de 95° por 3 minutos, 30 ciclos: desnaturação 94° por 30 segundos, anelamento de 60° por 1 minuto e extensão de 72° por 1 minuto com extensão final de 72° por 10 minutos. Uma alíquota de $10 \mu\text{l}$ foi utilizada para separar os produtos da PCR em gel de agarose 0,8% em tampão TBE a 150V por aproximadamente, 2 horas. O gel foi corado com brometo de etídio por 30 minutos e os produtos da PCR foram observados em transluminador UV.

4.5 Checagem da sensibilidade e especificidade da técnica

Para determinar a sensibilidade e a capacidade do par de *primer* específico (P1/P2) em amplificar com o decréscimo da quantidade de DNA, foram realizadas amplificações com diluições seriadas do isolado CML 697 de *S.maydis* nas concentrações de $20\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$ até $2\text{pg}\mu\text{l}^{-1}$ em duas repetições.

Para determinar a especificidade dos *primers* P1/P2 foram testados o DNA genômico ($20\text{ng}/\mu\text{L}$) de 11 isolados fúngicos (Tabela 1) e comparados com o par de *primers* universal.

4.6 Detecção de *Sternocarpella* sp. em sementes

Para determinar o limite de detecção das amostras de PCR em sementes, lotes de 100 sementes foram preparadas misturando-se sementes artificialmente infectadas com sementes saudáveis, gerando níveis diferenciados de infecções: 100, 20, 10, 2 e 1%, a fim de se determinar o nível mínimo de detecção utilizando *primers* específicos. Para cada nível de infecção de sementes, o teste foi realizado em três replicatas e o experimento foi repetido três vezes.

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Patologia de Sementes e Eletroforese respectivamente dos departamentos de Fitopatologia e Agricultura, na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise eletroforética em gel de agarose a 0,8%, dos fragmentos do DNA obtidos com a amplificação em PCR dos isolados fúngicos provenientes da cultura do milho com os primers P1/P2, confeccionados por Xia & Achar (2001), geraram bandas de, aproximadamente, 375 pares de base, revelando especificidade somente para espécies do gênero *Stenocarpella sp.* Os fungos *Fusarium verticillioides* e *F. graminearum* tiveram amplificados somente fragmentos do DNA genômico correspondentes à região ITS1 e ITS4, também amplificada em todos os DNAs dos isolados de *Stenocarpella* analisados, com bandas de aproximadamente 575 pares de base (Figura 1). Os primers ITS1 e 4 foram utilizados como controle positivo para assegurar a qualidade do DNA e a especificidade dos *primers* alvo do trabalho.

As regiões *internal transcribed spacer* (ITS) do rDNA têm sido amplamente utilizadas para diferenciar e detectar espécies fúngicas proximamente relacionadas (Phan et al., 2002), uma vez que se mostram altamente conservadas dentro da mesma espécie e variável entre espécies (Lovic et al. 1995, Lee et al., 2001). A partir dessas regiões, diferentes *primers* são confeccionados para a detecção de organismos alvos. Inúmeros trabalhos têm lançado mão dessas regiões com sucesso, como são os estudos dos patossistemas *Alternaria*, em sementes de cenoura e crucíferas (Konstantinova et al., 2002; Iacomi-Vasilescu et al. 2002), *Rhizosporium secalis* em sementes de cevada (Lee et al., 2001)

O par de primer P1/P2 foi específico para diferenciar espécies de *Stenocarpella* de outras, mas não foi específico o suficiente para diferenciar espécies de *S. maydis* de *S. macrospora*. Somente o DNA genômico do isolado MC 1 não foi amplificado com os *primers* P1/P2 (Figura 1). No trabalho de Xia e Achar (2001) foi testado somente um isolado de *S. macrospora*. Dessa forma para

a distinção entre espécies desse gênero, é necessário que novos estudos, sejam desenvolvidos, utilizando um número maior de isolados de *S. macrospora* ou que se utilize outras metodologias para a confecção de primers mais específicos para a distinção das duas espécies. Essa tarefa, às vezes, não é muito fácil, conforme relataram Iacomí-Vasilescu et al (2002), em estudos relacionados ao desenho de primers a fim de se diferenciar de *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola* e *A. japonica* a partir de estudos de filogenia de regiões ITS. Neste estudo os primers foram específicos somente para distinguir as espécies *A. brassicae* de *A. japonica*.

