

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
Colletotrichum gossypii var. *cephalosporioides*
ASSOCIADOS A SEMENTES DO
ALGODOEIRO: ASPECTOS
MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

ENIA MARA DE CARVALHO

2005

ENIA MARA DE CARVALHO

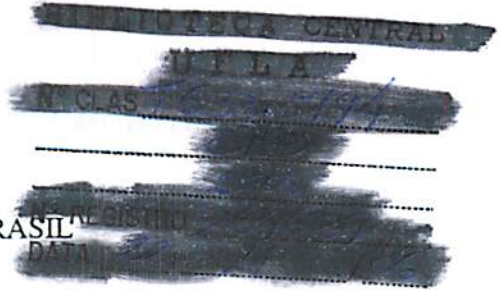
**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* ASSOCIADOS A SEMENTES DO ALGODOEIRO:
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

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
2005



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

Carvalho, Enia Mara de

Caracterização de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* associados a sementes do algodoeiro: aspectos morfológicos e moleculares. --
Lavras : UFLA, 2005.

104 p. : il.

Orientador: José da Cruz Machado.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. 2. Filogenia 3. rDNA 4. Detecção 5. Semente. 6. Fungo. 7. Algodão. 8. Restrição hídrica. 9. 2,4-D I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.5194

ENIA MARA DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* ASSOCIADOS A SEMENTES DO ALGODOEIRO:
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

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 29 de agosto de 2005

Pesquisador. Dr. Alan Carvalho Andrade EMBRAPA (CENARGEN)

Prof^ª. Dr^ª. Antônia dos Reis Figueira UFLA

Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças G. Carvalho Vieira UFLA

Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning UFLA


Prof. Dr. José da Cruz Machado
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais Edesio e Helena,

À Eliane Regina,

Ao querido Germano

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras-UFLA/Departamento de Fitopatologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Dr. José da Cruz Machado, pelo incentivo, orientação, amizade e confiança.

À professora Antônia, pela orientação e dedicação no desenvolvimento desse trabalho.

À professora Maria, ao professor Ludwig e ao pesquisador Alan pelas valiosas sugestões e 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. Nelson Dias Suassuna da Embrapa/Cnpa pelos isolados cedidos.

Ao Dr. Milton Fuzzato do Instituto Agrônomo de Campinas pelas sementes cedidas.

À Florisvalda Silva Santos e Cristiano Souza Lima pelas revisões.

Ao Núcleo de Estudos em Fitopatologia, gestão 2005 e a todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos amigos, pelo companheirismo e zelo com que me trataram.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.	1
Caracterização de isolados de <i>C. gossypii</i> var. <i>Cephalosporioides</i> associados a sementes do algodoeiro: aspectos morfológicos e moleculares	
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Aspectos da etiologiaiológicos e sintomatologia do complexo <i>Colletotrichum</i> em algodão.....	5
2.2 Técnicas empregadas na detecção de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>Cephalosporioides</i> em sementes de algodão.....	7
2.3 Emprego de técnicas moleculares para detecção de fungos em sementes.....	10
2.4 Técnicas moleculares em estudos de variabilidade genética de fungos.....	12
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....	16
CAPÍTULO 2.....	24
Efeitos de inibidores da germinação na detecção de <i>C. gossypii</i> var. <i>Cephalosporioides</i> em testes de sanidade de sementes de algodoeiro	
1 RESUMO.....	25
2 ABSTRACT.....	26
3 INTRODUÇÃO.....	27
4 MATERIAL DE MÉTODOS.....	29
4.1 Procedimento de inoculação das sementes.....	29
4.2 Testes de sanidade.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÕES.....	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CAPÍTULO 3.....	41
Caracterização molecular de regiões do DNA ribossomal de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	
1 RESUMO.....	42
2 ABSTRACT.....	43
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAL E MÉTODO.....	46
2.1 Obtenção e manutenção dos isolados.....	46
2.2 Teste de patogenicidade.....	47
2.3 Extração de DNA.....	49
2.4 Amplificação dos fragmentos ITS 1, 5,8 S e ITS 2.....	50
2.5 Clonagem e seqüenciamento.....	51

2.6 Análises das seqüências.....	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
6.1 Teste de patogenicidade.....	55
3.2 Análise das seqüências de nucleotídeos.....	57
4 CONCLUSÕES.....	68
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
ANEXOS.....	74

RESUMO

CARVALHO, Enia Mara de. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* associados a sementes do algodoeiro: aspectos morfológicos e moleculares.** 2005. 104 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Um dos fatores que contribuem para reduzir a produtividade da cultura do algodão é a ocorrência de ramulose, cujo agente etiológico, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, é transmitido por sementes. A identificação deste agente em sementes tem sido muito questionada pela sua semelhança com a espécie *C. gossypii*, à qual se encontra associada. Além da morfologia, estudos baseados em caracterização cultural e patogênica também geram dúvida na diferenciação entre esses fungos. Dessa forma, os objetivos neste trabalho, foram avaliar os efeitos de inibidores de germinação na produção de estruturas que possibilitem a identificação destes microrganismos em testes de incubação de sementes e a caracterizar geneticamente isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* de várias regiões do país pelas regiões do DNA ribossomal. Pelo estudo dos efeitos de inibidores de germinação em testes de sanidade foram observadas características intermediárias entre os isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Características, como densidade de micélio e presença de setas não encobertas pela massa de conídios, não foram úteis para distinguir as espécies estudadas. Dentre os inibidores de germinação, o manitol induziu menor porcentagem de setas longas em *C. gossypii* e menor desenvolvimento de micélio em todos os isolados, permitindo melhor visualização de outras estruturas, quando comparado ao 2,4-D. Assim, o uso do manitol como regulador de germinação em teste de sanidade aumenta a confiabilidade na identificação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão. Pela análise das seqüências de nucleotídeos, verificou-se que os isolados do algodoeiro apresentaram identidade genética variando de 96% a 100% na região ITS 1, 98% a 100% no gene 5,8 S e 97% a 100% na região ITS 2. Pela árvore filogenética, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* pertencem ao mesmo grupo, juntamente com isolados de *Glomerella cingulata* da mangueira e do mamoeiro, não sendo possível sua distinção por esse método.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Antônia dos Reis Figueira – UFLA (Co-orientadora)

ABSTRACT

CARVALHO, Enia Mara de. **Characterization of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* isolates associated with cotton seeds: morphological and molecular aspects.** 2005. 104 p. Thesis (Doctorate in Agronomy /Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

One of the causes that contribute to reduce cotton yield is the occurrence of ramulosis in which its ethiological agent, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, is seed transmitted. The identification of this fungus on cotton seeds has been questionable because of its similarity with *C. gossypii* which is also associated with cotton seeds. In addition to morphological, identification of the fungus based on auxanographic and pathogenic features is also questionable in many cases. Because of those conflicts the purpose of this study was to evaluate the effects of some inhibitors of seed germination on the micelial growth of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and *C. gossypii* through blotter test and to characterize isolates collected in different regions in Brasil, based on comparative analysis of ribosomal DNA. From the inhibitors essay, intermediate patterns of micelial growth observed on seeds, between isolates of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and *C. gossypii* were observed. Characteristics such as mycelium density and setae production with masses of conidia were not useful to distinguish isolates of both fungi under investigation. Final counts of incidence of both fungi on tested seeds were similar between mannitol and 2,4-D treatments; mannitol was the most efficient seed inhibitor for providing better visualization of morphological structures. From the analysis of nucleotides sequencing, isolates associated with cotton plants showed genetic identity ranging 96% to 100% in ITS 1 region, 98% to 100% at gene 5.8 S and 97% to 100% in ITS 2 region. The sequences were analysed using the criteria of UPGMA and a tree with the relationships among the two species showed that *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and *C. gossypii* belonged to the same group along with isolates of *Glomerella cingulata* from mango and papaya, which makes difficult the separation of the above mentioned species.

*Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Adviser) and Antônia dos Reis Figueira – UFLA (Co-adviser).

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* ASSOCIADOS A SEMENTES DO ALGODOEIRO: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

1 INTRODUÇÃO GERAL

A importância da cultura do algodoeiro para o Brasil pode ser avaliada não só pelo aspecto econômico, como pelo lado social, proporcionando geração de renda e a criação significativa de empregos.

Para essa cultura, embora alguns avanços, do ponto de vista tecnológico, tenham sido alcançados, o desempenho médio nacional ainda continua baixo, em relação a outros países, havendo, salvo algumas exceções, grandes dificuldades para aumento da produtividade.

De modo geral, o desempenho produtivo de qualquer cultura é o resultado da ação conjugada de vários fatores, tais como potencial genético da cultivar, fertilidade do solo, condições climáticas, práticas culturais, época de semeadura, população de plantas, ocorrência de doenças infecciosas, pragas e plantas daninhas, qualidade das sementes, etc. (Jugenheimer, 1976; Reis & Casa, 1996; Saunders, 1930; Vieira et al., 1998).

A ocorrência de doenças, em culturas de valor econômico, é um dos mais sérios obstáculos para o estabelecimento de sistemas de produção agrícola sustentáveis em todo o mundo. Para o comércio internacional de produtos agropecuários, as barreiras fitossanitárias, estabelecidas para evitar a disseminação de doenças e pragas, estão cada vez mais rigorosas. Para países como o Brasil, cujo extraordinário potencial agrícola faz com que a agricultura seja a base da economia, a qualidade dos insumos de produção é um fator que condiciona o sucesso ou o fracasso neste tipo de atividade. Dentre os fatores que mais pesam na produção e sustentabilidade da atividade agrícola em geral, a semente, ou outro material de propagação, é o que requer mais atenção por parte dos produtores. Além de veicular todo o componente genético da variedade que

representa, as sementes, como agente biológico, podem apresentar outros atributos de qualidade, como germinação, vigor e sanidade.

A associação de patógenos com sementes de espécies cultivadas tem sido uma crescente preocupação em todo o mundo, devido aos efeitos desastrosos que esta interação pode provocar a um sistema produtivo.

Por intermédio das sementes, grande número de patógenos, considerados de risco, pode ser disseminado entre regiões produtoras dentro de um mesmo país e entre países, determinando danos de dimensões incalculáveis, além de quase sempre irreversíveis.

A trajetória da patologia de sementes no Brasil, nas duas últimas décadas, tem evidenciado que a agricultura brasileira apresenta sérios problemas de qualidade sanitária de sementes. Fruto de um amplo debate junto à comunidade sementeira nos últimos anos, envolvendo todos os segmentos pertinentes, o aspecto de sanidade de sementes passou a contar com uma normatização específica e própria por meio da Portaria nº 71, de 22 de fevereiro de 1999 do Ministério da Agricultura. Dessa forma, tornou-se possível visualizar a coibição do uso de sementes fora de padrões de qualidade sanitária, havendo proposição para os casos julgados de relevância para o sistema agrícola em geral. De acordo com essa Portaria, toda proposição de padrões de tolerância para patógenos transmitidos por sementes deve ser, no entanto, fundamentada em informações de pesquisa orientada, obedecendo a exigências dos padrões internacionais estabelecidos para pragas (doenças) não quarentenárias regulamentadas.

Especificamente, o foco em *C. gossypii* var. *cephalosporioides* neste estudo se dá em razão da importância econômica atual desse organismo no Brasil e da sua indicação como um candidato possível de estabelecimento de padrões de tolerância em sementes, conforme consta na Portaria anteriormente referenciada.

Experiência em trabalhos de rotina e pesquisa tem revelado que a diagnose desse patógeno, em teste baseado apenas em caráter morfológico, tem sido limitada pelo número de estruturas que devem ser analisadas e pela semelhança de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* com a espécie *C. gossypii*, também pode se associar às sementes do algodão. Portanto, o desenvolvimento de métodos mais específicos ou seletivos e de maior precisão é uma necessidade que se impõe, tendo em vista a inclusão desse patógeno como organismo não quarentenário regulamentado pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade Sanitária de Sementes, cujo propósito é recomendar a análise de rotina.

Alguns métodos são recomendados para a análise de patógenos associados a sementes de algodão. No entanto, a detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* torna-se inviável, de certa forma, em rotina devido aos aspectos operacionais e aos resultados nem sempre reproduzíveis dos métodos disponíveis.

A diagnose sempre questionável de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, relacionada aos diferentes graus de virulência e expressão dos sintomas, tem sido justificativas para os esforços dispendidos na caracterização genética das espécies de *Colletotrichum* associadas ao algodoeiro. Até o momento, os resultados de estudos já conduzidos não têm sido suficientes para a solução desses problemas.

Os objetivos neste trabalho foram avaliar os efeitos de inibidores de germinação na morfologia de estruturas que possibilitem a identificação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em testes de sanidade de incubação de sementes e fazer a caracterização molecular de isolados destes fungos, coletados em várias regiões do país, com base na sequência de nucleotídeos das regiões ITS do DNA ribossomal. Em última análise, são estudos que visam ao desenvolvimento de métodos mais seguros e rápidos de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes de algodão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos da etiologia e sintomatologia do complexo *Colletotrichum* em algodão

O gênero *Colletotrichum* pertence ao Filo Ascomycetes, que contém muitas espécies que causam doenças na maioria das espécies cultivadas e plantas ornamentais denominadas de antracnoses (Bailey & Jeger, 1992).

Com base no critério de identificação de espécies e raças em função do formato de conídios, as espécies de *Colletotrichum* que colonizam sementes foram separadas em dois grupos distintos: *C. dematium* e *C. gloeosporioides* (Tiffany & Gilman, 1954, citados por Kulshrestha et al., 1976). A espécie *C. gossypii*, descrita por Southworth em 1890 (Viégas, 1946), foi posteriormente relatada por Arx (1957), como pertencente ao grupo *C. gloeosporioides* e o teleomorfo *Glomerella cingulata*. A variedade *cephalosporioides*, agente etiológico da ramulose, foi relatada por Costa & Fraga (1937) e descrita por Costa em 1946 (Viégas, 1946), foi identificada primeiramente no estado de São Paulo, associada ao sintoma de superbrotamento do algodoeiro, o que não era observado entre os causadores de antracnose.

Sutton (1992) suporta a teoria de que *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* constitui um grupo distinto (Sutton, 1992). Entretanto, Ottonello (1992) estudando as características culturais, patogênicas e sorológicas, sugeriram a nomenclatura *C. gloeosporioides* f. sp. *gossypii*, raça 1, para os isolados não associados à morte de ápices e, portanto, causadores de antracnose e *C. gloeosporioides* f. sp. *gossypii*, raça 2 para isolados associados ao sintoma de superbrotamento, ou seja, causadores de ramulose.

C. gossypii South. e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* A. S. Costa, agentes causais da antracnose e ramulose, respectivamente, assumem grande importância na cultura do algodoeiro, pelos prejuízos causados e por serem frequentemente transportados, tanto externa como internamente, pelas sementes, constituindo, assim, a sua principal via de disseminação (Lima et al., 1985; Tanaka, 1995). O progresso da incidência e da severidade da doença é influenciado pelo nível de inóculo nas sementes (Araújo, 2004).

Tanto *C. gossypii*, como *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, uma vez associados às sementes, podem causar tombamento de pré e pós-emergência, atacando o hospedeiro sempre no início do seu desenvolvimento, ocasionando redução do estande. Nessa fase, Araújo (2004), estudando a transmissibilidade de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* a partir de sementes inoculadas, verificou que a temperatura é determinante para a ocorrência da doença, e que a incidência e a severidade do tombamento são maiores com o aumento da temperatura e com o nível de inóculo.

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

O agente etiológico da ramulose, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, em plantas jovens mostra sintomas mais rapidamente, caracterizados por superbrotamento dos galhos, dando à planta um aspecto ramalhudo, de porte baixo, galhos contorcidos e dilatados, com folhas encarquilhadas e deformadas. As folhas apresentam áreas cloróticas que evoluem para lesões necróticas

arredondadas, alongadas ou angulares, às vezes, acompanhadas de perfurações. As lesões, principalmente nas nervuras, acarretam o desenvolvimento desigual dos tecidos foliares, ocasionando o enrugamento da superfície do limbo. Nos estádios mais avançados, o patógeno causa a morte da gema apical, estimulando as gemas axiliares a formarem número excessivo de galhos, reduzindo conseqüentemente a frutificação (Abrahão, 1961; Cia & Salgado, 1997; Costa & Fraga Junior, 1937; Drumond, 1961; Dudienas, 1990; Tanaka, 1995).

Apesar da caracterização patogênica mencionada, observa-se intensa variação, em relação à agressividade de isolados (Dudienas, 1990; Iamamoto, 2002; Silva-Mann, 2002; Tanaka, 1990), sugerindo a presença de raças fisiológicas. Segundo Chitarra (1996), nem sempre se consegue discernir com clareza quais são os patógenos envolvidos na sintomatologia de ramulose e antracnose. Normalmente, esses estudos sobre a relação patógeno e hospedeiro têm sido realizados com isolados obtidos diretamente de plantas que apresentam a sintomatologia característica da doença, garantindo a capacidade dos isolados induzirem os sintomas em questão.

Apesar da ramulose ocupar um lugar de destaque entre as doenças que causam perdas em algodoeiro, nos testes de sanidade de sementes, efetuados na rotina, o relato, em geral, é feito da presença de *C. gossypii*, sem que se especifique qual é a variedade do patógeno (Chitarra, 1996).

2.2 Técnicas empregadas na detecção de *Colletotrichum gossypii* South e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* A. S. Costa em sementes de algodão.

Os critérios utilizados para a detecção de fungos do complexo *Colletotrichum* em sementes de algodoeiro são baseados em aspectos morfológicos (Machado & Langerak, 2002) e consistem em estimular estes microrganismos a produzir estruturas que permitam a sua identificação, por

meio do teste de incubação em substrato de papel de filtro (*blotter test*) (Neergaard, 1979), modificado com adição do sal de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Machado & Langerak, 1993). Estes métodos, apesar de utilizados em testes de rotina, apresentam limitações, pois nem sempre permitem a diagnose precisa em termos de subespécie, variedades e raças (Tanaka, 1995; Tanaka & Menten, 1988; Vieira, 1996).