Com a realização de pesquisas que estudem seqüências ou genes mais específicos ligados à patogenicidade, será possível a confecção de primers que diferenciem as duas espécies. Guillemette et al. (2004), por meio de primers desenhados a partir do gene requerido para a patogenicidade de *Alternaria brassicae* diferenciaram outras espécies do gênero em sementes infectadas de crucíferas.



FIGURA. 1. Amplificação do DNA genômico de isolados de *Stenocarpella maydis*, *S. macrospora*, *Fusarium verticillioides* e *F. graminearum*. Linhas 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21 representam a amplificação DNA genômico de culturas puras dos isolados MY1, MY2, CML697, CML698, CML594, CML603, MC-M, MC 1, MC 2, CML 780, CML 323, utilizando o primer universal ITS1/ITS4. Linhas 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22 representam a amplificação DNA genômico de culturas puras dos mesmos isolados já citados, utilizando o primer P1/P2. Linha M – 100 bp ladder DNA (Amersham, E.U.A).

No teste de sensibilidade para a série de diluição, a menor quantidade necessária de DNA para a detecção do isolado CML 697 de *S. maydis* foi de 200 pg (Figura 2). O limite de detecção para diferentes espécies fúngicas também parece ser variável. Pryor & Gilbertson (2001), avaliaram a detecção de *Alternaria radicina* e encontraram o limite de detecção de 200 fg, Guillemette *et al.* (2004) detectaram o limite de 100 pg para a cultura de *Alternaria brassicae*, Chada & Gopalakrishna (2006) detectaram 20 pg como a menor quantidade de DNA para detectar *Magnaporthe grisea*; Lee, *et al.* (2001) detectaram até 10 pg de *Rhizosporium secalis*, Ioos *et al.* (2007) detectaram até 3 pg de DNA de *Plasmopara hastedii* em girassol. Todos os autores acima citados avaliaram a sensibilidade da técnica somente em culturas puras.

Dombrowski *et al.* (2006) avaliaram a concentração necessária para a detecção de *Neotyphodium* sp. em cultura pura e na cultura associada à semente de azevém e concluíram que a quantidade necessária para detectar o fungo quando ele está associado à sementes é 10 vezes maior do que quando está em cultura pura. Neste trabalho, somente as culturas puras foram diluídas para a concentração de 20 ng, enquanto para a PCR das sementes com o patógeno associadas foram utilizados 2 µL do DNA purificado da semente em associação com o patógeno. Nesse caso, as concentrações de DNA variaram entre 95 ng/ µL a 205 ng/ µL entre todas as porcentagens de sementes infectadas (dados não mostrados).

Como não é possível diferenciar e quantificar o DNA do patógeno e da semente separadamente quando se faz a extração de DNA, utilizou-se a mesma quantidade de DNA para todos os níveis de infecção, sem se preocupar em quantificar. Mas, as concentrações de DNA do patógeno parecem que não influenciaram na detecção do patógeno.

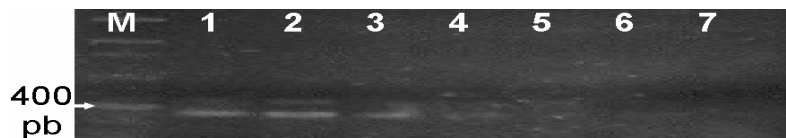


FIGURA 2. Limite de detecção do DNA genômico de *S. maydis* utilizado com o par de primer P1/P2. O par de primers foram usados em reação de polimerase em cadeia com uma série de diluição do DNA genômico total *S maydis* (CML 697). Linhas de 1 a 7: 200ng, 20ng, 10ng, 200pg, 20pg, 2pg, 200fg do DNA genômico total. Linha M contém ladder com 100bp (Amersham, USA).

Foram observadas bandas de 325 pares de base, correspondentes ao primer P1/P2, desenhados por Xia e Achar (2001) para a detecção de *Stenocarpella maydis* em extratos de sementes de milho, por meio da técnica PCR, com até 2% de infecção (Figura 3). Em todas as repetições, foi observada repetibilidade do teste para cada nível de infecção das sementes. O resultado de 3 replicatas de cada amostra utilizando 0,04 gramas de pó fino misturadas em sementes saudáveis e infectadas é resumido na Tabela 1.

O nível zero de infecção foi realizado com sementes saudáveis, sem a presença de espécies de *Stenocarpella*. Para o nível de 1% de infecção de sementes também foi possível a diagnose precisa, porém, sem que todas as repetições se mostrassem positivas. Como a inoculação, nesse caso, foi realizada em apenas uma semente e esta foi misturada à 99 sementes, é possível que tenha ocorrido desuniformidade da mistura no momento da maceração das sementes ou na retirada da amostra para a extração do DNA.

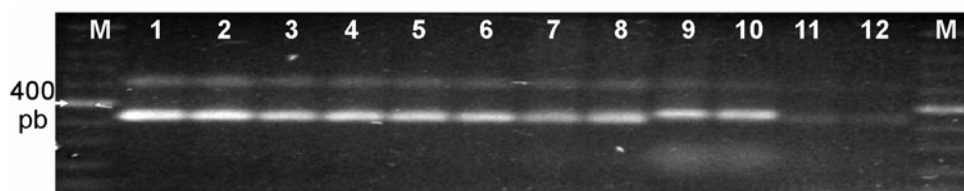


FIGURA 3. Amplificação do DNA genômico de *Stenocarpella maydis* em diferentes níveis de infecção em sementes de milho.
Linha M= 100-bp DNA ladder 1-2=100%, 3-4=20%, 5-6= 10%, 7-8=2%, 9-10=1%, 11-12=0%.

TABELA 1 Resultados da detecção de *Stenocarpella* sp em semente de milho infectadas artificialmente com diferentes níveis usando a técnica PCR

Detecção de <i>Stenocarpella</i> sp por PCR ^a									
Sementes infectadas (%)	Amostra 1			Amostra2			Amostra 3		
	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep.3
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	-	-	+	-	+	+	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Presença(+) ou ausência(-) de bandas amplificadas com o primer P1/P2 para a detecção de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho.

O PCR em tempo real pode ser uma possibilidade para aumentar a sensibilidade em relação ao PCR convencional. Em trabalhos de patologia de sementes, é possível quantificar a presença de apenas um esporo contaminando sementes (Clivers et al., 2007). McNeil et al., 2004 quantificaram a contaminação de menos de um esporo por semente com confiança de 95% de *Tilletia caries* em sementes de trigo por meio de curvas de calibração. A sensibilidade da técnica quando em culturas puras chega a 100 pg para *Alternaria brassicae* (Guillemette et al., 2004) e 10 fentigrams para *Botrytis* spp. (Clivers et al., 2007).

A detecção de fungos a partir de sementes pode encontrar algumas dificuldades, como presença de inibidores, baixos potenciais de inóculo e presença de patógenos que ocorram em conjunto. Para a extração de DNA a partir de sementes de milho, é necessário que sejam eliminados ou reduzidos os inibidores de PCR que, normalmente, se encontram em sementes como polifenóis, taninos e polissacarídeos que são componentes naturais das plantas. No caso de sementes de milho os polissacarídeos são conhecidos como importantes inibidores, já que torna o extrato da planta ou semente viscoso, dificulta a pipetagem, impede a atividade da Taq polimerase e a amplificação durante a PCR e interfere na concentração do DNA (Fang et al., 1992; Porebski, et al., 1997).

Algumas modificações de protocolos usuais como CTAB e TE têm sido sugeridas afim de promover a precipitação dos carboidratos (Do & Adams, 1991; Fang et al., 1992; Porebski, et al., 1997). Neste estudo, não foi observada a presença de inibidores que pudessem comprometer a extração do DNA de patógenos associados às sementes de milho, com o uso do kit Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega). O uso de kits comerciais para a extração de DNA tem se mostrado um grande facilitador da técnica, já que agiliza o processo de automação para extração de DNA, diminuindo etapas de extração e problemas com inibição comumente encontrada quando na extração do DNA de sementes

(Phan et al., 2002; Konstantinova et al., 2002; Guillemette et al., 2004; Ioos et al., 2006). Neste trabalho o uso do kit comercial também se mostrou eficiente para a extração de DNA, tanto da cultura pura quanto do patógeno associado à semente de milho (Figura 4).