Para o complexo *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, outro fator limitante do teste de incubação em substrato de papel de filtro é a grande variabilidade das características morfológicas desses organismos em testes de rotina. Entretanto, alguns isolados apresentam características que permitem a distinção segura entre as duas espécies. Assim, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* é identificado por apresentar setas longas e em menor densidade, quando comparado com *C. gossypii*, além de os conídios aderidos no topo das setas serem menores que os produzidos pela espécie causadora de antracnose, resultando em crescimento menos compacto. A ocorrência de setas férteis no micélio aéreo é freqüente, conferindo à semente uma aparência leve, de coloração acinzentada, enquanto *C. gossypii* apresenta coloração rosa claro, resultante de esporulação abundante cobrindo a superfície da semente. *C. gossypii* produz micélio aéreo é escasso ou ausente, produzindo setas densas e curtas, resultando em um crescimento compacto, próximo ao tegumento. Conídios presentes no topo das setas são mais longos que os causadores da ramulose (Machado & Langerak, 2002; Tanaka et al., 1996).

A Diagnose de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* com base no hábito de crescimento em sementes de algodoeiro nem sempre satisfaz os critérios recomendados por Tanaka et al. (1996). Chitarra (1996), estudando características de 30 isolados de *Colletotrichum* baseadas nos critérios descritos acima, observou que 40% apresentaram características típicas de *C. gossypii*,

35% como *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e 25% não exibiram crescimento típico que possibilitasse a caracterização dos isolados.

A dificuldade na distinção das espécies de *Colletotrichum* em algodoeiro já havia sido observada por Dudienas (1990), utilizando isolados obtidos de plantas com sintomas típicos de ramulose e antracnose. Segundo este autor, ocorreu apenas uma tendência em relação ao comprimento de conídios nos isolados causadores de ramulose, não havendo variação quanto à largura, número de núcleos e morfologia de apressórios.

Visando à diagnose mais segura de patógenos em sementes, alguns estudos foram realizados com o objetivo de desenvolver novas metodologias de diagnose. Dentre estas, cita-se a investigação sobre a caracterização morfológica, cultural e patogênica de organismos como *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Dudienas, 1990; Tanaka, 1995; Tanaka & Menten, 1988). Em testes visando à caracterização cultural, o agente causador de ramulose tem se mostrado deficiente nos aminoácidos asparagina e ácido aspártico, fornecidos por caseína hidrolisada (Dudienas, 1990). No entanto, nesse trabalho, os dados foram considerados insuficientes para uma caracterização segura, em virtude da grande variabilidade dos isolados. Ottonello (1992), estudando características culturais, concluiu que os dois grupos são fisiologicamente diferentes, porém, relata a presença de isolados intermediários.

Outro problema encontrado em testes de sanidade de sementes de espécies como o algodão é a germinação rápida. Esse fator dificulta a identificação dos fungos e pode comprometer a validade dos resultados desses testes pela possibilidade de contaminações secundárias entre sementes e o exterior do recipiente (Machado, 1988). Para inibir a germinação ou reduzir o comprimento das plântulas de algodoeiro, tem-se utilizado 2,4-D, na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Machado & Langerak, 1993). No entanto, em

estudos realizados por Sobreira (1988), verificou-se que o 2,4-D, inibiu o crescimento micelial de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Na tentativa de substituir o uso do 2,4-D, vários estudos foram realizados utilizando-se a técnica de restrição hídrica (Coutinho, 2000; Machado, 2002; Magalhães, 2005). Especificamente com a espécie *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, foi observado que a restrição hídrica induzida pelo soluto manitol no potencial osmótico $-1,0$ MPa não interfere no seu desenvolvimento e detecção (Machado, 2002). Porém, nesse estudo, foi avaliado apenas um isolado.

2.3 Emprego de técnicas moleculares para detecção de fungos em sementes

Fungos de difícil distinção baseada em marcadores morfológicos em sementes podem ser potencialmente diagnosticados com sucesso por meio do emprego de técnicas moleculares (Bates et al., 2001; Chiocchetti et al., 2001; Iacomi-Vasilescu et al., 2002; Konstantinova et al., 2002; Lee et al., 2001; Smith et al., 1996; Taylor et al., 2001; Vechiato, 2002; Xia & Achar, 2001).

Em lotes de sementes de trigo, a espécie *Tilletia indica* foi distinguida de *Tilletia barclayana*, as quais encontravam associadas às sementes, fazendo-se a extração do DNA a partir de teliosporos obtidos em suspensão da lavagem de sementes e amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR). Nessas amostras, a sensibilidade do teste foi aumentada fazendo-se extração de DNA de teliosporos germinados (Smith et al., 1996).

Rynchosporium secalis foi detectado pela PCR em amostras assintomáticas de sementes de trigo (Lee et al., 2001). Em sementes de manjerição, *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* foi distinguida de outras *formae speciales* e de outros fungos associados às sementes dessa cultura. Nesse trabalho, a sensibilidade dos marcadores PCR foi aumentada com uma segunda etapa de reação, denominada NESTED-PCR (Chiocchetti et al., 2001). Esse tipo

de PCR em duas etapas chega a ser mil vezes mais sensível do que a técnica de etapa única, sendo apropriado para detectar a presença de microrganismos que ocorrem em baixa frequência na amostra em investigação (Fungaro, 2002).

Espécies patogênicas de *Alternaria* também foram detectadas em sementes de crucíferas e a sensibilidade da PCR foi aumentada quando extraiu-se DNA de sementes com dois dias de incubação (Iacomi-Vasilescu et al., 2002). Seguindo o princípio de incubação das sementes para potencializar a extração de DNA, levou-se ao aumento a sensibilidade da PCR na detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja, após incubação em papel de filtro modificado com 2,4-D por 7 dias (Vechiato, 2002).

Marcadores baseados em PCR são altamente sensíveis, reproduzíveis e podem, após rigoroso processo de validação, ser usados para identificação e detecção de fungos em sementes, se *primers* específicos forem desenvolvidos (Lee et al., 2001).

Como existem fungos, a exemplo do *Colletotrichum*, que possuem espécies com alta semelhança morfológica, há necessidade de se detectar regiões do DNA que sejam “a expressão digital” desse organismo (Vieira, 2002). Em muitos casos, “primers” para esses usos são baseados na existência de seqüências polimórficas de DNA em regiões altamente conservadas, como as regiões que codificam para o DNA ribossômico (rDNA) (Iacomi-Vasilescu et al., 2002; Lee et al., 2001; Lovic et al., 1995; Miller et al., 1999; Moricca et al., 1995; Silva-Hanlin et al., 1999;). Primers desenvolvidos pela seqüência ITS da região rDNA permitiram a detecção de *A. alternata* e *A. radicina* em sementes de cenoura em níveis similares aos detectados pelos métodos de papel de filtro e plaqueamento no meio ARSA (Konstantinova et al., 2002).

2.4 Técnicas moleculares em estudos de variabilidade genética de fungos

O uso de seqüências de DNA tem sido a maneira mais segura de estudar a variabilidade de microrganismos (Vieira, 2002; Vieira & Machado, 2002).

Estudos de variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* em algodoeiro foram na maioria, baseados apenas em polimorfismo de fragmentos amplificados aleatoriamente (Chitarra, 1996; Mehta et al., 2001; Silva-Mann et al., 2002, 2005; Vieira, 1996,) e padrões isoenzimáticos (Carvalho et al., 1997; Vieira, 1996), portanto, com informações pouco conclusivas, principalmente quando visa o desenvolvimento de *primers*.

Comparações da seqüência de DNA têm sido usadas para examinar um grande número de espécies do gênero *Colletotrichum*. Dentre essas, seqüências da região espaçadora interna do rDNA (ITS1 e ITS2), que flanqueiam o gene rDNA 5,8S, são amplamente utilizadas (Bailey et al., 1996; Cano et al., 2004; Denoyes-Rothan et al., 2003; Hsiang & Goodwin, 2001; Sherriff et al., 1994, 1995; Sreenivasaprasad et al., 1996). Genes do rDNA, altamente conservados e regiões espaçadoras, variáveis, aparecem repetidos centenas de vezes no genoma fúngico. A região espaçadora transcrita internamente (ITS) evolui mais rapidamente e, por isso, se presta para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie (Miller et al., 1999; Fungaro, 2002; Silva-Hanlin et al., 1999). Observando padrões genômicos e técnicas de amplificação de DNA (Figura 1), Bruijin et al. (1997), citados por Swift & Bignell (2001), verificaram que a região ITS do rDNA, entre outras técnicas, serve para detectar variações dentro de gênero, espécies, subespécies e isolados.

FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIES	SUBESPÉCIES	ISOLADOS
Seqüenciamento do DNA completo				
Seqüenciamento do gene 16 S rDNA				
ARDRA				
Reassociação de DNA-DNA				
tRNA-PCR				
ITS-PCR				
RFLP LFRFA PFGE				
Multilocus de isoenzima				
Perfil da proteína da parede celular				
AFLP				
RAPD's APPCR				
Rep-PCR				

FIGURA 1. Resolução relativa de vários padrões genômicos e técnicas de DNA.

(Brujin, 1997, citado por Swift & Bignell, 2001).

Entre as espécies de *Colletotrichum* causadores de antracnose em Malvaceae, pela região ITS2, *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* apresentaram 98,5% de identidade entre si e entre todos os isolados de Malvaceae, foram observadas diferenças entre 8% e 13,5%. Apesar da variabilidade entre os isolados do algodoeiro ter sido baixa, nesse trabalho foram utilizados apenas um isolado de *C. gossypii* e dois isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Isolados de *C. gloeosporioides* de *Aeschynomene virginica*, *Stylosanthes scabra* e *Mangifera indica* agruparam-se com os isolados de algodoeiro, formando subgrupos distintos, assim como isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* também formaram subgrupos separados de *C. gossypii* (Bailey et al., 1996).

Utilizando seqüências ITS2, Sherriff et al. (1995) mostraram que isolados de *Colletotrichum graminicola* de milho foram distintos de isolados de *C. graminicola* obtidos de sorgo e *Rottboellia* sp., recomendando que a classificação de Sutton (1980) fosse adotada. Assim, isolados de sorgo e

Rottboellia sp. seriam considerados *C. sublineolum*. Sreenivasaprasad et al. (1996) analisaram a região ITS1 e também recomendaram que isolados de milho e sorgo fossem distintos, suportando a classificação de Sutton (1980).

Hsiang & Goodwin (2001), em estudo com as seqüências ITS de *C. graminicola* isolado de gramados, verificaram a distinção clara entre isolados de milho e sorgo. Todavia, seus dados não suportam a classificação de isolados de grama azul e grama rasteira, como *C. graminicola* ou *C. sublineolum*, descritos por Seenivasaprasad et al. (1996) e Sherriff et al. (1995). Com isso, sugerem que futuras divisões de *C. graminicola* fossem necessárias para isolados de gramados.

Resultados baseados na análise de seqüências da região ITS2 de isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes de morangos mostraram claras evidências da existência de dois subgrupos, CA-clonados, formado por isolados de morango e CA-variable, formado por isolados pertencentes ao morango e outros hospedeiros. Isso sugere que pode ter ocorrido uma especialização dos isolados pertencentes ao subgrupo CA-clonados para o morango. Nesse estudo, não houve correlação entre grupos genéticos e patogenicidade (Denoyes-Rothan et al., 2003).

Konstantinova et al. (2002), em estudo com a região rDNA de isolados de *Alternaria alternata*, *A. radicina* e *A. dauci* provenientes de cenoura, observaram a formação de grupos com níveis de similaridade de 98,8%, 100% e 98,2%, respectivamente. Variabilidade observada de 6,4% a 17,5% permitiu o desenvolvimento de *primers* específicos para as espécies estudadas.

Em estudos filogenéticos realizados pelo seqüenciamento das regiões ITS1 e ITS2 e gene 5,8S rDNA de isolados de *Phytophthora capsici* provenientes do estado de São Paulo detectaram-se variações genéticas de 0,1% a 1,6%, e uma distância filogenética de 78,5% entre os isolados de *P. capsici* e *Phytophthora* spp. No dendograma obtido pela análise filogenética, observou-se

a formação de grupos, sendo os isolados de *P. capsici* divididos em dois grupos, demonstrando a existência de polimorfismo de diferenciação dentro da mesma espécie oriunda de diferentes regiões geográficas (Rosa et al., 2003).

Pela análise da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, amplificada com os “primers” ITS4 e ITS5, foi possível diferenciar *Fusarium solani* f.sp. *glycines* de *F. solani* f.sp. *phaseoli* (Oliveira & Costa, 2002).

Estudos das regiões ITS demonstram sua utilidade para analisar relações filogenéticas, tornando-se uma ferramenta adicional para discutir e propor mudanças na classificação de espécies baseadas em agrupamentos gerados pela análise das seqüências dessas regiões.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARAÚJO, D. V. Níveis de inoculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes e sua influência na epidemia da ramulose do algodoeiro. 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ARX, J. A. Von. Die arten der gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 29, p. 413-468, 1957.

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

BAILEY, J. A.; NASH, C.; MORGAN, L. W.; O'CONNELL, R. J.; TEBEEST, D. O. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 10, p. 1076-1083, Oct. 1996.

BATES, J. A.; TAYLOR, E. 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**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 49-57, Feb. 2001.

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

CANO, J.; GUARRO, J.; GENÉ, J. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 6, p. 2450-2454, June 2004.

CARVALHO, D.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Uso de isoenzimas para diferenciação de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *Cephalosporioides* isolados de sementes de algodão. **ABRATES**, v. 21, n. 2, p. 315-319, 1997.

CHIOCCHETTI, A.; SCLAUDONE, L.; DURANDO, F.; GARIBALDI, A.; MIGHELI, Q. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* on basil. *Plant Disease*, St. Paul, v. 85, n. 6, 607-611, June 2001.

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) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. 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-SP: 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.

COUTINHO, W. M. Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade. 2000. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DENOYES-ROTHAN, B.; GUÉRIN, G.; CHRISTOPHE, D.; SMITH, B. MINZ, D.; MAYMON, M. FREEMAN, S. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. *Phytopathology*, St. Paul, v. 93, n. 2, p. 219-228, Feb. 2003.

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* Costa & Fraga Jr. 1990. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia diagnóstico e análise de variabilidade. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Uberlândia, v. 13, n. 14, p. 12-16, maio/jun. 2002.

HSIANG, T.; GOODWIN, P. H. Ribosomal DNA sequence comparisons of *Colletotrichum graminicola* from turgrasses and other hosts. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 107, n. 6, p. 593-599, July 2001.

IACOMI-VASILESCU, B.; BLANCARD, D.; GUÉNARD, M.; MOLINERO-DEMILLY, V.; LAURENT, E.; SIMONEAU, P. Development of a PCR-based diagnostic assay for detecting pathogenic *Alternaria* species in cruciferous seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, 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 de São Paulo, Jaboticabal.

JUGENHEIMER, R. W. **Corn improvement seed production and use**. New York: John Wiley, 1976. 670 p.

KONSTANTINOVA, P.; BONANTS, P. J. M.; GENT-PELZER, M. P. E.; ZOUWEN, P.; BULK, R. 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**, New York, v. 106, n. 1, p. 23-33, Jan. 2002.

KULSHRESTHA, D. D.; MATHUR, S. B.; NEERGAARD, P. Identification of seed-borne species of *Colletotrichum*. **Friesia**, Copenhagen, v. 11 n. 56, p. 116-125, 1976.

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

LIMA, E. F.; CARVALHO, J. M. F. C.; CARVALHO, L. P. de; COSTA, J. N. da. Transporte e transmissão de *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* A. S. Costa, através da semente do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 99-109, Mar. 1985.

LOVIC, B. R.; MARTYN, R. D.; MILLER, M. E. Sequence analysis of the ITS regions of rDNA in *Monosporascus* spp. to evaluate its potential for PCR-mediated detection. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 6, p. 655-661, June 1995.

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, MG.

- MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: Ministério da Educação; Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107 p.
- MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-264, 1994.
- MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J. Detection of seed-borne fungi – general and potential methods. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis**. Zurich: International Seed Testing Association, 2002. p. 47-80.
- MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J. Improvement of a blotter method to detect economically important fungi associated with seeds of cotton. In: ISTA PLANT DISEASE COMMITTEE SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING, 1. , 1993, Ottawa. **Proceedings...** Ottawa: ISTA, 1993. p. 48-58.
- MAGALHÃES, F. H. L. **Restrição hídrica em patologia de sementes: novas aplicações**. 2005. 131 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MEHTA, Y. R.; AVANZI, C.; CALVO, E. Molecular characterization of *Colletotrichum gossypii* isolates from cotton. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3. , 2001, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: EMBRAPA, 2001. 3v, p. 32-35.
- MILLER, R. N. G.; QUEZADO-SOARES, A. M.; LOPES, C. Molecular comparison of *Fusarium* populations causing eumartii wilt and dry rot of potato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 149-155. 1999.
- MORICCA, S.; KASUGA, T.; MITCHELSON, K. R.; RAGAZZI, A. The sequence of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 5. 8S rDNA and adjacent ITS1 and ITS2 regions. **Fungal Genetics. Newsletter**, v. 42, p. 53-55, 1995.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan Press, 1979. v. 2, 839 p.
- PIZZINATO, M. A.; CIA, E. Relação entre incidência de ramulose do algodoeiro em campo e detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 13, n. 1/2, p. 15, jan./jun, 1987.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 631-634, nov./dez. 2002.

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.

REIS, A. C.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 80 p.

ROSA, D. D.; MARQUE, J. M.; FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L.; KURAMAE, E. E. Análise filogenética de *Phytophthora capsici* Leonian de São Paulo baseada na seqüência de nucleotídeos da região ITS-5,8S rDNA. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 429-434, Apr./June 2003.

SAUNDERS, A. R. **Maize in South Africa**. [S. l.]: Central News Agency, 1930. 284 p. (South African Agricultural Series, 7)

SHERRIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; BAILEY, J. A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *Colletotrichum sublineolum*. **Mycological Research**, New York, v. 99, n. 4, p. 475-478, Apr. 1995.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; LAFAY, JM.; BRYGOO, J.; BAILEY, J. A. Ribossomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, San Diego, v. 18, n. 2, p. 121-138, June 1994.

SILVA-HANLIN, D. M. W.; MENEZES, M.; HANLIN, R. T.; RAMALHONETO, C. E. Ribossomal DNA sequencing data reveals low genetic variability among *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 534-539, dez. 1999.

SILVA-MANN, R. **Diversidade do complexo de *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares**. 2002. 146 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG .

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

SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. BERNARDINO FILHO, J. R.; SALGADO, K. C. C.; STEVENS, M. R. Marcadores AFLP diferenciam *Colletotrichum gossypii* de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 169-172, mar./abr. 2005.

SMITH, O. P.; PETERSON, G. L.; BECK, R. J.; SCHAAD, N. W.; BONDE, M. R. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of kanal bunt of wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 1, p. 115-122, Jan. 1996.

SOBREIRA, D. G. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidos no Estado de Minas Gerais, Safra 1985/86**. 1988. 70 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SREENIVASAPRASAD S.; MILLS, P. R.; MEEHAN, B. M.; BROWN, A. E. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 3, p. 499-512, June 1996.

SUTTON, B. C. **The coelomycetes**. London: Commonwealth Mycological Institute, 1980.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAYLEY, J. A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: Redwood Press, 1992. 388 p.

SWIFT, M.; BIGNELL, D. **Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice**. Bogor, Indonesia: International Centre for Research in Agroforestry, 2001. ASB. Lecture note 6B.

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.; MENTEN, J. O. M. *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 125, jun. 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.
- TAYLOR, E. J. A.; STEVENS, E. A.; BATES, J. A.; MORREALE, G.; LEE, D.; KENYON, D. M.; THOMAS, J. E. Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 347-355, June 2001.
- TEIXEIRA, H. *Colletotrichum gossypii* South. Em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) transmissibilidade e controle. 1995. 74 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- VECHIATO, M. H. Detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja por PCR. 2002. 115 p. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.
- VIÉGAS, A.P. Alguns fungos do Brasil XII. **Bragantia**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 1-37, Janeiro 1946.
- VIEIRA, C.; PAULA JR., T. J.; BORÉMA, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa: Editora UFV, 1998. 596 p.
- VIEIRA, M. G. G. C. **Técnicas moleculares em sementes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 86.
- 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, MG.
- VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. applicability of techniques for detection of seed – borne fungi under certification. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed – borne fungi: a contribution to routine seed health analysis**. Zurich: ISTA, 2002. p. 82-91.

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**, Berlin, v. 149, n. 1, p. 35-44, Jan. 2001.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DE INIBIDORES DA GERMINAÇÃO NA DETECÇÃO DE *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* EM TESTES DE SANIDADE DE SEMENTES DE ALGODOEIRO.

1 RESUMO

CARVALHO, Enia Mara de. Efeitos de inibidores da germinação na detecção de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. In:_____. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* associados a sementes do algodoeiro: aspectos morfológicos e moleculares.** 2005. Cap. 2, p. 24-40. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Em testes de sanidade, realizados por meio do método de incubação em papel de filtro, o impedimento da germinação com a adição de 2,4-D tem sido uma prática constante para a redução do comprimento de plântulas, evitando a contaminação secundária entre sementes. Entretanto, o uso desse herbicida apresenta limitações por ser tóxico à saúde humana e microrganismos. Em sua substituição, a técnica de restrição hídrica apresenta-se eficaz no controle da germinação, sem influenciar a incidência de fungos nas sementes. Assim, o objetivo neste estudo foi avaliar os efeitos de inibidores de germinação na produção de estruturas que possibilitem a identificação das espécies de *Colletotrichum* associadas às sementes de algodoeiro pelo método de incubação em papel de filtro. Sementes inoculadas foram submetidas ao teste de incubação em papel de filtro modificado com 2,4-D na concentração de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ e manitol no potencial de -1MPa . *C. gossypii* var. *cephalosporioides* apresentou características intermediárias, o que dificulta a sua distinção de *C. gossypii*. Características, como densidade de micélio e presença de setas encobertas pela massa de conídios, não foram úteis para distinguir as espécies estudadas. Dentre os inibidores de germinação, o manitol induziu menor porcentagem de setas longas em *C. gossypii* e menor desenvolvimento de micélio em todos os isolados, permitindo melhor visualização de outras estruturas quando comparado ao 2,4-D. Assim, o uso do manitol como regulador de germinação em teste de sanidade aumenta a confiabilidade na identificação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, em sementes de algodão.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Antônia dos Reis Figueira – UFLA (Co-orientadora).

2 ABSTRACT

Carvalho, Enia Mara de. Effect of seed germination inhibitors in the detection of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* in cotton seed health tests. In:_____. **Characterization of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* isolates associated with cotton seeds: morphological and molecular aspects.** 2005. Chap. 2, p. 26-42. Thesis (Doctorate in Agronomy/Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

In seed health tests to detect fungi on cotton by using blotter method, inhibition of germination of seeds and reduction of cross contamination between seeds is done usually by incorporation of 2,4-D into the filter paper substrate. Nevertheless, the use of this herbicide presents limitations for being toxic to human health and to microorganisms. Alternatively, the technique of water restriction provides conditions to control seed germination without influencing the incidence of fungi in seeds. Thus, the objective in this work was to evaluate the effects of germination inhibitors in the production of structures which enable the identification of *Colletotrichum* species associated with cotton seeds by using blotter test. Artificially infected seeds submitted to modified blotter test with 10 ug. mL⁻¹ of 2,4-D and -1 MPa of mannitol showed *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and *C. gossypii* with intermediary morphological characteristics, making difficult their distinction. Characteristics such as mycelial density and presence of setae covered with masses of conidia were not useful to distinguish the species studied. Among the germination inhibitors, mannitol induced the smallest percentage of long setae in *C. gossypii* and the smallest mycelial development in all isolates enabling better visualization of other typical morphological structures as compared with 2,4-D. Thus, the use of mannitol as a seed germination inhibitor in health tests provides better conditions to identify both *Colletotrichum* on cotton seeds.

* Advising Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) Antônia dos Reis Figueira – UFLA (Co-adviser)

3 INTRODUÇÃO

Entre os fungos transmitidos por sementes de algodão, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, agente etiológico da ramulose, apresenta limitações quanto à sua identificação pelo teste de sanidade indicado para a análise de rotina em laboratório. *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, além de apresentar características morfológicas semelhantes a *C. gossypii*, agente etiológico da antracnose, apresenta características altamente variáveis.

Embora as técnicas baseadas em marcadores moleculares possam superar alguns problemas comumente encontrados em metodologias tradicionais, sua aplicação, por ser de critério qualitativo, não fornece informações a respeito de viabilidade dos microrganismos. Portanto, essas técnicas devem ser empregadas juntamente com testes que requerem incubação de sementes.

Em testes tradicionalmente utilizados para a diagnose de fungos em sementes, o impedimento da germinação com a adição do sal de diclorofenoxiacetato (2,4-D), tem sido uma prática constante para a redução do comprimento de plântulas, sendo recomendado para as culturas de algodão, de brássicas, de beterraba e de feijão, além de outros (Machado & Langerak, 2002). Entretanto, o uso desse herbicida, além do aspecto de toxidez à saúde humana, pode inibir o crescimento de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Sobreira, 1988).

Em substituição ao uso de 2,4-D, a técnica de restrição hídrica apresenta-se eficaz no controle da germinação, sem influenciar a incidência de fungos nas sementes (Coutinho, 2000; Machado, 2002; Magalhães, 2005), podendo, inclusive, induzir a produção de estruturas fúngicas que permitem a detecção segura de fungos com grande variabilidade morfológica.

Em trabalhos anteriores, comparações foram feitas utilizando-se apenas um isolado de *C. gossypii* e um isolado de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, permanecendo a dúvida sobre a viabilidade do método quando outros isolados são utilizados.

Assim, o objetivo neste estudo, foi comparar os efeitos de inibidores de germinação na produção de estruturas que possibilitem a identificação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em teste de incubação de sementes (*blotter test*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

4.1 Procedimento de inoculação das sementes

As sementes foram inoculadas, por meio da técnica de restrição hídrica desenvolvida por Machado et al. (2004). Dez isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e um de *C. gossypii*, provenientes de várias regiões (Tabela 1). Os isolados foram transferidos de estoques em sílica gel para placas de petri contendo BDA + manitol no potencial -1 MPa, calculado pelo software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995). Em seguida, as placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura ajustada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e regime de luz de 12 horas, durante quatro dias. Após esse período, as sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% durante um minuto e secas ao ar, foram distribuídas nas placas e mantidas pelo período de 36 horas. Após a inoculação, as sementes foram novamente desinfestadas com hipoclorito de sódio e submetidas ao teste de sanidade.

TABELA 1. Origem dos isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* empregados no estudo. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	Cultivares	Origem
Cg002. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ipê	Acreúna, GO
Cg003. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ipê	Acreúna, GO
Cg012. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ipê	Acreúna, GO
Cg021. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ipê	Santa Helena, GO
AM3FC. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	NI	Alto Taquari, MT
PD-2. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Cedro	Rondonópolis, MT
PE-1. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	ITA-90	Pedra Preta, MT
PF-3. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Cedro	Pedra Preta, MT
PF-2a. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	NI	Itiquira, MT
Ca24. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Híbrido Israelense	Novo São Joaquim, MT
LPS1025. <i>C. gossypii</i>	NU 15	Campinas, SP

4.2 Teste de sanidade

Utilizou-se o método de incubação em substrato de papel de filtro (Neergaard, 1979) modificado com a adição em separado, de dois inibidores de germinação das sementes, 2,4-D na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Machado & Langerak, 1993) e manitol no potencial de -1 MPa (Machado, 2002).

Para avaliar o efeito dos inibidores de germinação no hábito de crescimento dos isolados, as sementes foram examinadas aos sete dias de incubação, em microscópio estereoscópico, determinando-se o número de sementes que apresentavam determinada característica que posteriormente foi

transformado em porcentagem. As características avaliadas foram consideradas típicas de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* conforme a descrição de Tanaka et al. (1996) e recomendação de Machado & Langerak (2002), como presença de micélio de coloração cinza, tipo aéreo, poço denso, setas longas e visíveis pela massa de conídios.

Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar[®] (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO


Pela análise de variância, os isolados estudados diferiram em todas as características avaliadas com 5% de significância. Já os produtos inibidores da germinação utilizados no *blotter test* não interferiram na maioria das variáveis utilizadas (Tabela 1A).

Observou-se alta variabilidade entre os isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em todas as características de micélio e presença de setas visíveis pela massa de conídios (Tabelas 2 e 3). Esse resultado evidencia a grande variabilidade morfológica entre os isolados, conforme relatado por Chitarra (1996), Dudienas (1990) e Ottonello (1992).

Pela análise da coloração do micélio, presença de micélio tipo aéreo e setas longas (Tabelas 2 e 3), foi possível distinguir *C. gossypii* var. *cephalosporioides* de *C. gossypii*. Entretanto, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* apresentou características intermediárias relacionadas ao micélio, o que dificulta sua identificação por esta metodologia.

Pela análise da interação dos isolados e restritores da germinação, observou-se a presença de setas longas em 45% das sementes inoculadas com *C. gossypii* e incubadas com a presença de 2,4-D. Já no mesmo grupo de sementes incubadas com manitol, observaram-se 10% da mesma característica (Tabela 3). Assim, a utilização de manitol como regulador da germinação aumentou a confiabilidade do teste, uma vez que setas longas são características em *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Neste trabalho, as avaliações das características para identificar os agentes etiológicos da ramulose e antracnose foram analisadas em 40 sementes.



Assim, a separação dos microrganismos foi baseada na proporção em que determinada característica ocorreu.

Ao considerar que, em análise de rotina, a separação de fungos pelo *blotter test* é realizada em cada semente a fim de se obter a incidência de determinado fungo na amostra, pelos resultados observados neste estudo, conclui-se que o teste não oferece alta confiabilidade para os dois fungos em questão.

Dentre as características sugeridas por Tanaka et al. (1996), a densidade de micélio e a presença de setas visíveis pela massa de conídios não foram úteis para distinguir as espécies de *Colletotrichum*, ocorrendo em proporções muito variadas. Outra característica descrita para *C. gossypii* var. *cephalosporioides* é a baixa densidade de setas. Entretanto, neste estudo, verificou-se a presença de setas em alta densidade para vários isolados (Figuras 2A e 2B).

A utilização de 2,4-D favoreceu o desenvolvimento do micélio, tornando-o mais denso em relação ao manitol (Tabela 2), dificultando a avaliação das outras características. Provavelmente, esse maior desenvolvimento ocorreu devido ao aumento no teor da umidade observada quando utiliza-se 2,4-D, favorecendo a formação de gotículas, conforme observado na figura 2E. A presença de gotículas impede uma melhor visualização dos caracteres relacionados à colônia. Por outro lado, com a restrição hídrica, a visualização do micélio torna-se mais segura.

TABELA 2. Teste de média referente à porcentagem de sementes com características morfológicas de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*, descritas por Tanaka et al. (1996), observadas em teste de sanidade de sementes. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	Características do Micélio (%)		Frutificações com setas visíveis (%)
	Cor cinza	Tipo aéreo	
Cg002 _{Cgc}	92,50 a	95,00 a	82,50 a
Cg003 _{Cgc}	87,50 ab	93,75 ab	78,75 a
Cg012 _{Cgc}	93,75 a	100 a	68,75 bc
Cg021 _{Cgc}	61,25 b	73,75 b	57,50 abc
Am3F _{Cgc}	72,50 ab	98,75 a	26,25 c
PD-2 _{Cgc}	82,50 ab	96,75 a	66,25 bc
PE-1 _{Cgc}	63,75 b	93,75 ab	62,50 abc
PF-3 _{Cgc}	92,50 a	88,75 ab	76,25 bc
PF-2 ^a _{Cgc}	63,75 b	96,25 a	38,75 bc
Ca-24 _{Cgc}	83,75 ab	98,75 a	71,25 bc
LPS1025 _{Cg}	10,00 c	7,50 c	85,00 a

Médias com a mesma letra minúscula são estatisticamente iguais, pelo teste Tukey ($P \leq 5\%$).

*Cgc – Isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

*Cg – Isolado de *Colletotrichum gossypii*.

TABELA 3. Teste de média referente à porcentagem de sementes com características morfológicas de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*, descritas por Tanaka et al. (1996), observadas em teste de sanidade de sementes. UFPA, Lavras, MG, 2005.

Isolados*	Micélio pouco denso		Frutificações com setas longas	
	2,4-D	Manitol	2,4-D	Manitol
Cg002 _{Cgc}	70 abc A	77,5 a A	100 a A	100 a A
Cg003 _{Cgc}	32,5 cd A	25 bcd A	95 a A	95 a A
Cg012 _{Cgc}	92,5 a A	50 abc B	92,5 a A	100 a A
Cg021 _{Cgc}	60 abc A	20 bcd B	95 a A	100 a A
Am3F _{Cgc}	70 abc A	47,5 abc A	100 a A	95,5 a A
PD-2 _{Cgc}	2,5 d A	2,5 d A	100 a A	100 a A
PE-1 _{Cgc}	80 a A	15 cd B	100 a A	87,5 a A
PF-3 _{Cgc}	60 abc A	15 cd B	92,5 a A	100 a A
PF-2a _{Cgc}	77,5 ab A	55 ab A	100 a A	95 a A
Ca-24 _{Cgc}	72 ab A	35 bcd B	92,5 a A	100 a A
LPS1025 _{Cg}	40 bcd A	15 cd B	45 b A	10 b B

Médias com a mesma letra minúscula na coluna são estatisticamente iguais, pelo teste Tukey ($P \leq 5\%$).

Médias com a mesma letra maiúscula na linha são estatisticamente iguais, pelo teste Tukey ($P \leq 5\%$).

*Cgc – Isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

*Cg – Isolado de *Colletotrichum gossypii*.

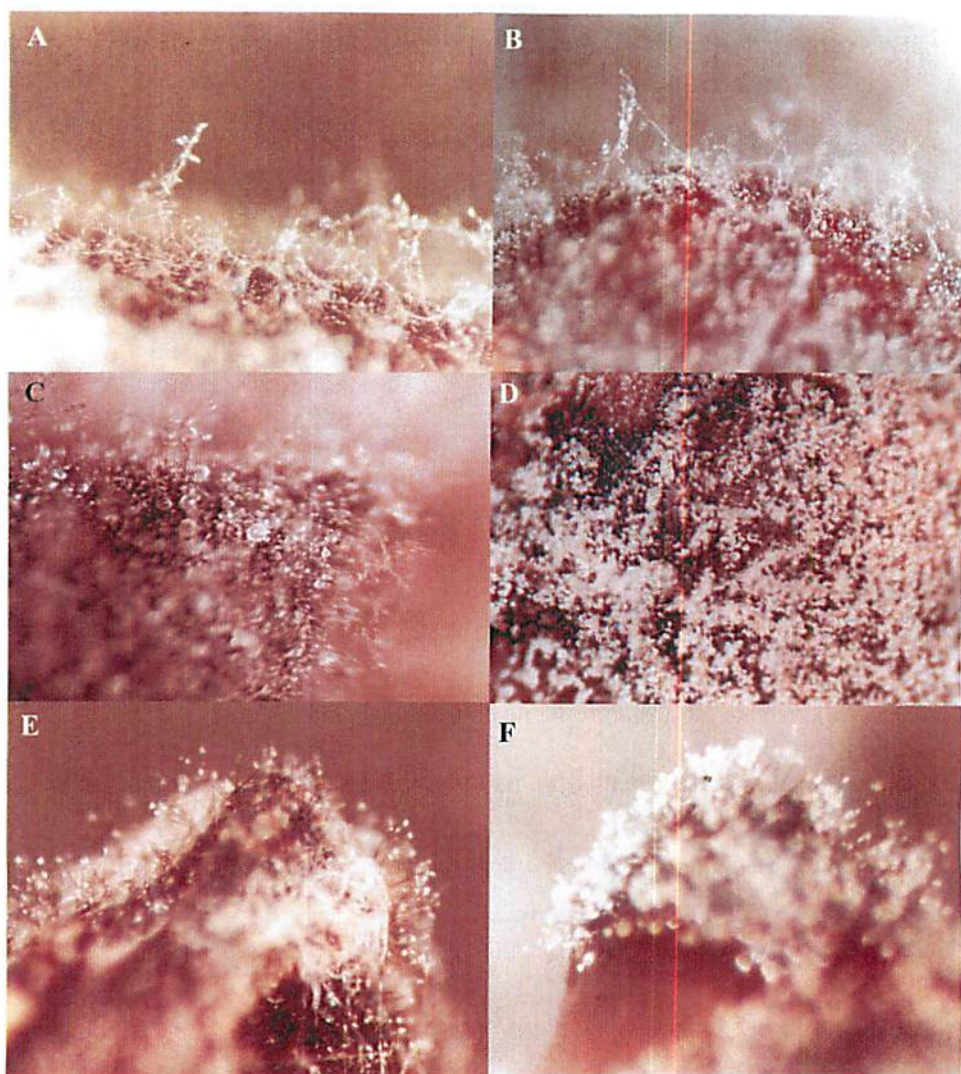


FIGURA 1. Estruturas de *Colletotrichum* em sementes de algodão. Micélio tipo aéreo produzido por isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (A, B e C). Ausência de micélio aéreo, típico de *C. gossypii* (D). Aglomerado de conídios nos ápices dos acérvulos em *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (E e F) (Resolução 40X).