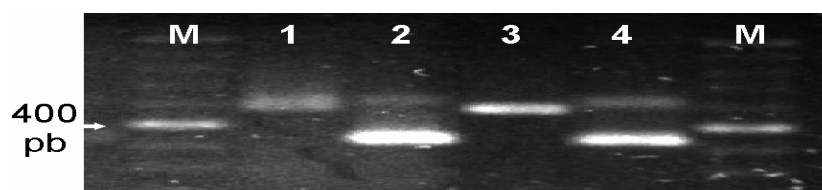


FIGURA 4. Gel de eletroforese da reação de polimerase em cadeia obtidas com o primer universal da região internal transcribed spacer (ITS 1 e ITS 4) e com o primer específico (P1/P2) para DNA de *Stenocarpella* sp. DNA foi extraído da cultura pura (1-2) e de semente infectada (3-4).Linha M – 100 bp ladder DNA (Amersham, E.U.A).

A metodologia utilizada nesse trabalho mostrou-se promissora quando comparada com o teste de papel de filtro utilizado em rotina. A extração de DNA do patógeno diretamente da semente, com a utilização de kits comerciais, sem necessidade de incubação, reduz o tempo de detecção do patógeno para 1 dia de teste ao passo que há necessidade de, aproximadamente, 14 dias para a detecção atual em testes de rotina.

Ainda é necessário testar e comparar a metodologia em sementes naturalmente infectadas. Talvez nesse caso, seja necessária a incubação de sementes, para que ocorra o incremento da biomassa, caso os níveis do patógeno sejam muito baixos.

A Bio PCR também pode ser utilizada para detecção de níveis de infecção menores do que 1%. Apesar de ainda demandar um longo tempo para a incubação, alguns autores conseguiram bons resultados, por meio deste procedimento. Phan et al. (2002) detectaram 1% de infecção por *Ascochyta*

rabiei em sementes de grão de bico quando as sementes ficaram sob incubação em meio Czapek-Dox por 18 horas. Guillemette et al. (2004) inocularam sementes de repolho e rabanete por dois dias e incubaram em meio enriquecido por mais 48 horas, a fim de incrementar o crescimento da biomassa do fungo das sementes e conseguiram detectar 5 % em PCR convencional e 2% em PCR em tempo real. Chadha & Gopalakrishna (2006) detectaram lotes com até 0,2% de infestação *Magnaporthe grisea* em sementes de arroz, quando incubaram as sementes por 48 horas em meio batata dextrose ágar (BDA). Vechiatto et al. (2006) detectaram uma semente infectada em 400 sementes sadias com período de incubação de 7 dias. É preciso atentar para o período de incubação não se prolongar em demasia, uma vez que pode ocorrer crescimento de outras espécies patogênicas e saprofíticas, concorrendo com o crescimento do patógeno alvo. Nesse caso há a necessidade de se avaliar o período mínimo de incubação para *Stenocarpella* sp.

6 CONCLUSÕES

O par de primer P1/P2 foi sensível para diferenciar o complexo *Stenocarpella* de outros fungos, mas não foi suficientemente sensível para diferenciar as espécies: *S. maydis* e *S. macrospora*.

O par de primer P1/P2 foi sensível para detectar *Stenocarpella* sp. tanto em cultura pura como em sementes infectadas.

O par de primers P1/P2 foi eficaz para detectar até 2% de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho infectadas, com repetibilidade, quando foram expostas ao patógeno por um período de 72 horas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, Jan. 2001.

BERG, T.; TESORIERO, L. ; HAILSTONES, D. L. A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 624-630, June 2006.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 355-361, jul./ago. 2003.

CASA, R.T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. revisão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 427-439, set./out. 2006.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Fungos associados a sementes de milho produzidas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n.3, p. 370-373, jul./ago. 1998.

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

CHILVERS, M. I. ; TOIT, L. J. D. U; AKAMATSU, H.; PEEVER, T. L. A real-time quantitative PCR assay for *Botrytis* spp. That cause neck rot onion. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 5, p. 599-608, 2007.

DO, N.; ADAMS, R. P. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. **BioTechniques**, v. 10, n. 2, p. 162-166, 1991.

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**, Madison, v. 46, n. 3, p. 1064-1070, 2006.

DORRANCE, A. E.; HINKELMAN, K. H.; WARREN, H. L. Diallel analysis of *Diplodia* ear rot resistance in maize. **Plant Disease**, St Paul, v. 82, p. 699-703, 1998.

EDDINS, A. H. Dry rot of corn caused by *Diplodia macrospora* Earle. **Phytopathology**, St Paul, v. 20, p. 439-448, 1930.

FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **Biotechniques**, v.13, n.1, p.52-56, 1992.

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**, St Paul, v. 90, p. 951-960, 2000.