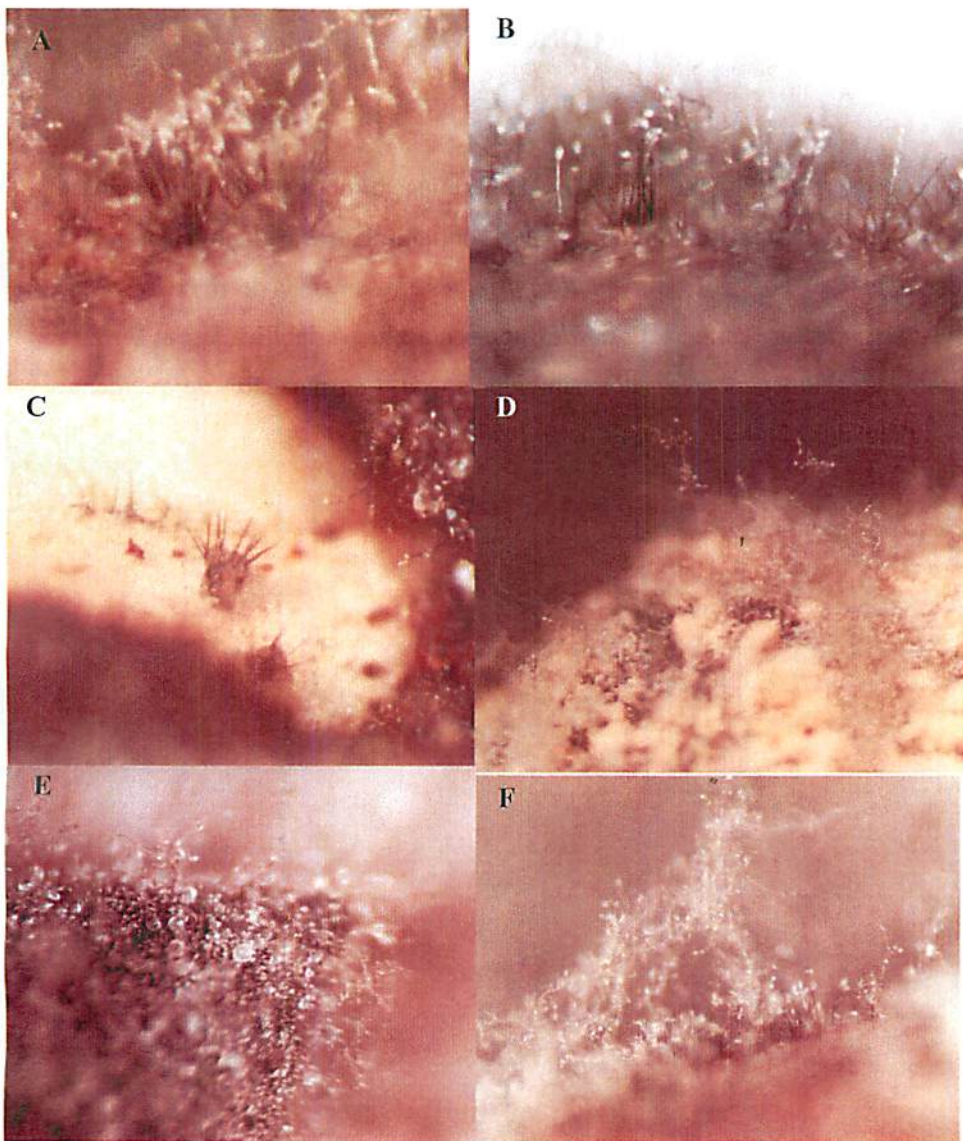


FIGURA 2. Estruturas de *Colletotrichum* em sementes de algodão. Alta densidade de setas (A e B) e massa de conídios encobrendo as setas em *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (C e D). Formação de gotículas de água em micélio na presença de 2,4-D (E) e micélio seco na presença de manitol (F) (Resolução 40X).

6 CONCLUSÕES

1. O uso de manitol como regulador de germinação no teste de incubação em substrato de papel proporciona maior confiabilidade na identificação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão.
2. *C. gossypii* var. *cephalosporioides* apresenta alta variabilidade em teste de sanidade independente dos inibidores da germinação de sementes empregados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COUTINHO, W. M. **Uso da restrição hídrica no controle da germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em testes de sanidade.** 2000. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows Versão 4. 0.** In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45. , 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

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, MG.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J. **Detection of seed-borne fungi – general and potential methods.** In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis.** Zurich: International Seed Testing Association, 2002. p. 47-80.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J. **Improvement of a blotter method to detect economically important fungi associated with seeds of cotton.** In: ISTA PLANT DISEASE COMMITTEE SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING, 1. , 1993, Ottawa. **Proceedings...** Ottawa: ISTA, 1993. p. 48-58.

MAGALHÃES, F. H. L. **Restrição hídrica em patologia de sementes: novas aplicações.** 2005. 131 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal*, Madison, v. 87, n. 1, p.126-130, Jan./Feb. 1995.

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

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.

SOBREIRA, D. G. Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzida no Estado de Minas Gerais, safra 1985/86. 1988. 70 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE REGIÕES DO DNA RIBOSSOMAL DE ISOLADOS DE *Colletotrichum gossypii* E *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

1 RESUMO

CARVALHO, Enia Mara de. Caracterização molecular de regiões do DNA ribossomal de isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. In:_____. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* associados a sementes do algodoeiro: aspectos morfológicos e moleculares.** 2005. Cap. 3, p. 41-71. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Análises do DNA ribossômico têm sido realizadas para estudos de variabilidade, filogenia de microrganismos e desenvolvimento de *primers* específicos para adeteção de patógenos. Dessa forma, O objetivo neste trabalho foi fazer a caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* de várias regiões do país, baseando-se na seqüência de nucleotídeos de regiões do rDNA. As regiões ITS 1, 5,8 S e ITS 2 do rDNA de isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*, provenientes de diferentes estados produtores de algodão, foram seqüenciadas e comparadas entre si e com isolados de outras espécies, obtidos no banco de genes. Os isolados do algodoeiro apresentaram identidade genética variando de 96% a 100% na região ITS 1, 98% a 100% no gene 5,8 S e 97% a 100% na região ITS 2. Pela árvore filogenética, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* pertencem ao mesmo grupo, juntamente com isolados de *Glomerella cingulata* de mangueira e mamoeiro, não sendo possível sua distinção.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) e Antônia dos Reis Figueira – UFLA (Co-orientadora)

2 ABSTRACT

Carvalho, Enia Mara de. Molecular characterization of *Colletotrichum gossypii* and *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* using ribosomal DNA regions. In:_____. **Characterization of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* isolates associated with cotton seeds: morphological and molecular aspects.** 2005. Chap. 3, p. 43-73. Thesis (Doctorate in Agronomy/Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Ribosomal DNA has been used to evaluate the genetic variability, microorganism phylogeny and to develop specific primers for the detection of plant pathogens. In this study, the aim was to characterize isolates of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* and *C. gossypii*, collected in different regions of Brazil by analyzing the nucleotide sequence of rDNA. ITS 1, 5.8 S and ITS 2 regions were amplified by PCR, sequenced and compared with each other and with sequences of other species deposited in the gene bank. The isolates associated with cotton presented genetic identity ranging from 96% to 100% in ITS 1 region, 98% to 100% in 5.8S gene and 97% to 100% in ITS 2 region. The sequences were analysed using the criteria of UPGMA and a tree with the relationships among the two species showed that *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and *C. gossypii* belonged to the same group along with isolates of *Glomerella cingulata* from mango and papaya, which makes difficult the separation of the above mentioned species.

*Advising Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) Antônia dos Reis Figueira – UFLA (Co-adviser)

1 INTRODUÇÃO

Dentre as várias doenças do algodoeiro, cujos patógenos são transmitidos por sementes, a ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, é uma das mais importantes. As perdas ocasionadas por ela podem chegar a 80%, caso as cultivares de algodão sejam suscetíveis e as condições de temperatura e umidade sejam favoráveis (Carvalho et al., 1984; Cia, 1977; Cia & Salgado, 1997).

A qualidade sanitária das sementes de algodoeiro é de fundamental importância na produtividade dessa cultura, e a utilização de sementes livres de patógeno é um dos principais métodos de manejo aplicado a esse patossistema. Isso se deve ao papel desempenhado pelas sementes, tanto na disseminação de doenças quanto no estabelecimento da lavoura, interferindo, assim, nos índices de produtividade. Daí a importância da detecção e diagnose do patógeno por meio de testes de sanidade, quando este se encontra associado às sementes.

Entretanto, o agente etiológico da ramulose apresenta distinção duvidosa nos testes de sanidade de sementes tradicionalmente utilizados como rotina, pela possibilidade de o agente da antracnose, *Colletotrichum gossypii*, também estar associado às sementes. Tanto o causador da antracnose como o da ramulose apresentam alta variabilidade morfológica e, muitas vezes, características intermediárias que não permitem sua distinção.

Além disso, entre os fungos do complexo *Colletotrichum* do algodoeiro, apenas o agente da ramulose foi indicado como patógeno prioritário para o estabelecimento de padrões de tolerância nessa cultura (Portaria nº 71 do Ministério da Agricultura, de 22 de fevereiro de 1999). Portanto, os esforços em caracterizar geneticamente esses microrganismos são fundamentais, podendo se

tornar uma ferramenta útil no desenvolvimento de metodologias de diagnose e de futuros programas de melhoramento.

A seqüência de nucleotídeos das regiões espaçadoras internas do rDNA (ITS1 e ITS2) tem sido amplamente utilizada para caracterizar gêneros e espécies, podendo inclusive servir como subsídio para embasar a proposição de uma nova classificação (Cano et al., 2004; Bailey et al., 1996; Denoyes-Rothan et al., 2003; Hsiang & Goodwin, 2001; Sherriff et al., 1994, 1995; Sreenivasaprasad et al., 1996).

Considerando-se essa dificuldade de distinção entre os agentes causadores da ramulose e da antracnose em algodoeiro e a falta de dados sobre as suas regiões ITS1 e ITS2, o objetivo neste trabalho foi realizar a caracterização molecular de alguns isolados de *C. gossypii*, considerados causadores típicos da antracnose, de isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, coletados em várias regiões do país e comparar os dados obtidos com os disponíveis no banco internacional de genes, para outras espécies do gênero *Colletotrichum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios Patologia de Sementes e Fitovirologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

2.1 Obtenção e manutenção dos isolados

Foram utilizados 5 isolados de *C. gossypii* e 17 isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Parte dos isolados foi obtido de sementes de algodão provenientes da região de Campinas, SP e Lavras, MG e parte foi cedido da coleção da Embrapa/CNPA (Tabela 1). Todos os isolados foram caracterizados pelo teste de patogenicidade e armazenados pelo método de sílica gel, sob temperatura ambiente.

TABELA 1. Origem dos isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* empregados no estudo. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	Cultivares	Origem
LPS1005. <i>C. gossypii</i>	NU 15	Lavras, MG
LPS1015. <i>C. gossypii</i>	NU 15	Lavras, MG
LPS1016. <i>C. gossypii</i>	NU 15	Campinas, SP
LPS1020. <i>C. gossypii</i>	NU 15	Campinas, SP
LPS1025. <i>C. gossypii</i>	NU 15	Campinas, SP
AM3FC. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	NI	Alto Taquari, MT
PF-2a. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	NI	Itiquira, MT
AM-1. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Aroeira	Chapadão do Céu, GO
PE-1. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	ITA-90	Pedra Preta, MT
Cg021. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ipê	Santa Helena, GO
Cg002. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ipê	Acreúna, GO
Cg012. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ipê	Acreúna, GO
PF-3. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Cedro	Pedra Preta, MT
PF-1b. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Cedro	Rondonópolis, MT
PF-1a. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Cedro	Rondonópolis, MT
PD-2. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Cedro	Rondonópolis, MT
Cg027. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ipê	Santa Helena, GO
PF-2b. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	NI	Primavera do Leste, MT
PF-1c. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	ITA-90	Itiquira, MT
Cg003. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ipê	Acreúna, GO
Cg015. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Ipê	Santa Helena, GO
Ca24. <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Híbrido Israelense	Novo São Joaquim, MT

2.2 Teste de patogenicidade

O inóculo foi produzido em meio BDA (250g de batata, 20g de dextrose e 20g de ágar para 1 litro de meio), por 7 dias. Posteriormente, foi preparada uma suspensão de conídios na concentração de 10^6 conídios/mL e pulverizada em plantas da linhagem NU 15, com 30 dias após emergência. As plantas foram submetidas a câmara úmida durante 72 horas, sob temperatura de 25°C e regime

de luz de 12 horas. O tratamento testemunha consistiu de plantas pulverizadas com água destilada e esterilizada e submetidas às mesmas condições. As avaliações foram realizadas aos 30 dias após inoculação, de acordo com critérios estabelecidos por Cia (1977), adaptados por Silva Mann (2002) (Tabela 2).

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sisvar[®] (Ferreira, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

TABELA 2. Escala de notas para avaliação dos sintomas em plantas de algodoeiro inoculadas com fungos do complexo *Colletotrichum* (Cia, 1977).

Sintomas	Notas
Planta sem sintoma (ausência de lesões)*	1
Planta com manchas estreladas nas folhas do ponteiro	2
Planta com redução no desenvolvimento inferior a 40%	3
Planta com superbrotamento e redução no desenvolvimento de 40% a 60%	4
Planta com superbrotamento e com desenvolvimento comprometido $\geq 60\%$	5

* Isolados que não induziram sintomas em plantas foram caracterizados como *C. gossypii*.

2.3 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de cultura pura, desenvolvida durante três dias em meio de extrato de malte (20g de extrato de malte/1000mL de meio). Após o período de incubação, o micélio foi filtrado em bomba a vácuo. Maceraram-se 150g de micélio em nitrogênio líquido com a presença de polivinilpirrolidona aos quais foram adicionados 750µL de tampão de extração (CTAB 3%; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 20mM EDTA; 1,4M NaCl; PVP 2%; 2-mercaptaetanol 0,5%). Em seguida, o material foi incubado a 65°C durante 60 minutos, homogeneizando-se a cada 10 minutos. Ao término, adicionaram-se 600µL de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 24:1, agitou-se gentilmente, e a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Transferiram-se 550µL do sobrenadante para microtubo, acrescentando 143µL de NaCl 5N e 65µL de CTAB 10%. A amostra foi, então, agitada e incubada a 65°C por 10 minutos. Após esta etapa, adicionaram-se 600µL de clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 24:1 e submeteu-se a amostra à centrifugação nas mesmas condições descritas na etapa anterior. Alíquota de 550µL foi recuperada em novo microtubo, ao qual adicionou-se NH₄Ac 5M, homogeneizando-se gentilmente e incubando-se a amostra em gelo durante 30 minutos. Após esse período, centrifugou-se a amostra a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para novo microtubo, ao qual foram adicionados 600µL de isopropanol absoluto gelado incubado a -20°C durante 30 minutos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se a lavagem do *pellet* com 600µL de etanol 70% gelado e spin durante 10 segundos. Os *pellets* de DNA foram secos em ultracentrífuga durante 4 minutos e, então, ressuspendidos com 100µL de tampão TE (10mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1mM de EDTA).

As amostras de DNA foram submetidas ao tratamento com RNase, adicionando-se 5µL de ribonuclease bovina A (0,5mg/mL) e incubadas a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10µL de acetato de sódio 3M e 275µL de etanol absoluto. As amostras foram, então, incubadas durante 30 minutos a -20°C e centrifugadas a 14.000 rpm. Novamente, procedeu-se a lavagem com etanol 70%, secagem do *pellet* em ultracentrífuga e ressuspensão em 60µL de tampão TE.

A quantidade e a qualidade do DNA foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose (0,7%).

2.4 Amplificação dos fragmentos ITS 1, 5.8 S e ITS 2

Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR (*polymerase chain reaction*), utilizando-se 5µL do tampão de reação 10X (0,5M Tris-HCl; 0,7M KCl; 0,1M MgCl₂ pH 8,0), 4µL de MgCl₂ (25mM), 5µL do mix dNTP (2mM de cada dNTP 100mM; 1µL Tris-HCl pH 8,0 1M; 1µL de DTT 100mM; 90µL água ultra pura), 1µL de Taq DNA polimerase (5un/µL), 29,5µL de água ultrapura, 2µL de cada oligonucleotídeo específico para a região de espaçadores transcritos internos (ITS) de rDNA com a concentração de 10pmol/µL, ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e ITS 5 (5' GGAAGTAAAAGTCG TAACAAGG 3') (Figura 1).

Na amplificação, foram utilizados 35 ciclos no termociclador PCT-100 (MJ Research, Inc. USA), com o programa 40 segundos a 94°C, 55 segundos a 50°C, 2 minutos a 72°C, seguido de um ciclo final de 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR, após eletroforese em gel de agarose 0,7% e coloração em brometo de etídio (0,15mg/mL), foram visualizados e fotografados no Image Master (Pharmacia).

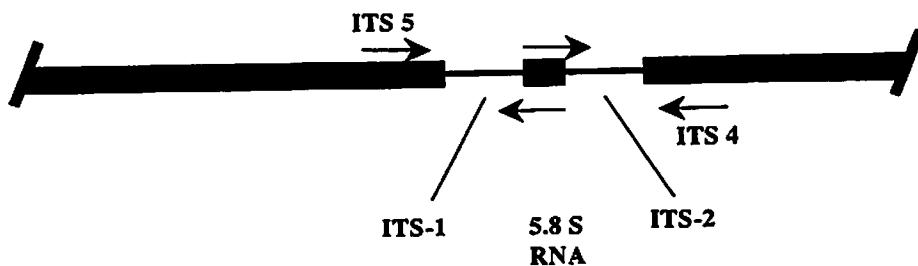


FIGURA 1. Primers da região de espaçadores transcritos internos (ITS) do rDNA.

2.5 Clonagem e seqüenciamento

Os fragmentos de DNAs amplificados dos isolados PF-1c, PF-2b e LPS 1005 foram clonados e o DNA dos demais isolados foram extraídos do gel, purificados e submetidos ao seqüenciamento direto.

Clonagem de fragmentos de DNA

Os fragmentos foram clonados no plasmídeo vetor PCR 2.1 do kit “TOPO TA Cloning System” (Invitrogen, San Diego, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante e utilizando-se as técnicas convencionais descritas por Sambrook (1989). Foram utilizados 1 μ L do produto fresco da PCR, 1 μ L da solução salina diluída, 1 μ L do plasmídeo PCR TOPO vector e 2 μ L de água deionizada e esterilizada. A reação foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$). Após esse período, foram transferidos 2 μ L para microtubos contendo células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen, San Diego, EUA), para a transformação das mesmas. As amostras foram incubadas durante 30 minutos no gelo, submetidas ao choque térmico durante 90 segundos em banho-

maria a 42°C e novamente no gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 280µL do meio SOB (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM; KCl 2,5mM; MgCl₂ 10mM e MgSO₄ 10mM) e, em seguida, o material foi incubado, sob agitação, a 37°C durante 30 minutos.

Para o crescimento das colônias, utilizaram-se placas de petri com meio sólido LB (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; pH 7,0; ágar 1,5%), contendo ampicilina (10mg/mL), X-GAL (25µL). Em seguida, foram adicionados 140µL de suspensão de células bacterianas em cada placa, espalhadas com alça de Drigalski e incubadas a 37°C por, no máximo, 12 horas.

As colônias transformadas (brancas) foram individualmente transferidas para tubos contendo LB líquido. Os tubos foram incubados a 37°C, sob agitação, por 12 horas.

Os plasmídeos foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição *EcoR I*, a fim de se comprovar a presença do fragmento clonado. A concentração do DNA foi estimada em gel de agarose (0,7%).

Purificação de fragmentos de DNA

Após cada PCR, 100µL dos produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,7%), ao lado de uma alíquota de 2µL de marcador ladder. A parte do gel em que se encontrava a alíquota de 2µL, foi retirada e corada em brometo de etídio (0,15mg/mL). Após a localização do fragmento por comparação com o fragmento corado, este foi excisado do gel e purificado utilizando-se o Kit QiAquick® (Quiagen DNA), seguindo-se as recomendações do fabricante. A qualidade e a concentração do DNA foram estimadas em gel de agarose (0,7%).

Os fragmentos de DNA amplificados de nove isolados foram seqüenciados no Laboratório Bioagro, da Universidade Federal de Viçosa,

fragmentos de quatro isolados foram seqüenciados no Laboratório Central de Biologia Molecular na Universidade Federal de Lavras e fragmentos de nove isolados foram seqüenciados no Laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA de Sete Lagoas.

2.6 Análises das seqüências

Após as correções das seqüências com o auxílio dos eletroferogramas e pelo alinhamento dos sentidos *forward* e *reverse*, as regiões ITS 1, 5,8 S rDNA e ITS 2 foram separadas utilizando-se o programa *online blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). As seqüências dos isolados foram comparados entre si e com isolados de outras espécies do gênero *Colletotrichum* já publicados no *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabela 3), pelo alinhamento múltiplo, utilizando-se o programa *Clustalw* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). As árvores filogenéticas, com *bootstrap* de 1.000 repetições, foram obtidas e visualizadas considerando-se somente os valores superiores a 25%, por meio do programa *MEGA* (<http://www.megasoftware.net>).

TABELA 3. Isolados do gênero *Colletotrichum* disponíveis no Gene Bank.
Lavras, MG, 2005.

Isolados	Hospedeiros e origem	Nº acesso
PT250 <i>Glomerella acutata</i>	Oliveira, Portugal	AJ749700
PT248 <i>Glomerella acutata</i>	Oliveira, Portugal	AJ749698
IMI348499 <i>Glomerella acutata</i>	Morango, França	AJ536220
S3.7 <i>Glomerella acutata</i>	Morango, Costa Rica	DQ018741
S2.8 <i>Glomerella acutata</i>	Morango*	DQ018738
IMI348494 <i>Glomerella acutata</i>	Morango, França	AJ536218
CG P1.1 <i>Glomerella cingulata</i>	Mamão, África do Sul	AY18893
BBA71367 <i>Glomerella cingulata</i>	Mamão*	AJ301979
CgP1 <i>Glomerella cingulata</i>	Mamão, África do Sul	AY188935
TSG003 <i>Glomerella cingulata</i>	Mangueira, China	AY791894
TSG006 <i>Glomerella cingulata</i>	Mangueira, China	AY791891
BBA70072 <i>Glomerella cingulata</i>	Mangueira*	AJ301909
CG84 <i>Glomerella cingulata</i>	Mangueira, África do Sul	AY177313
CBS710.70 <i>Colletotrichum truncatum</i>	Tremoço*	AJ301945
BBA71528 <i>Colletotrichum truncatum</i>	Tremoço*	AJ301985
BBA70710 <i>Colletotrichum truncatum</i>	Alfafa*	AJ301944
MAFF238714 <i>Colletotrichum dematium</i>	Rabanete, Japão	AB196301
MAFF238713 <i>Colletotrichum dematium</i>	Rabanete, Japão	AB196300
S1518S <i>Colletotrichum dematium</i>	Rabanete, Suécia	AF411773
G318S <i>Colletotrichum dematium</i>	Azaléia, Suécia	AF411770
99003 <i>Glomerella graminicola</i>	Gramma, Canadá	AF289234
97266 <i>Glomerella graminicola</i>	Gramma, Canadá	AF289232
DR1 <i>Glomerella graminicola</i>	<i>Poa annua</i> , Ottawa	AF059676
BBA65483 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus</i> sp*	AJ301958
CBS132.57 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> *	AJ301947
CBS151.28 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> *	AJ301946
MAFF305390 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Japão**	AB087222
IMI82269 <i>Colletotrichum gossypii</i>	Algodão, Brasil	Z74732
IMI80023 <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Algodão, Brasil	Z74730
IMI27775 <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Algodão, Bolívia	Z74728

**Hospedeiro não relatado *Local de origem não relatado

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de patogenicidade

Pelo teste de patogenicidade, os isolados foram divididos em três grupos (Tabela 4), considerando-se a escala de notas proposta por Cia (1977). Um dos grupos foi constituído de cinco isolados (LPS: 1005, 1015, 1016, 1020 e 1025) que receberam nota 1, portanto, não induziram sintomas nas plantas de algodão, característica típica de *Colletotrichum gossypii*. Outro grupo foi constituído de cinco isolados (Cg021, AM3F, PE-1, PF-2a e AM-1), com nota média em torno de 2,25, caracterizado como *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Neste grupo, os isolados induziram sintomas de mancha estrelada nas folhas do ponteiro e redução de internódios inferior a 40%. O maior grupo, representado pelos 12 isolados restantes, receberam nota médias acima de 2,75, também caracterizados como *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Estes induziram sintomas mais severos em plantas que apresentaram lesões estreladas nas folhas do ponteiro e redução de internódios entre 40% e 60%.

Apesar de ter tomado todos os cuidados necessários para se evitar contaminação de plantas e ter padronizado o método de inoculação, a concentração de conídios e o estágio de desenvolvimento da planta, nem sempre a reação das plantas com o patógeno foi muito clara. Algumas delas apresentaram sintomas duvidosos, como encarquilhamento leve das folhas, com ausência da mancha estrelada e outras morreram, não tendo sido avaliadas. Posto que morte de plantas neste estágio de desenvolvimento pode ser induzida tanto por *C. gossypii* como por *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

TABELA 4. Valores médios das notas atribuídas às plantas de algodão, cv. NU-15, inoculadas com diferentes isolados do gênero *Colletotrichum*. Lavras, MG, 2005.

Isolados	Caracterização	Severidade	Sintomas
LPS1005	<i>C. gossypii</i>	1 b	PSS
LPS1015	<i>C. gossypii</i>	1 b	PSS
LPS1016	<i>C. gossypii</i>	1 b	PSS
LPS1020	<i>C. gossypii</i>	1 b	PSS
LPS1025	<i>C. gossypii</i>	1 b	PSS
AM3F	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,25 ab	PSS/ RI<40%
PF-2a	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,25 ab	ME/ RI<40%
AM-1	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,25 ab	ME/ RI<40%
PE-1	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,25 ab	PSS/ME/ RI<40%
Cg021	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,25 ab	PSS/ ME/RI<40%
Cg002	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,75 a	ME/ RI<40%
Cg012	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,75 a	ME/ RI<40%
PF-3	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,75 a	ME/ RI<40%
PF-1b	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,75 a	ME/ RI<40%
PF-1a	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,75 a	PSS/RI<40%/SB-RD40-60%
PD-2	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2,75 a	ME/RI<40%/SB-RD 40-60%
Cg027	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	3,25 a	RI<40%/SB-RD 40-60%
PF-2b	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	3,5 a	RI<40%/SB-RD 40-60%
PF-1c	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	3 a	ME/RI<40%/SB-RD40-60%
Cg003	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	3 a	RI<40%
Cg015	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	3 a	RI<40%
Ca24	<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	3 a	ME/ RI<40%
Test	-----	1 b	PSS

Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey

($P \leq 1\%$)

PSS = planta sem sintoma, ME = mancha estrelada, RI < 40% = redução no desenvolvimento inferior a 40%, SB-RD 40% a 60% = superbrotaamento e redução no desenvolvimento de 40% a 60%.

Essa variabilidade da agressividade já havia sido observada por outros autores, que trabalharam com a inoculação de isolados de *Colletotrichum* em

diferentes cultivares de algodoeiro, mostrando que essa interação patógeno-hospedeiro parece ser bastante complexa (Dudienas, 1990; Yamamoto, 2002; Silva-Mann, 2002). Uma outra evidência dessa complexidade foi o fato de que algumas das plantas que receberam nota 1 apresentaram pequena necrose nas nervuras, sintoma não incluído na escala de notas proposta por Cia (1997). Apesar desse sintoma ter sido descrito para ramulose, é típico de antracnose em outras culturas.

3.2 Análise das seqüências de nucleotídeos

Os *primers* ITS 4 e ITS 5 permitiram a amplificação de fragmentos com aproximadamente 500pb, obtendo-se as regiões ITS 1, 5,8S rDNA e ITS 2 completas, para todos os isolados. As seqüências apresentaram entre 167 a 168pb na região ITS1, 159pb no gene 5,8S e 177pb na região ITS2.

A identidade obtida pelo alinhamento múltiplo de nucleotídeos da região ITS1, dos 22 isolados de *Colletotrichum* do algodoeiro estudados, variou entre 96% e 100% (Tabela 3A). A menor identidade foi entre os isolados Cg027 e o isolado AM-1, ambos classificados como *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, com base nos testes de patogenicidade, contrariando os resultados esperados. Do mesmo modo, isolados de *C. gossypii* apresentaram 100% de identidade entre si, em apenas dois casos, ou seja, entre LP1020 e LP1015, e entre LP1015 e LPS1025. Os demais apresentaram entre 98% e 99% de identidade entre si. A identidade entre os isolados de *C. gossypii* e os de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* variou entre 97% e 100%. Os isolados LPS1015 e LPS1025 apresentaram 100% de identidade com 10 dos 17 isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. O isolado LPS1016 foi o único que variou entre 97% e 99% de identidade com os isolados causadores de ramulose, enquanto que os demais LPS apresentaram 100% de identidade com cinco dos 17 isolados de *C. gossypii*

var. *cephalosporioides*. Entre os isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, PF1b, PE-1 e PF-3a apresentaram 100% de identidade com 10 dos demais 16 isolados similares e o isolado AM-1 foi o mais divergente, não apresentando similaridade de 100% com nenhum dos outros isolados.

A identidade entre os isolados do gênero *Colletotrichum* estudados e a grande maioria dos pertencentes ao banco de dados variou entre 80% e 88%, mostrando uma clara distinção de espécie (Tabela 4A). As maiores identidades foram observadas com os isolados de mamoeiro, CGP1 (94%-96%) e CGP1.1 (95% – 97%) e isolados de mangueira, TSG003, TSG006 e CG84 (95% – 97%), BBA70072 (95%-96%), sugerindo uma possível similaridade com os isolados de algodão. A menor identidade foi observada com um isolado do mamoeiro, denominado BBA71367, que variou entre 72% a 76%. A identidade desse isolado com os demais isolados do banco de dados, inclusive com os de mamoeiro, o CGP1(75%) e o CGP1.1 (77%), foi também baixa, variando de 75% a 85% (Tabela 5A).

Examinando a árvore filogenética obtida com base nas seqüências de nucleotídeos da região ITS 1 (Figura 2), verifica-se que tanto os isolados *C. gossypii* como os de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* se localizaram dentro do mesmo grupo, indicando uma alta proximidade filogenética. Os isolados da mangueira e os do mamoeiro, com maior identidade, também ficaram reunidos no mesmo grupo. Os demais isolados localizaram-se em grupos distintos, tendo os isolados de *C. truncatum*, o CBS710.70, de tremoço e o BBA70710, de alfafa, ficado em grupamentos mais próximos, com os demais se distanciando em outros agrupamentos, com tendência de separação por hospedeiro. Esta especialização dentro e entre grupos de hospedeiros tem sido relatada por alguns autores (Denoyes-Rothan et al., 2003; Hiang & Goodwin, 2001; Sheriff et al., 1995).



FIGURA 2. Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 3.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%. UFLA, MG, 2005.

*Seqüências dos isolados pertencentes ao complexo do algodoeiro.

Como era de se esperar, o alinhamento dos nucleotídeos do gene 5,8S rDNA, dos 22 isolados estudados, mostrou uma alta similaridade (entre 98% e 100%) entre todos eles (Tabela 6A). O mesmo foi observado ao se comparar os isolados estudados com os do banco de dados (97% a 100%) (Tabela 7A), mostrando uma alta conservação dessa região, conforme já relatado por outros autores (Fungaro, 2002; Miller et al., 1999; Silva-Hanlin et al., 1999).

Na árvore filogenética obtida pelas seqüências de nucleotídeos do gene 5,8S rDNA, os isolados do algodoeiro se dividiram em dois grupos. Os isolados de *C. gossypii* e os de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* podem ser vistos juntos, tanto no primeiro como no segundo grupo (Figura 3).

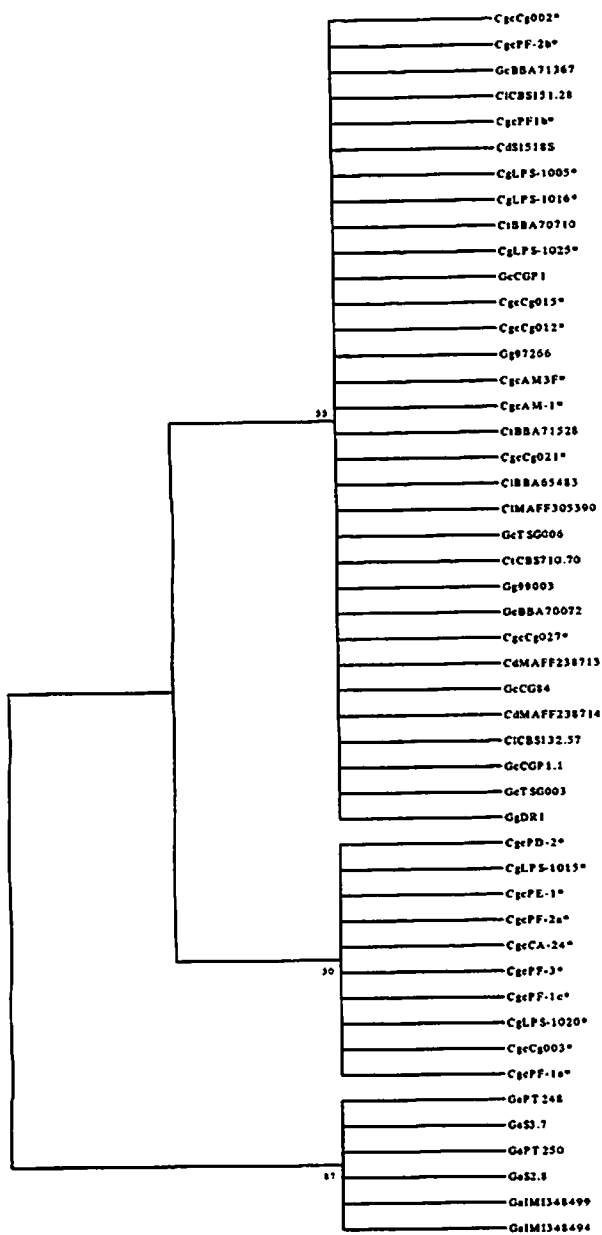


FIGURA 3. Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA. Os valores de *bootstrap* (UPGMA) foram obtidos por meio do programa MEGA versão 3.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%. UFLA, MG, 2005.

*Seqüências dos isolados pertencentes ao complexo do algodoeiro.

A região ITS 2 mostrou uma variabilidade ainda menor que a região ITS 1, nos 22 isolados estudados (Tabela 9A). Os únicos isolados que não mostraram 100% de identidade com os isolados restantes foram CG021, CG027, PF1b, PF-3A e AM-1, sendo todos de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Os demais, incluindo os isolados de *C. gossypii*, apresentaram 100% de identidade com os 16 demais isolados.

No alinhamento de nucleotídeos dos isolados estudados com os isolados do banco de dados, observou-se que a maior identidade ocorreu com o BBA70072 e o CG84, de *G. cingulata* da mangueira, tendo sido 100% com a maioria deles. Os outros isolados da mangueira, TG003 e TSG004 e os do mamoeiro, CGP1 e CGP1.1. do mamoeiro, também apresentaram a maioria das identidades acima de 95% (Tabela 10A).