GILLASPIE JUNIOR, A. G.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; PAPPU, R. H. RT-PCR detection of seedborne *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in peanut. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, n.11, p.1182-1183, Nov. 2001.

GUILLEMETTE, T; IACOMI-VASILESCU, B; SIMONEAU, P. Conventional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. **Plant Disease**, St Paul, v. 88, n., 5, p. 490-496, 2004

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.

IOOS, R.; LAUGUSTIN, L.; ROSE, S.; TOURVIEILLE, J.; LABROUHE
TOURVIEILLE, D. Development of PCR test to detect the downy mildew causal
agent *Plasmopara hastedii* in sunflower seeds. **Plant Pathology**, v. 56, n.2, p.
209-218, 2007.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P.; TURKINGTON, T. K. A PCR-based assay to detect
Rhinchosporium secalis in barley seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 2, p.
220-225, 2001.

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, Jan. 2002.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P.; TURKINGTON, T. K. Quantificação of seedborne
infection by *Rhinchosporium secalis* in barley using competitive PCR. **Plant
Pathology**, v. 51, p. 217-224, 2002.

LOVIC, B. R. ; MARTYN, R. D.; MILLER, M. E. Sequence analysis of ITS
regions of rDNA *Monosporascus* spp. To evaluate its potencial for PCR-mediated
detection. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, p. 655-661, 1995.

MACHADO, J. C.; CARVALHO, J. C. B.; VIEIRA, M. G. G. C.;
GUIMARÃES, R. M. Methodology for infecting seeds by fungi using water
restriction technique. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-
SEED SYMPOSIUM, 26., 2001, Angers, France. **Resumos...**Angers, France,
2001. p. 62.

MACHADO, J. C. ; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o
estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In:
ZAMBOLIM, L. **Sementes qualidade fitossanitária**.Viçosa: Universidade
Federal de Viçosa, 2005. 502 p.

MARIO, L. J.; REIS, E. M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n.3, p. 670-672, set. 2001.

MCNEIL, M.; ROBERTS, A.M.I.; COCKERELL, V.; MULHOLLAND, V. Real-time PCR assay for quantification of *Tilletia caries* contamination of UK wheat seed. **Plant Pathology**, v. 53, p.741-750, 2004

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n.1, p.131-136, 1995.

PAHALAWATTA, V.; DRUFFEL, K.; PAPPU H. R. Seed transmission of *Dahlia mosaic virus* in *Dahlia pinnata*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 1, p. 88-91, 2007.

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, n. 10, p. 632-636, Oct. 2006.

PETHYBRIDGE, S.J.; HAY, F.; JONES, S.; WILSON, C.; GROOM, T. Seedborne infection of pyrethrum by *Phoma ligulicola*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 7, p. 891-897, 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, n.1, p. 31-39, 2002.

POREBSKI, S.; BAILEY, G.; BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Molecular Biology Reporter**, v.15, n. 1, p. 8-15, 1997.

POST, R. von; POST, L. von; DAYTEG, C.; NILSSON, M.; FORSTER B. P.; TUVESSEON, S. A high-throughput DNA extraction method for barley seed. **Euphytica**, v. 130, n. 2, p. 255–260, 2003.

PRYOR, B. M.; GILBERTSON, R. L. A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 1, p. 18-23, 2001.

RÍOS, M. O.; FERNÁNDEZ, P.; CARMONA, M. Detection of *Rhynchosporium secalis* in barley seeds from Argentina through polymerase chain reaction technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n.5, p. 415-418, Sept./Oct. 2007.

SONG, W. Y.; KIM, H. M.; HWANG, C. Y.; SCHAAD N. W. Detection of *Acidovorax avenae ssp. avenae* in rice seeds using BIO-PCR. **Journal Phytopathology**, v. 152, n. 11/12, p. 667–676, Dec. 2004.

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, n. 3, p. 347-355, 2001.

VECHIATO, M. H. ;MARINGONI, A. C. ; MARTINS, E. M. Desenvolvimento de iniciadores para a detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p.161-169, 2006.

XIA, Z.; ACHAR, N. Randon amplified polymorphic DNA and polymerase chain reaction markers for the differentiation and detection of *Stenocarpella maydis* in maize seeds. **Journal Phytopathology**, v. 149, n. 1, p. 35-44, Jan. 2001

ZHANG, A. W.; HARTMAN, G. L.; CURIO-PENNY, B.; PEDERSEN, W. L.; BECKER, K. B. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 9, p. 796-804, 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos sobre relação de patógenos com sementes, envolvendo alguns patossistemas de interesse no Brasil, têm sido escassos e, na maioria das vezes, pouco conclusivos, principalmente pelo fato de pesquisadores utilizarem metodologias distintas. É importante ressaltar que este tipo de conhecimento é de extrema importância por várias razões, dentre elas, a necessidade de estabelecimento de padrões sanitários em programas de certificação de qualidade de sementes.