Os isolados de *C. gossypii* e de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* provenientes do Brasil e Argentina, estudados por Bailey et al. (1996), apresentaram identidade entre 96% e 98% com os isolados utilizados neste estudo, pertencendo ao mesmo grupo, juntamente com os isolados da mangueira e mamoeiro.

Na árvore filogenética, observou-se, novamente, que os isolados causadores de antracnose e ramulose se reuniram no mesmo grupo, no qual se inseriram também os isolados da mangueira e do mamoeiro. A única exceção foi a do isolado PF 1b de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, que se agrupou separadamente dos demais (Figura 4).


A árvore filogenética mostra, também, que os demais isolados do banco tenderam a se agrupar de acordo com a espécie do fungo, com exceção do isolado BBA 71367 de *G. cingulata*, proveniente do mamoeiro, que se colocou entre os *C. lindemuthianum*. Como comentado anteriormente, esse isolado realmente apresentou uma menor identidade com os outros isolados do

mamoeiro, indicando ou a existência de um isolado bastante distinto ou a possibilidade de uma contaminação no momento do isolamento do fungo.

Como se pode observar, os isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, apesar de terem sido caracterizados com base na sua patogenicidade na planta de algodão, não apresentaram diferenças significativas nas regiões ITS1 e ITS2, que embasassem a sua classificação como variedade distinta. Isso poderia ser devido a duas causas distintas: os isolados são iguais e a diferença de reação da planta hospedeira poderia ser devido a outros fatores, como variabilidade genética da planta hospedeira, concentração e inóculo e condições ambientais, etc. Os isolados são diferentes, porém, existe uma alta conservação genética nas regiões ITS1 e ITS2, de modo que a sua seqüência de nucleotídeos não é adequada para fazer essa distinção.

No primeiro caso, a variabilidade genética da planta seria a opção mais plausível, pelo fato de ela ser propagada por meio de sementes, que são originadas de cruzamentos de plantas autógamas com alta porcentagem de alogamia. Isso poderia explicar os diferentes tipos de interação patógeno hospedeiro. Por outro lado, as condições ambientais poderiam ser praticamente descartadas se for considerado que, num mesmo campo, ocorrem, simultaneamente, antracnose e ramulose. Isso também descartaria a possibilidade de diferentes concentrações de inóculo, num ambiente sujeito às mesmas condições de disseminação.

No segundo caso, teria que assumir-se que as regiões ITS1 e ITS2 não podem ser empregadas para a separação de isolados de *Colletotrichum* nas variedades. Como se pode observar pela Figura 4, essa região tem se mostrado eficiente para fazer a separação entre espécies; entretanto, não se têm informações sobre o uso da seqüência nucleotídica dessas regiões na distinção de variedades de fungos da mesma espécie. Por outro lado, a falta de consistência na repetibilidade dos sintomas observados nos testes de patogenicidade, por diferentes autores, pode levar ao questionamento da real diferença entre os agentes causais da ramulose e da antracnose em algodoeiro.



Os estudos normalmente têm sido realizados com isolados obtidos diretamente de plantas hospedeiras, com sintomas característicos da doença, o que deveria garantir a capacidade de reprodutibilidade dos sintomas de ramulose e antracnose. Entretanto, os trabalhos já realizados, com o objetivo de separá-los, com base na sua patogenicidade, nem sempre têm fornecido resultados conclusivos.

Dudienas (1990) desenvolveu trabalhos com a finalidade de fazer caracterizações patológicas e culturais de isolados de *Colletotrichum*. Houve indicação de que os isolados relacionados à ramulose são deficientes em asparagina e ácido aspártico. Entretanto, essa não foi considerada uma conclusão definitiva. A autora observou também que a inoculação de ambos os isolados nas maçãs do algodoeiro induziram o mesmo tipo de sintoma, caracterizado pelo aparecimento de lesões necróticas.

Ottonello (1992) utilizou testes de patogenicidade, culturais e sorológicos para a caracterização e distinção dos dois isolados. Os resultados foram semelhantes aos obtidos por Dudienas (1990), em relação à deficiência de aminoácidos no agente causal de ramulose, mas encontrou também isolados intermediários entre os causadores de ramulose e antracnose. Os de patogenicidade e os sorológicos também não foram considerados eficientes. Com base nos resultados obtidos, essa autora defendeu a mudança da nomenclatura de *C. gossypii* para *C. gloesporioides* f.sp. *gossypii* raça 1, causadores de antracnose, menos agressivos, e raça 2, para causadores de ramulose, mais agressivos.

Chitarra (1996) utilizou polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) e análise morfológica de estruturas do patógeno. Não foi possível separar os isolados com base nos 15 *primers* utilizados, assim como as análises morfológicas também não foram completamente eficientes. Silva-Mann (2002), trabalhando com polimorfismo de comprimento de fragmentos

amplificados (AFLP), observou polimorfismo apenas em isolados que apresentavam-se bem típicos para as características morfológicas e de patogenicidade. Entretanto, em isolados com características intermediárias, não foram separados utilizando-se marcadores AFLP. Essa mesma dificuldade tem ocorrido em outros trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA (dados não mostrados).

Com os avanços da biologia molecular, novas técnicas têm sido desenvolvidas, permitindo o seqüenciamento genético do genoma completo, ou de parte dele, facilitando, assim, a distinção entre microrganismos e a sua classificação. Desse modo, com base na caracterização molecular dos fungos, a classificação antiga tem sido reformulada em diversos casos (Bailey et al., 1996; Hsiang & Goodwin, 2001). Sherrif et al. (1995) propuseram a separação entre espécies de *C. graminicola* que infectam o milho das que infectam o sorgo, com base no seqüenciamento genético da região ITS2.

Bailey et al. (1996) compararam a região ITS 2 de três isolados do complexo *Colletotrichum* do algodoeiro, sendo dois causadores de ramulose e um de antracnose. Estes autores observaram uma baixa variabilidade, o que os levou a concluir que eles eram praticamente idênticos e poderiam ser considerados como *formae speciales* de *C. gloeosporioides*.

Esses dados, aliados aos obtidos neste trabalho e ao fato de os isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* pertencerem ao mesmo grupo e apresentarem alta similaridade genética e morfológica, confirmando o relato de vários autores (Chitarra, 1996; Dudienas, 1990; Ottonello, 1992; Tanaka, 1995; Tanaka & Menten, 1988; Vieira, 1996), leva a questionar se, realmente, a variedade *cephalosporioides* seria um agente distinto, conforme foi estabelecido por Costa & Fraga (1937), no primeiro estudo da sintomatologia da ramulose.

4 CONCLUSÕES

1. Com base nas as regiões ITS 1 e ITS 2 rDNA de *Colletotrichum gossypii* e de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pertencem ao mesmo grupo filogenético.
2. Não é possível distinguir isolados causadores de ramulose dos causadores de antracnose com base nas seqüências das regiões ITS 1 e ITS 2 .
3. A região ITS 1 de *Colletotrichum gossypii* e de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* apresentou maior variabilidade que a região ITS 2.
4. Não houve correlação entre grupos genéticos, origem dos isolados e virulência.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J. A.; NASH, C.; MORGAN, L. W.; O'CONNELL, R. J.; TEBEEST, D. O. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 10, p. 1076-1083, Oct. 1996.
- CANO, J.; GUARRO, J.; GENÉ, J. Molecular and morphological indetification of *Colletotrichum* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 6, p. 2450-2454, June 2004.
- CARVALHO, L. P. . CAVALCANTE, F. B.; LIMA, E. P.; SANTOS, E. O. Influência da ramulose nas características de fibras e produção do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 593-598, out. 1984.
- 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) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças do algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 3, n. 3, p. 167-193, set./dez. 1977.
- CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, F. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. 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.
- DENOYES-ROTHAN, B.; GUÉRIN, G.; CHRISTOPHE, D.; SMITH, B. MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 2, p. 219-228, Feb. 2003.

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

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows Versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45. , 2000, São Carlos, SP. Programa e Resumos... São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia diagnóstico e análise de variabilidade. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 13, n. 14, p. 12-16, maio/jun. 2002.

HSIANG, T.; GOODWIN, P. H. ribosomal DNA sequence comparisons of *Colletotrichum graminicola* from turfgrasses and other hosts. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 6, p. 593-599, June 2001.

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 de São Paulo, Jaboticabal.

KULSHRESTHA, D. D.; MATHUR, S. B.; NEERGAARD, P. Identification of seed-borne species of *Colletotrichum*. **Friesia**, Copenhagen, v. 11, n. 56, p. 116-125, 1976.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment briefings in bioinformatics. Disponível em: <<http://www.megasoftware.net/>>. Acesso em; 2004.

MILLER, R. N. G.; QUEZADO-SOARES, A. M.; LOPES, C. Molecular comparison of *Fusarium* populations causing eumartii wilt and dry rot of potato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 149-155, jun. 1999.

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.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 1546 p.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; BAILEY, J. A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *Colletotrichum sublineolum*. **Mycological Research**, New York, v. 99, n. 4, p. 475-478, Apr. 1995.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; LAFAY, J. M.; BRYGOO, J.; BAILEY, J. A. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, San Diego, v. 18, n. 2, p. 121-138, June 1994.

SILVA-HANLIN, D. M. W.; MENEZES, M.; HANLIN, R. T.; RAMALHONETO, C. E. Ribosomal DNA sequencing data reveals low genetic variability among *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 534-539, dez. 1999.

SILVA-MANN, R. **Diversidade do complexo de *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares**. 2002. 146 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SREENIVASAPRASAD S.; MILLS, P. R.; MEEHAN, B. M.; BROWN, A. E. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 3, p. 499-512, June 1996.

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

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, MG.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na comunidade científica, de maneira geral, tem aumentado a preocupação com o desenvolvimento de métodos de manejo de doenças, a fim de reduzir custos de produção e conferir maior proteção ao ambiente. Nesse aspecto, as medidas baseadas na exclusão de patógenos são as que requerem menor custo e risco ao produtor. Assim, a utilização de sementes livres de patógenos é uma das medidas mais eficientes a fim de se evitar a entrada de patógenos em novas áreas de produção. Entretanto, a detecção de determinados patógenos ainda é limitada, seja pelo fato de os testes utilizados apresentarem limitação quanto à praticidade ou pelos microrganismos apresentarem características intermediárias, tornando sua identificação e distinção duvidosa.

Neste estudo, evidenciou-se o benefício da utilização de restrição hídrica para controle de germinação em teste de sanidade para detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, uma vez que isso permitiu melhor visualização das estruturas utilizadas na sua identificação. Entretanto, a incorporação dessa tecnologia ao sistema de controle de qualidade de sementes requer a condução de testes de aferição, em que o julgamento da eficácia do método é realizado por laboratórios já credenciados para este tipo de análise.

O estudo molecular aliado ao teste de patogenicidade apresentado neste trabalho, levou a um questionamento sobre a categoria intra-específica da espécie *C. gossypii* var. *cephalosporioides* também insustentável por vários outros autores. Permanece ainda a dúvida quanto a patogenicidade de isolados de *C. gloeosporioides* de mangueira e mamoeiro ao algodoeiro e se em determinadas condições ou variações do hospedeiro, os isolados considerados de antracnose podem causar sintomas típicos de ramulose. Assim, é recomendável que este estudo tenha continuidade, incluindo, outras sequências do DNA, como

exemplo, o fator de alongação, gene da β -tubulina, gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gpd) e outros.

ANEXOS

	Página
TABELA 1A	Resumo da análise de variância dos dados referentes ao <i>blotter test</i> modificado com 2-4-D e manitol. UFLA, Lavras, MG, 2005..... 76
TABELA 2A	Resumo da análise de variância dos dados referentes ao teste de patogenicidade dos isolados do complexo <i>colletotrichum</i> em algodoeiro. UFLA, Lavras, MG, 2005..... 76
TABELA 3A	Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA entre os isolados estudados. Lavras, MG, 2005..... 77
TABELA 4A	Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados. Lavras, MG, 2005..... 78
TABELA 5A	Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA entre os isolados publicados no banco de dados. Lavras, MG, 2005..... 79
TABELA 6A	Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA entre os isolados estudados. Lavras, MG, 2005..... 80
TABELA 7A	Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados. Lavras, MG, 2005..... 81
TABELA 8A	Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA entre os isolados publicados no banco de dados. Lavras, MG, 2005. 82
TABELA 9A	Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeo do espaço ITS 2 do rDNA entre os isolados estudados. Lavras, MG, 2005..... 83
TABELA 10A	Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do espaço ITS 2 do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados. Lavras, MG, 2005..... 84

TABELA 11A	Porcentagem de similaridade da seqüência nucleotídeos do espaço ITS 2 do rDNA entre os isolados estudados publicados no banco de dados. Lavras, MG, 2005.....	86
FIGURA 1A	Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região ITS1 do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados.....	88
FIGURA 2A	Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados.....	95
FIGURA 3A	Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região ITS2 do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados.....	100

TABELA 1A. Resumo da análise de variância dos dados referentes ao *blotter test* modificado com 2-4-D e manitol. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Fator de variação	GL	Quadrado médio				
		Características do micélio			Acérvulos	
		Cinza	Aéreo	Pouco denso	Longos	Não encobertos
Isolados	10	4708,40 **	5780 **	3746,13 **	3555,68 **	2663,63 **
Inibidores	1	10,22 ns	55,681 ns	16363,63 **	137,50 ns	9410,22 *
Blocos	3	43,56 ns	73,86 ns	395,45 ns	22,348 ns	804,16 ns
I + I	10	445,22 ns	78,18 ns	926,13 **	307,50 *	497,72 ns
Erro	63	272,92	154,02	257,35	98,53	504,16
CV (%)		22,61	14,50	34,77	10,93	34,60

** Teste F significativo a 1% de probabilidade

*Teste F significativo a 5% de probabilidade

TABELA 2A. Resumo da análise de variância dos dados referentes ao teste de patogenicidade dos isolados do complexo *colletotrichum* em algodoeiro. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Fator de variação	GL	Quadrado médio
Isolados	22	2,810277 **
Bloco	3	0,996377 *
Resíduo	33	0,337286
CV(%)		25,32

** Teste F significativo a 1% de probabilidade

*Teste F significativo a 5% de probabilidade

TABELA 3A. Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA entre os isolados estudados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1.CgC _{Cg002}	--																						
2.CgC _{Cg003}	100	--																					
3.CgC _{Cg012}	100	100	--																				
4.CgC _{Cg015}	100	100	100	--																			
5.CgC _{Cg021}	100	100	100	100	--																		
6.CgC _{Cg027}	98	98	98	98	98	--																	
7.CgC _{AM3F}	100	100	100	100	100	98	--																
8.CgC _{PF-1a}	99	99	99	99	99	97	99	--															
9.CgC _{PF1b}	100	100	100	100	100	98	100	99	--														
10.CgC _{PD-2}	99	99	99	99	99	97	99	100	99	--													
11.CgC _{PE-1}	100	100	100	100	100	98	100	99	100	99	--												
12.CgC _{PF-3}	100	100	100	100	100	98	100	99	100	99	100	--											
13.CgC _{PF-1c}	99	99	99	99	99	97	99	100	99	100	99	99	--										
14.CgC _{PF-2a}	99	99	99	99	99	97	99	100	99	100	99	99	100	--									
15.CgC _{PF-3a}	100	100	100	100	100	98	100	99	100	99	100	100	99	99	--								
16.CgC _{AM-1}	98	98	98	98	98	96	98	97	98	97	98	98	97	97	98	--							
17.CgC _{CA-24}	99	99	99	99	99	97	99	100	99	100	99	99	100	100	99	97	--						
18.CgLPS-1005	100	100	100	100	100	98	100	99	100	99	100	100	99	99	100	98	99	--					
19.CgLPS-1015	99	99	99	99	99	97	99	100	99	100	99	99	100	100	99	97	100	99	--				
20.CgLPS-1016	99	99	99	99	99	97	99	98	99	98	99	99	98	98	99	97	98	99	98	--			
21.CgLPS-1020	99	99	99	99	99	97	99	100	99	100	99	99	100	100	99	97	100	99	100	98	--		
22.CgLPS-1025	100	100	100	100	100	98	100	99	100	99	100	100	99	99	100	98	99	100	99	99	99	--	

TABELA 4A. Porcentagem de similaridade da sequência de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados. UFPA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	1.Cg	2.Cg	3.Cg	4.Cg	5.Cg	6.Cg	7.Cg	8.Cg	9.Cg	10.Cg	11.Cg	12.Cg	13.Cg	14.Cg	15.Cg	16.Cg	17.Cg	18.Cg	19.Cg	20.Cg	21.Cg	22.Cg	
23GdPT20	83	83	83	83	83	80	83	82	83	82	83	83	82	82	83	81	82	83	82	82	82	82	84
24GdPT28	83	83	83	83	83	80	83	82	83	82	83	83	82	82	83	81	82	83	82	82	82	82	84
25GdM14499	83	83	83	83	83	82	83	82	83	82	83	83	82	82	83	81	82	83	82	82	82	82	84
26GdM14694	83	83	83	83	83	82	83	82	83	82	83	83	82	82	83	81	82	83	82	82	82	82	84
27GdS17	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	82	83	83	83	83	83	83	85
28GdS28	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	82	83	83	83	83	83	83	85
29GdCCP1	96	96	96	96	96	94	96	95	96	95	96	96	95	95	96	94	95	96	95	95	95	95	96
30GdCCP1.1	97	97	97	97	97	95	97	96	97	96	97	97	96	96	97	95	96	97	96	96	96	96	96
31GdCBA71X7	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	73	75	75	75	75	72	75	76
32GdCSC003	97	97	97	97	97	95	97	96	97	96	97	97	96	96	97	95	96	97	96	96	96	96	97
33GdCSC006	97	97	97	97	97	95	97	96	97	96	97	97	96	96	97	95	96	97	96	96	96	96	97
34GdCBA7002	96	96	96	96	96	95	96	96	96	96	96	96	96	96	96	95	96	96	96	96	96	96	96
35GdCC084	97	97	97	97	97	95	97	96	97	96	97	97	96	96	97	95	96	97	96	96	96	96	96
36GdCIBS710.70	88	88	88	88	88	86	88	87	88	87	88	88	87	87	88	86	87	88	87	88	87	87	88
37C1bBA71528	87	87	87	87	87	86	87	86	87	86	87	87	86	86	87	85	86	87	86	87	86	86	86
38C1bBA70910	88	88	88	88	88	86	88	87	88	87	88	88	87	87	88	86	87	88	87	88	87	87	88
39CdMIAFF218714	86	86	86	86	86	85	86	85	86	85	86	86	85	85	86	84	85	86	85	86	85	85	86
40CdMIAFF2187110	86	86	86	86	86	85	86	85	86	85	86	86	85	85	86	84	85	86	85	86	85	85	86
CdS1518541	86	86	86	86	86	85	86	85	86	85	86	86	85	85	86	84	85	86	85	86	85	85	86
42Cg99003	87	87	87	87	87	86	87	86	87	86	87	87	86	86	87	86	86	87	86	87	86	86	86
43Cg97766	87	87	87	87	87	86	87	86	87	86	87	87	86	86	87	86	86	87	86	87	86	86	87
44Cg8081	88	88	88	88	88	86	88	87	88	87	88	88	87	87	88	86	87	88	87	88	87	87	88
45C1bBA65483	87	87	87	87	87	85	87	86	87	86	87	87	86	86	87	85	86	87	86	87	86	86	86
46C1CBS132.57	87	87	87	87	87	85	87	86	87	86	87	87	86	86	87	85	86	87	86	87	86	86	86
47C1CBS151.58	87	87	87	87	87	85	87	86	87	86	87	87	86	86	87	85	86	87	86	87	86	86	86
48C1MAFF003.90	84	84	84	84	84	83	84	83	84	83	84	84	83	83	84	83	83	84	83	84	83	83	83