Especificamente para o patossistema: *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão, alguns trabalhos têm demonstrado que esta relação é complexa requerendo estudos mais aprofundados sobre a natureza de parasitismo deste patógeno e a relação do algodoeiro no que tange aos sintomas produzidas por esta doença.

Pela literatura os sintomas vão desde tombamentos em pré e pós emergência, lesões necróticas angulosas nas folhas, encurtamento dos entrenós e a formação de superbrotamento lateral de galhos em plantas adultas infectadas. Alguns trabalhos têm indicado que este quadro sintomático pode apresentar variações dependendo do genótipo do hospedeiro, do isolado estudado além da interferência de outros fatores bióticos e abióticos.

Um dos alvos nesta Tese (Capítulo 2), foi elucidar a relação entre forma de parasitismo do agente da ramulose e a formação de sintomas, por meio de diferentes técnicas de inoculação do patógeno com a utilização de plantas. O intuito nesse caso seria verificar a formação de um sintoma característico e consistente da doença, de modo a diferenciá-la de outras como a antracnose, causada por *Colletotrichum gossypii*. Por meio de três técnicas de inoculação utilizadas, foi possível observar que uma das hipóteses de que a infecção pontual

das gemas apicais das plantas pelos patógenos não foi capaz de induzir a formação dos sintomas de envassouramento das plantas, mas sim a formação de dois galhos bifurcados diametralmente opostos, com crescimento normal e sem o encurtamento dos entrenós. Os resultados confirmaram que a inoculação de plantas com idade em torno de 28 dias e aplicando o inóculo em toda planta foi mais eficaz em reproduzir os sintomas típicos de ramulose. E ainda reforçam a complexidade dessa doença, fazendo com que novas estratégias metodológicas sejam utilizadas no melhor entendimento da sintomatologia da referida doença

No capítulo 3, tendo como alvo a avaliação dos efeitos de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* no desenvolvimento das plantas de algodoeiro a partir de diferentes potenciais de inóculo nas sementes, viu-se que os efeitos deste patógenos foram drásticos em um genótipo considerado suscetível e menos pronunciado em outro material considerado resistente a doença. No entanto, chamou atenção o fato de que o prolongamento do tempo de contato entre sementes e inóculo do patógeno, pela técnica de condicionamento osmótico, além de 72 horas, não proporcionou incremento correspondente dos efeitos em relação às variáveis de desempenho utilizadas neste estudo, como taxa de germinação, vigor, peso e altura de plantas emergidas. Com base neste trabalho, foi possível observar também um comportamento diferencial entre os dois materiais genéticos utilizados no que tange a taxa de infectividade aparente de plantas emergidas a partir de sementes infectadas.

Em relação ao complexo *Stenocarpella* em sementes de milho, objeto de abordagem no Capítulo 4, cujo nível de conhecimento também requer maiores aprofundamentos sob vários aspectos, o foco foi checar a viabilidade do uso da técnica de PCR para a detecção das duas espécies, *S.maydis* e *S.macrospora*, responsáveis por perdas importantes na cultura do milho em diversas circunstâncias onde esta espécie é cultivada. Ambos fungos são transmitidos por sementes de milho e sua distinção em testes de sanidade de rotina encontra sérias

dificuldades metodológicas. A diagnose com base em técnicas moleculares pode ser uma alternativa segura no presente caso. O uso de um primer para a detecção de *S.maydis*, já conhecido e adotado fora do Brasil, revelou neste estudo que o mesmo é capaz de detectar e identificar, com segurança ambas espécies presentes em sementes de milho, com uma sensibilidade percentual de 2 %. Tal primer foi, no entanto, incapaz de distinguir as duas espécies. Em etapas subsequentes é importante considerar novas tentativas metodológicas, como o uso da BIO-PCR e o exame da técnica de PCR em tempo real. A busca de novos primers com seqüências mais específicas para ambas espécies de *Stenocarpella* deve fazer parte dos passos seguintes nos estudos desse patossistemas.