TABELA 5A. Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos da região ITS 1 do rDNA entre os isolados publicados no banco de dados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48		
23G _{APT250}	---																											
24G _{APT248}	96	---																										
25G _{B1M0348499}	93	93	---																									
26G _{B1M1348494}	93	93	100	---																								
27G _{S3.7}	93	93	99	99	---																							
28G _{S2.8}	93	93	99	99	100	--																						
29G _{CCGP1}	83	84	84	84	84	84	---																					
30G _{CCGP1.1}	83	83	84	84	84	84	100	---																				
31G _{CBBA71367}	82	82	81	81	82	82	75	77	---																			
32G _{CTSG003}	84	85	84	84	84	84	98	98	76	---																		
33G _{CTSG006}	84	85	84	84	84	84	98	98	76	100	---																	
34G _{CBBA70072}	84	84	83	83	84	84	98	98	76	97	97	---																
35G _{CCG84}	83	81	83	83	84	84	98	98	78	96	96	96	---															
36Cl _{CBS710.70}	80	81	80	80	81	81	86	89	75	86	86	88	89	---														
37Cl _{BBA71528}	89	89	88	88	89	89	84	84	81	86	86	84	84	83	---													
38Cl _{BBA70710}	80	81	80	80	81	81	86	89	75	86	86	88	89	100	83	---												
39Cd _{MAFF238714}	90	90	89	89	90	90	85	85	79	85	85	83	86	83	93	83	---											
40Cd _{MAFF2387130}	90	90	89	89	90	90	85	85	79	85	85	83	86	83	93	83	100	---										
CdS1 ₅₁₈₅₄₁	90	90	88	88	88	88	85	84	79	86	86	84	84	81	100	81	94	94	---									
42G ₉₉₀₀₃	87	87	87	87	88	88	83	86	76	83	83	84	86	84	92	84	93	93	89	---								
43G ₉₇₂₆₆	87	87	87	87	88	88	83	86	76	83	83	84	86	84	92	84	93	93	89	100	---							
44G _{DRI}	86	86	84	84	85	85	85	86	77	86	86	84	86	84	92	84	93	93	91	99	99	---						
45Cl _{BBA65483}	87	87	90	90	90	90	87	87	85	87	87	86	87	85	85	85	88	88	85	88	88	88	88	88	88	---		
46Cl _{CBS132.57}	87	87	90	90	90	90	87	87	85	87	87	86	87	85	85	85	88	88	85	88	88	88	88	100	---			
47Cl _{CDS151.58}	87	87	90	90	90	90	87	87	85	87	87	86	87	85	85	85	88	88	85	88	88	88	88	100	100	---		
48Cl _{MAFF305390}	88	89	89	89	90	90	87	84	83	88	88	83	84	80	83	80	89	89	86	85	85	87	98	98	98	---		

TABELA 6A. Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA entre os isolados estudados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1.CgC _{g002}	--																						
2.CgC _{g003}	99	--																					
3.CgC _{g012}	100	99	--																				
4.CgC _{g015}	100	99	100	--																			
5.CgC _{g021}	100	99	100	100	--																		
6.CgC _{g027}	100	99	100	100	100	--																	
7.CgC _{AM3F}	100	99	100	100	100	100	--																
8.CgC _{PF-1a}	99	100	99	99	99	99	99	--															
9.CgC _{PF1b}	100	99	100	100	100	100	100	99	--														
10.CgC _{PD-2}	98	99	98	98	98	98	98	99	98	--													
11.CgC _{PE-1}	99	100	99	99	99	99	99	100	99	99	--												
12.CgC _{PF-3}	99	100	99	99	99	99	99	100	99	99	100	--											
13.CgC _{PF-1c}	99	100	99	99	99	99	99	100	99	99	100	100	--										
14.CgC _{PF-2a}	99	100	99	99	99	99	99	100	99	99	100	100	100	--									
15.CgC _{PF-3a}	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	--								
16.CgC _{AM-1}	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	--							
17.CgC _{CA-24}	99	100	99	99	99	99	99	100	99	99	100	100	100	100	99	99	--						
18.Cg _{LPS-1005}	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	--					
19.Cg _{LPS-1015}	99	100	99	99	99	99	99	100	99	99	100	100	100	100	99	99	100	99	--				
20.Cg _{LPS-1016}	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	--			
21.Cg _{LPS-1020}	99	100	99	99	99	99	99	100	99	99	100	100	100	100	99	99	100	99	100	99	--		
22.Cg _{LPS-1025}	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	--	

TABELA 7A. Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	1.Cgc	2.Cgc	3.Cg	4.Cgc	5.Cgc	6.Cgc	7.Cgc	8.Cgc	9.Cgc	10.Cgc	11.Cgc	12.Cgc	13.Cgc	14.Cgc	15.Cgc	16.Cgc	17.Cgc	18.Cg	19.Cg	20.Cg	21.Cg	22.Cg	
	Cc01	Cc02	Cc03	Cc04	Cc05	Cc07	AMF	FF-11	FF-12	FF-1	FF-1	FF-1	FF-1c	FF-2c	FF-3c	OS-1	CA-1c	FF-10c	FF-10c	FF-10c	FF-10c	FF-10c	FF-10c
23GaPT150	98	98	98	98	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
24GaPT248	98	98	98	98	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
25GaBa1348499	98	98	98	98	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
26GaBa1348494	98	98	98	98	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
27Gas1.7	98	98	98	98	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
28Gas2.3	98	98	98	98	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
29GcCGP1	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
30GcCGP1.1	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
31GcBBA71367	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
32GcTSG003	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
33GcTSG006	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
34GcBBA70072	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
35GcCGS4	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
36ClCBS710.70	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
37ClBBA71528	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
38ClBBA70710	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
39CdMAFF238714	99	98	99	99	99	99	99	98	99	98	98	98	98	98	99	99	98	99	98	99	98	99	99
40CdMAFF2387130	99	98	99	99	99	99	99	98	99	98	98	98	98	98	99	99	98	99	98	99	98	99	99
CdSI1518541	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
42Cg99003	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
43Cg97166	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
44CgDR1	99	98	99	99	99	99	99	98	99	98	98	98	98	98	99	99	98	99	98	99	98	99	99
45ClBBA65483	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
46ClCBS132.57	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
47ClCBS151.58	100	99	100	100	100	100	100	99	100	98	99	99	99	99	100	100	99	100	99	100	99	100	100
48ClMAFF205390	99	98	99	99	99	99	99	98	99	98	98	98	98	98	99	99	98	99	98	99	98	99	99

TABELA 8A. Porcentagem de similaridade da seqüência nucleotídeos do gene 5,8S do rDNA entre os isolados publicados no banco de dados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
23G _{apt250}	---																										
24G _{apt248}	100	---																									
25G _{IM1348499}	100	100	---																								
26G _{IM1348494}	100	100	100	---																							
27G _{S3.7}	100	100	100	100	---																						
28G _{S2.8}	100	100	100	100	100	---																					
29G _{C_{CGP1}}	98	98	98	98	98	98	---																				
30G _{C_{CGP1.1}}	98	98	98	98	98	98	100	---																			
31G _{C_{BBA71367}}	98	98	98	98	98	98	100	100	---																		
32G _{C_{TSG003}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	---																	
33G _{C_{TSG006}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	---																
34G _{C_{BBA70072}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	---															
35G _{C_{CG84}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	100	---														
36C _{t_{CBS710.70}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	100	100	---													
37C _{t_{BBA71528}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	100	100	100	---												
38C _{t_{BBA70710}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	---											
39C _{d_{MAFF238714}}	98	98	98	98	98	98	100	99	99	100	100	99	99	99	99	99	---										
40C _{d_{MAFF2387130}}	98	98	98	98	98	98	100	99	99	100	100	99	99	99	99	99	100	---									
CdS _{I_{518S41}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	---								
42C _{G₉₉₀₀₃}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	99	100	---							
43C _{G₉₇₂₆₆}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	99	100	100	---						
44C _{G_{DR1}}	98	98	98	98	98	98	99	99	99	100	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	---					
45C _{I_{BBA65483}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	99	100	100	100	99	---				
46C _{I_{CBS132.57}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	99	100	100	100	99	100	---			
47C _{I_{CBS151.58}}	98	98	98	98	98	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99	99	100	100	100	99	100	100	---		
48C _{I_{MAFF305390}}	98	98	98	98	98	98	100	99	99	100	100	99	99	99	99	99	100	100	100	99	99	99	99	99	99	99	---

TABELA 9A. Porcentagem de similaridade da seqüência de nucleotídeos do espaço ITS 2 do rDNA entre os isolados estudados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1.CgC _{Cg002}	---																						
2.CgC _{Cg003}	100	---																					
3.CgC _{Cg012}	100	100	---																				
4.CgC _{Cg015}	100	100	100	---																			
5.CgC _{Cg021}	98	98	98	98	---																		
6.CgC _{Cg027}	98	98	98	98	98	---																	
7.CgC _{AM3F}	100	100	100	100	98	98	---																
8.CgC _{PF-1a}	100	100	100	100	98	98	100	---															
9.CgC _{PF1b}	97	97	97	97	96	95	97	97	---														
10.CgC _{PD-2}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	---													
11.CgC _{PE-1}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	---												
12.CgC _{PF-3}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	---											
13.CgC _{PF-1c}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	100	---										
14.CgC _{PF-2a}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	100	100	---									
15.CgC _{PF-3a}	99	99	99	99	98	97	99	99	96	99	99	99	99	99	---								
16.CgC _{AM-1}	99	99	99	99	98	98	99	99	96	99	99	99	99	99	98	---							
17.CgC _{CA-24}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	100	100	100	99	99	---						
18.CgC _{LPS-1005}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	100	100	100	99	99	100	---					
19.CgC _{LPS-1015}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	100	100	100	99	99	100	100	---				
20.CgC _{LPS-1016}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	100	100	100	99	99	100	100	100	---			
21.CgC _{LPS-1020}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	100	100	100	99	99	100	100	100	100	---		
22.CgC _{LPS-1025}	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	100	100	100	99	99	100	100	100	100	100	---	

TABELA 10A. Porcentagem de similaridade da sequência de nucleotídeos do espaço ITS 2 do rDNA entre os isolados estudados e os isolados publicados no banco de dados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Isolados	1.Cg	2.Cg	3.Cg	4.Cg	5.Cg	6.Cg	7.Cg	8.Cg	9.Cg	10.Cg	11.Cg	12.Cg	13.Cg	14.Cg	15.Cg	16.Cg	17.Cg	18.Cg	19.Cg	20.Cg	21.Cg	22.Cg	
	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.	Sequ.
23CgIM182269	98	98	98	98	96	96	98	98	95	98	98	98	98	98	97	97	98	98	98	98	98	98	98
24CgIM180023	98	98	98	98	97	96	98	98	96	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
25CgIM1277115	98	98	98	98	97	96	98	98	96	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
26GaPT250	88	88	88	88	87	86	88	88	86	88	88	88	88	88	87	87	88	88	88	88	88	88	88
27GaPT248	89	89	89	89	87	87	89	89	87	89	89	89	89	89	88	88	89	89	89	89	89	89	89
28GaIM1348499	90	90	90	90	88	88	90	90	88	90	90	90	90	90	89	89	90	90	90	90	90	90	90
29GaS3.7	89	89	89	89	87	87	89	89	87	89	89	89	89	89	88	88	89	89	89	89	89	89	89
30GaS2.8	89	89	89	89	87	87	89	89	87	89	89	89	89	89	88	88	89	89	89	89	89	89	89
31GalIM1348494	90	90	90	90	88	88	90	90	88	90	90	90	90	90	89	89	90	90	90	90	90	90	90
32GcCGP1.1	96	96	96	96	94	94	96	96	93	96	96	96	96	96	95	95	96	96	96	96	96	96	96
33GcBBA71367	88	88	88	88	87	86	88	88	88	88	88	88	88	88	87	87	88	88	88	88	88	88	88
34GcCaPI	99	99	99	99	98	97	99	99	96	99	99	99	99	99	98	98	99	99	99	99	99	99	99
35GcTSG003	98	98	98	98	96	96	98	98	95	98	98	98	98	98	97	97	98	98	98	98	98	98	98
36GcTSG006	98	98	98	98	96	96	98	98	95	98	98	98	98	98	97	97	98	98	98	98	98	98	98
37GcBBA70072	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	100	100	100	99	99	100	100	100	100	100	100	100
38GcCG84	100	100	100	100	98	98	100	100	97	100	100	100	100	100	99	99	100	100	100	100	100	100	100
39CICBS710.70	91	91	91	91	90	89	91	91	89	91	91	91	91	91	89	91	91	91	91	91	91	91	91
40CIBBA71528	89	89	89	89	87	87	89	89	87	89	89	89	89	89	88	88	89	89	89	89	89	89	89
C4BBA70710	91	91	91	91	90	89	91	91	89	91	91	91	91	91	89	91	91	91	91	91	91	91	91
42CdMAFF238714	91	91	91	91	90	89	91	91	89	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91
43CdMAFF238713	91	91	91	91	90	89	91	91	89	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91
44CdS1518S	90	90	90	90	89	88	90	90	88	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
45CdG318S	89	89	89	89	88	87	89	89	86	89	89	89	89	89	88	88	89	89	89	89	89	89	89
46Gc99003	94	94	94	94	92	92	94	94	91	94	94	94	94	94	93	93	94	94	94	94	94	94	94
47Cg97266	94	94	94	94	92	92	94	94	91	94	94	94	94	94	93	93	94	94	94	94	94	94	94
48GcDRI	94	94	94	94	92	92	94	94	91	94	94	94	94	94	93	93	94	94	94	94	94	94	94

...Continua...

"TABELA 10A. Cont."

Isolados	1.Cg gen	2.Cg gen	3.Cg gen	4.Cg gen	5.Cg gen	6.Cg gen	7.Cg gen	8.Cg gen	9.Cg gen	10.Cg gen	11.Cg gen	12.Cg gen	13.Cg gen	14.Cg gen	15.Cg gen	16.Cg gen	17.Cg gen	18.Cg gen	19.Cg gen	20.Cg gen	21.Cg gen	22.Cg gen	
50CICBS132.57	85	85	85	84	83	85	85	85	84	85	85	85	85	85	84	84	85	85	85	85	85	85	85
51CICBS151.28	85	85	85	85	84	83	85	85	84	85	85	85	85	85	84	84	85	85	85	85	85	85	85
52CIMAFF305390	84	84	84	84	82	82	84	84	83	84	84	84	84	84	83	83	84	84	84	84	84	84	84

```

GaPT250          CTGAGTTACCGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
GaPT248          CTGAGTTACCGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
GaIMI348499     CTGAGTTACCGCTC--TATAACCCTTTGTGAACGTACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
GaIMI348494     CTGAGTTACCGCTC--TATAACCCTTTGTGAACGTACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
GaS3.7          CTGAGTTACCGCTC--TATAACCCTTTGTGAACATACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
GaS2.8          CTGAGTTACCGCTC--TATAACCCTTTGTGAACATACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
CgcCg012*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgLPS-1025*     ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcCg021*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcPE-1*        ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgLPS-1005*     ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcPF-1a*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATCCCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcPD-2*        ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATCCCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcPF-1c*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATCCCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcPF-2a*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATCCCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcCA-24*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATCCCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgLPS-1015*     ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATCCCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgLPS-1020*     ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATCCCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgLPS-1016*     ----GTTTACGCC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcPF1b*        ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcPF-2b*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcPF-3*        ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcAM3F*        ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcCg015*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcCg003*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcCg002*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcAM-1*        ----GTTTACGCTC--TACTACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54
CgcCg027*       ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAAC TGTGCTTCGGCGGGT 54

```

FIGURA 1A. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região ITS1 do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados. (“...Continua...”)

"TABELA 11A. Cont."

Isolados	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
47 _{O₉97266}	93	93	93	90	89	90	89	89	90	92	87	93	92	92	94	94	92	92	92	94	94	92	91	100	---						
48 _{G₈DR1}	93	93	93	90	89	90	89	89	90	92	87	93	92	92	94	94	92	92	92	94	94	92	91	100	100	---					
49 _{CIBBA65483}	84	84	84	86	87	86	84	84	86	83	90	85	83	83	85	84	85	81	85	80	80	82	80	84	84	84	---				
50 _{CICD132.57}	84	84	84	86	87	86	84	84	86	83	90	85	83	83	85	84	85	81	85	80	80	82	80	84	84	84	100	---			
51 _{CICBS151.28}	84	84	84	86	87	86	84	84	86	83	90	85	83	83	85	84	85	81	85	80	80	82	80	84	84	84	100	100	---		
52 _{CIMIAFF305390}	84	84	84	85	85	86	82	82	86	83	89	83	82	82	84	84	83	80	83	83	83	81	79	85	85	83	98	98	98	---	

GaPT250 CTGAGTTACCGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
 GaPT248 CTGAGTTACCGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
 GaIMI348499 CTGAGTTACCGCTC--TATAACCCTTTGTGAACAGTACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
 GaIMI348494 CTGAGTTACCGCTC--TATAACCCTTTGTGAACAGTACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
 GaS3.7 CTGAGTTACCGCTC--TATAACCCTTTGTGAACATACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
 GaS2.8 CTGAGTTACCGCTC--TATAACCCTTTGTGAACATACCT--AACCGTTGCTTCGGCGGGC 56
 CgcCg012* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgLPS-1025* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcCg021* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcPE-1* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgLPS-1005* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcPF-1a* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcPD-2* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcPF-1c* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcPF-2a* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcCA-24* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgLPS-1015* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgLPS-1020* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgLPS-1016* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcPF1b* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcPF-2b* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcPF-3* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcAM3F* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcCg015* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcCg003* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcCg002* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcAM-1* ----GTTTACGCTC--TACTACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54
 CgcCg027* ----GTTTACGCTC--TACAACCCTTTGTGAACATACCTACAACGTGTTGCTTCGGCGGGT 54

FIGURA 1A. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região ITS1 do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados. (“...Continua...”)

"FIGURA 1A. Cont."

GcCGP1 CTGAGTTACGCTC--TACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAAAGTGTGCTTCGGCGGGT 58
 GcCGP1.1 ----GTTTACGCTC--TACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAAAGTGTGCTTCGGCGGGT 54
 GcCG84 ----GTTTACGCTC--TATAACCCCTTTGTGAACATACCTATAAAGTGTGCTTCGGCGGGT 54
 GcTSG003 CTGAGTTACGCTC--TACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAAAGTGTGCTTCGGCGGGC 58
 GcTSG006 CTGAGTTACGCTC--TACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAAAGTGTGCTTCGGCGGGC 58
 GcBBA70072 ----GTTTACGCTC--TACAACCCCTTTGTGAACATACCTATAAAGTGTGCTTCGGCGGGT 54
 CtCBS710.70 ----GTTTACCGCTC--ATCAACCCCTTTGTGAACATACCT-TAACTGTTGCTTCGGCGGGT 53
 CtBBA70710 ----GTTTACCGCTC--ATCAACCCCTTTGTGAACATACCT-TAACTGTTGCTTCGGCGGGT 53
 CtBBA71528 ----GTTTACCGCTC--TACAACCCCTTTGTGAACATACCT--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 52
 CdS1518S CTGAGTTACCGCTC--TACAACCCCTTTGTGAACATACCT--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 56
 CdMAFF238714 CTGAGTTACCGCTC--TATAAACCCTTTGTGAACATACCT--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 56
 CdMAFF238713 CTGAGTTACCGCTC--TATAAACCCTTTGTGAACATACCT--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 56
 Gg990003 ----TTTACCGCTC--TACAACCCCTTTGTGAACATACCT--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 51
 Gg97266 ----TTTACCGCTC--TACAACCCCTTTGTGAACATACCT--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 51
 GgDR1 TCGAGTTACCGCTC--TACAACCCCTTTGTGAACATACCT--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 56
 C1BBA65483 ----GTTTACGCTC--TATAAACCCTTTGTGAACATACCA--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 52
 C1MAFF305390 CTGAGTTACGCTC--TATAAACCCTTTGTGAACATACCA--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 56
 C1CBS132.57 ----GTTTACGCTC--TATAAACCCTTTGTGAACATACCA--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 52
 C1CBS151.28 ----GTTTACGCTC--TATAAACCCTTTGTGAACATACCA--AACTGTTGCTTCGGCGGGC 52
 GcBBA71367 ----GTTTACCGCTCCTTATAAACCCTTTGTGAACATACCC-CAAAAGTTGCCCTCGGCGGGC 55
 ** *** * ***** * ** ***** ** ***** ** *****

GaPT250 AGGGGAAGCCCTTCGGGGGGAACCCCTCCCGGGCGCCGCCCC-ATCACGGGGCGGAGCG 115
 GaPT248 AGGGGAAGCCCTCCTGTTGGGGGACCCCTCCCGGGCGCCGCCCC-ATCACGGGGCGGAGCG 115
 GaIMI348499 AGGGGAAGCCCTCCTCGGGGGCTCCCTCCCGGGCGCCGCCCC-ATCACGGGGCGGAGCG 116
 GaIMI348494 AGGGGAAGCCCTCCTCGGGGGCTCCCTCCCGGGCGCCGCCCC-ATCACGGGGCGGAGCG 116
 GaS3.7 AGGGGAAGCCCTCCTCGGGGGCTCCCTCCCGGGCGCCGCCCC-ATCACGGGGCGGAGCG 116
 GaS2.8 AGGGGAAGCCCTCCTCGGGGGCTCCCTCCCGGGCGCCGCCCC-ATCACGGGGCGGAGCG 116
 CgcCg012* AGG----GTCCCC----GTGAC-CCTCCCGGGCTCCCGGC-CCCCGGGCGGTTCGGCG 103
 CgLPS-1025* AGG----GTCCCC----GTGAC-CCTCCCGGGCTCCCGGC-CCCCGGGCGGTTCGGCG 103

"FIGURA 1A. Cont."

CgcCg021* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcPE-1* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgLPS-1005* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcPF-1a* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcPD-2* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcPF-1c* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcPF-2a* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcCA-24* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgLPS-1015* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgLPS-1020* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgLPS-1016* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcPF1b* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcPF-2b* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcPF-3* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcAM3F* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcCg015* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcCg003* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcCg002* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcAM-1* AGG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 CgcCg027* AAG----GTCCCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CCCCCGGGCGGGTCGGCG 103
 GcCGP1 AGG----GTCTCC-----GCGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-TC--CGGGCGGGTCGGCG 105
 GcCGP1.1 AGG----GTCTCC-----GCGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-TC--CGGGCGGGTCGGCG 101
 GcCG84 AGG----GTCCCC-----GCGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-TC--CGGGCGGGTCGGCG 101
 GcTSG003 AGG----GTCTCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CC--CGGGCGGGTCGGCG 105
 GcTSG006 AGG----GTCTCC-----GTGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CC--CGGGCGGGTCGGCG 105
 GcBBA70072 AGG----GTCTCC-----GCGAC-CCTCCCGGCCTCCCGCC-CC--CGGGCGGGTCGGCG 101
 CtCBS710.70 AGGC--GTCCCCATAAAAGGACGTCTCCCGGCCCTCTCCCGTCCGCGGGTGGG---GCG 107
 CtBBA70710 AGGC--GTCCCCATAAAAGGACGTCTCCCGGCCCTCTCCCGTCCGCGGGTGGG---GCG 107
 CtBBA71528 AGAG--G-TTCCCTCGCGGAACCCCTCCCGGTGACGCCCT-----CACGGG-CGTGCGG 102
 Cds1518S AGAG--G-TTCCCTCGCGGAACCCCTCCCGGTGACGCCCT-----CACGGG-CGTGCGG 106

"FIGURA 1A. Cont."

CgLPS-1016* 163
 CgPF1b* 163
 CgPF-2b* 163
 CgPF-3* 163
 CgAM3F* 163
 CgCg015* 163
 CgCg003* 163
 CgCg002* 163
 CgAM-1* 163
 CgCg027* 163
 GcCGP1 165
 GcCGP1.1 161
 GcCG84 161
 GcTSG003 165
 GcTSG006 165
 GcBBA70072 161
 CtCBS710.70 167
 CtBBA70710 167
 CtBBA71528 161
 Cds1518S 165
 CdmAFF238714 168
 CdmAFF238713 168
 Gg99003 167
 Gg97266 167
 GgDR1 172
 ClBBA65483 149
 ClMAFF305390 153
 ClCBS132.57 149
 ClCBS151.28 149
 GcBBA71367 164

"Figura 1A. Cont."

GaPT250	TAATTA-	180
GaPT248	TAATTA-	180
GaIMI348499	TAATT--	180
GaIMI348494	TAATT--	180
GaS3.7	TAATT--	180
GaS2.8	TAATT--	180
CgcCg012*	TAATC--	168
CgLPS-1025*	TAATC--	167
CgcCg021*	TAATC--	168
CgcPE-1*	TAATC--	168
CgLPS-1005*	TAATC--	168
CgcPF-1a*	TAATC--	168
CgcPD-2*	TAATC--	168
CgcPF-1c*	TAATC--	168
CgcPF-2a*	TAATC--	168
CgcCA-24*	TAATC--	168
CgLPS-1015*	TAATC--	168
CgLPS-1020*	TAATC--	168
CgLPS-1016*	TAATC--	168
CgcPF1b*	TAATC--	168
CgcPF-2b*	TAATC--	168
CgcPF-3*	TAATC--	168
CgcAM3F*	TAATC--	168
CgcCg015*	TAATC--	168
CgcCg003*	TAATC--	168
CgcCg002*	TAATC--	168
CgcAM-1*	TAATC--	168
CgcCg027*	TAATC--	168
GcCGP1	TAATCA-	171
GcCGP1.1	TAATC--	166

"FIGURA IA. Cont."

GcCG84	TAATC--	166
GcTSG003	TAATCAA	172
GcTSG006	TAATCAA	172
GcBBA70072	TAATC--	166
CtCBS710.70	TAATC--	172
CtBBA70710	TAATC--	172
CtBBA71528	TAAT--	166
CdS1518S	TAATTA-	171
CdMAFF238714	TAATTA-	174
CdMAFF238713	TAATTA-	174
Gg99003	TAAT--	172
Gg97266	TAAT--	172
GgDR1	TAATTA	179
ClBBA65483	TAATC--	154
ClMAFF305390	TAGTCA-	159
ClCBS132.57	TAATC--	154
ClCBS151.28	TAATC--	154
GcBBA71367	TAATC--	169

** *

CgcCg003* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcPD-2* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcPF-1a* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcPE-1* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcPF-3* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcPF-1c* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcPF-2a* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcCA-24* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgLPS-1015* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgLPS-1020* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcCg002* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcCg012* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcCg015* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcCg021* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcCg027* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcAM3F* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcPF1b* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcPF-2b* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgcAM-1* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgLPS-1005* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgLPS-1016* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CgLPS-1025* AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 GcCGP1.1 AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 GcBBA71367 AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 GcBBA70072 AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 GcCG84 AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CtCBS710.70 AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60
 CtBBA71528 AAAACTTTTTAAACAACGGATCTCTTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA 60

FIGURA 2A. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene 5.8S do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados. (“...Continua...”)

"FIGURA 2A. Cont."

C1BBA65483	AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	60
CtBBA70710	AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	60
Gg99003	AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	60
Gg97266	AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	60
C1CBS132.57	AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	60
C1CBS151.28	AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	60
CdMAFF238714	-AAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	59
CdMAFF238713	-AAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	59
C1MAFF305390	-AAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	59
GcCGP1	-AAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	59
GcTSG003	--AACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	58
GgDR1	--AACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	58
GcTSG006	--AACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	58
CdS15185	-AAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	59
GaPT250	-AAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	59
GaPT248	-AAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	59
GaS3.7	AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	60
GaS2.8	AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	60
GaIMI348499	AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	60
GaIMI348494	AAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCGGCAATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCCGA	60

GcgCg003*	TAAGTAAATGTGAATTCGCAAAATTCATCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGGCC	119
GcgPD-2*	TAAGTAAATGTGAATTCGCAAAATTCATCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGGCC	119
GcgPF-1a*	TAAGTAAATGTGAATTCGCAAAATTCATCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGGCC	119
GcgPE-1*	TAAGTAAATGTGAATTCGCAAAATTCATCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGGCC	119
GcgPF-3*	TAAGTAAATGTGAATTCGCAAAATTCATCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGGCC	119
GcgPF-1c*	TAAGTAAATGTGAATTCGCAAAATTCATCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGGCC	119
GcgPF-2a*	TAAGTAAATGTGAATTCGCAAAATTCATCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGGCC	119
GcgCA-24*	TAAGTAAATGTGAATTCGCAAAATTCATCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGGCC	119

"FIGURA 2A. Cont."

CgLPS-1015* TAAGTAAATGTGAATTCGCAAAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgLPS-1020* TAAGTAAATGTGAATTCGCAAAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgCg002* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgCg012* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgCg015* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgCg021* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgCg027* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgCgAM3F* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgCgPF1b* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgCgPF-2b* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgCgAM-1* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgLPS-1005* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgLPS-1016* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CgLPS-1025* TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 GcCGP1.1 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 GcBBA71367 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 GcBBA70072 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 GcCG84 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CtCBS710.70 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CtBBA71528 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 CtBBA70710 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 Gg99003 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 Gg97266 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 ClBBA65483 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 ClCBS132.57 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 119
 ClCBS151.28 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 118
 CdMAFF238714 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 118
 CdMAFF238713 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 118
 ClMAFF305390 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 118
 GcCGP1 TAAGTAAATGTGAATTCGAGAATTTCA - GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTTGGCC 118

"FIGURA 2A. Cont."

GcCAM-1* CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 CgLPS-1005* CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 CgLPS-1016* CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 CgLPS-1025* CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 GcCGP1.1 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 GcBBA71367 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 GcBBA70072 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 GcCG84 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 CtCBS710.70 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 CtBBA71528 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 CtBBA70710 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 Gg99003 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 Gg97266 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 ClBBA65483 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 ClCBS132.57 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 ClCBS151.28 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 CdMAFF238714 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 CdMAFF238713 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 ClMAFF305390 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 158
 GcCGP1 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 157
 GcTSG003 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 158
 GgDR1 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 157
 GcTSG006 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 158
 Cds1518S CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 158
 GaPT250 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 157
 GaPT248 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 157
 GaS3.7 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 GaS2.8 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 159
 GaIMI348499 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 160
 GaIMI348494 CGCCAGCATTCGGGGGCATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTT- 160



GaPT250	TCAACCCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCC-CCACG--GTCGA-CGTGGGCCCTTAAA	56
GaPT248	TCAACCCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCC-CCACG--GCCGA-CGTGGGCCCTTAAA	56
GaIMI348499	--AACCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCC-CCACG--GCCGA-CGTGGGCCCTTAAA	54
GaIMI348494	--AACCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCC-CCACG--GCCGA-CGTGGGCCCTTAAA	54
GaS3.7	-CAACCCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCC-CCACG--GCACA-CGTGGGCCCTTAAA	55
GaS2.8	-CAACCCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCC-CCACG--GCACA-CGTGGGCCCTTAAA	55
GcIMI82269	--AACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGG-CC-CTACACGGCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
GcIMI80023	--AACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGG-CC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	53
GcIMI277115	--AACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGG-CC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	53
CgcPF-3*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcPF-2b*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcPF-2a*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgLPS-1015*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgLPS-1025*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcCg021*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcCg027*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcAM-1*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgLPS-1005*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgLPS-1020*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgLPS-1016*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcCA-24*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcPF-1c*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcPE-1*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcPD-2*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcPF-1a*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcAM3F*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcCg015*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcCg012*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcCg003*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
CgcCg002*	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55
GcBBA70072	-CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCC-CTACA--GCTGA-TGTAGGCCCTCAAA	55

FIGURA 3A. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região ITS2 do rDNA de isolados estudados e de isolados disponíveis no banco de dados. (“...Continua...”)

"FIGURA 3A. Cont."

CgcPF-2b* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcPF-2a* GGTAGTGGCGGACCTCCCGGAGCTCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgLPS-1015* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgLPS-1025* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcCg021* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcCg027* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcAM-1* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgLPS-1005* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgLPS-1020* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgLPS-1016* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcCA-24* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcPF-1c* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcPE-1* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcPD-2* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcPF-1a* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcAM3F* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcCg015* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcCg012* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcCg003* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcCg002* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 GcBBA70072 GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgcPF1b* GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 GcTSG003 GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 GcTSG006 GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 GcCgP1 GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 GcCg84 GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 GcCgP1.1 GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CtCBS710.70 GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 BBA70710 GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CtEBA71528 GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CdG318S GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 115
 Cds1518S GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 114
 CgMAFF238714 GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCCTCTTTGCGGTAGTAACTTTACGTCCTCG-CACITGGG 112

"FIGURA 3A. Cont."

GcPE-1* ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157
GcPD-2* ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157
GcPF-1a* ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157
GcAM3F* ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157
GcCg015* ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157
GcCg012* ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157
GcCg003* ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157
GcCg002* ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157
GcBBA70072 ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157
GcCgPF1b* ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157
GcTSG003 ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCC - AATTCGCCAAAGG---- 157
GcTSG006 ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCC - AATTCGCCAAAGG---- 156
GcCgP1 ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGG---- 158
GcCg84 ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGG---- 157
GcCGP1.1 ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGG---- 157
CtCBS710.70 ATCCGGAGGG-ACTCTAGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTACTAAG---- 156
BBA70710 ATCCGGAGGG-ACTCTAGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTACTAAG---- 156
CtBBA71528 ATCCGGAGGG-ATTCCTAGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTACTAAG---- 155
CdG318S ATCCGGAGGG-ATTCCTAGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTACTAAG---- 154
CdS1518S ATCCGGAGGG-ATTCCTAGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTACTAAG---- 152
CdMAFF238714 ATTCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCTAAATGGTTG 159
CdMAFF238713 ATTCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCTAAATGGTTG 159
Gc99003 ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCTAAATGGT-- 158
Gg97266 ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCTAAATGGT-- 158
GgDR1 ATCCGGAGGG-ACTCTTTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCTAAATGG-- 157
ClBBA65483 ACCCGAGGGCCTCTGCGCTAAAACCCCCCAATTTTCTAAATGG-- 159
ClCBS132.57 ACCCGAGGGCCTCTGCGCTAAAACCCCCCAATTTTCTAAATGG-- 159
ClCBS151.28 ACCCGAGGGCCTCTGCGCTAAAACCCCCCAATTTTCTAAATGG-- 159
ClMAFF305390 ACCCGAGGGCCTCTGCGCTAAAACCCCCCAATTTTCTAAATGGTTG 162
GcBBA71367 ATCCGGAGGG-ACTCTCTGCCGCTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAG---- 157

* *