



**MIRELLA FIGUEIRÓ DE ALMEIDA**

**DETECÇÃO E TRANSMISSÃO DE *Colletotrichum gossypii* var.  
*cephalosporioides* PELAS SEMENTES DE ALGODOEIRO E USO DE  
RFP PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO**

LAVRAS – MG

2012

**MIRELLA FIGUEIRÓ DE ALMEIDA**

**DETECÇÃO E TRANSMISSÃO DE *Colletotrichum gossypii* var.  
*cephalosporioides* PELAS SEMENTES DE ALGODOEIRO E USO DE  
RFP PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO**

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

Orientador

Dr. José da Cruz Machado

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Almeida, Mirella Figueiró de.

Detecção e transmissão de *Colletotrichum gossypii* var.  
*cephalosporioides* pelas sementes de algodoeiro e uso de RFP para o  
estudo de interação patógeno-hospedeiro / Mirella Figueiró de  
Almeida. – Lavras : UFLA, 2013.

104 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. Algodão. 2. Marcadores moleculares. 3. Transformação  
genética. 4. Ramulose. 5. Primers. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

**MIRELLA FIGUEIRÓ DE ALMEIDA**

**DETECÇÃO E TRANSMISSÃO DE *Colletotrichum gossypii* var.  
*cephalosporioides* PELAS SEMENTES DE ALGODOEIRO E USO DE  
RFP PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO**

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

APROVADA, 19 de Dezembro de 2012.

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning	UFLA
Dr <sup>a</sup> . Antonia dos Reis Figueira	UFLA
Dr. Mario Sobral de Abreu	UFLA
Dr <sup>a</sup> . Patrícia Gomes Cardoso	UFLA

Dr. José da Cruz Machado  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2012**

*Aos amores da minha vida, meu porto seguro, fontes de amor, luz e alegrias, meus pais Altair e Maria Elisabeth, meu irmão Leandro, que sempre me apoiaram e me ajudaram em todas as situações e que, muitas vezes, privaram-se de algumas coisas para me ajudar a ir ao encontro dos meus ideais; à minha cunhada Janine e à minha linda sobrinha Isabela, que chegou a exatos dois anos e que sinto por não estar perto acompanhando seu crescimento, é com eterna gratidão e amor que agradeço e*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Fitopatologia, ao Laboratório de Patologia de Sementes, pela oportunidade da realização deste trabalho. Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. José da Cruz Machado, por ter me aceitado como sua orientada, pelos valiosos ensinamentos, amizade e atenção que sempre me dedicou durante o doutorado.

Ao Professor Dr. Ludwig Henrich Pfenning, pela amizade, atenção e disposição em me ajudar desde o início. E por perceber e dar valor a minha dedicação e trabalho.

Ao professor Mario Sobral de Abreu e às professoras Dr<sup>a</sup>. Antonia dos Reis Figueira e Dr<sup>a</sup>. Patrícia Gomes Cardoso por terem aceitado fazer parte da banca examinadora.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

Aos antigos e mais novos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes, Luana Botelho, Ursula Abreu, Marcella Viana, Luiza Costa, Ângela Fátima, Maria Eloisa, Elenice, Nice, Mirian Salgado, Vivian Kawasaki, Christiano (Pepe), Bruno Moretti, Willian Zancan, Vinícius Borges, Rodrigo Pedrozo, Rayana Martins, Nadya Ciproso, Ana Flávia, Vanessa Cândido, Nayara, Luiz Eduardo, Vitor Henrique, Gustavo Coelho, Ivan Bonaretto, Francisco Alves, que ajudaram com tanta disposição para a realização deste trabalho e pela amizade.

Em especial, às minhas amigas e irmãs Carolina Siqueira, Iara Eleutéria, Carla Correa e Ellen Barrocasque nunca mediram esforços em me ajudar,

principalmente, nesta fase final do doutorado e, por estarem sempre dispostas a me dar um colo, agradeço de todo coração.

Às minhas amigas Sarah Costa, Flávia Mara, Nina Lins, Nara Edreira, Luciana Godinho, Gabrielen Dias e Clarice Soares que sempre estiveram dispostas a me ajudar e pelo carinho.

Aos amigos que conheci em Lavras e que, durante estes anos, fizeram parte da minha vida nos momentos de alegrias e tristezas, Natália Mertz, Marlon Marcon, Fabiano Carvalho, Tália Machado, Cristiane Rohde, Juliana Santos, Eder Isquierdo, Juliano Santos, Ilisandra Zanandrea, Janine Mendes, Glauco Teixeira, Fernanda Maia, Jader Maia, Lilian Abreu, Aline Vaz, Heloísa Oliveira, Valkíria Silva, Érica Beluti, Davi Bittar, Maria Clara, Marília Goulart, Érika Sayuri, Regiane Medice, Camila Castro, Cléo Chico, Guilherme Mourão, Mariana Abreu, Angélica Cristina, Kedma Matos, Nicelle Mendes, Adriano Alves, Eduardo Freire, Willian Terra, Gustavo Mateus, Henrique Ferro, Eudes Carvalho, Ana Beatriz, Ana Cristina, Vanessa Foresti, Roberto Lanna Filho, Fabiano Perina, Claudio Ogoshi, Márcia Toyota, Renata Canuto, Adriano Custódio e Helon Santos.

À minha linda e amada família, que sempre me apoiou e torceu por mim.

Às minhas amigas de Passo Fundo que, mesmo longe, sempre estiveram comigo em pensamento e sempre torceram por mim, Lia Romani, Cristiane Erpen e Fabiana Haubert.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

**Muito Obrigada!**

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	13
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1 Aspectos gerais sobre qualidade de sementes na cultura do algodoeiro.....	15
2.2 Ramulose do algodoeiro: etiologia e sintomatologia .....	17
2.3 Métodos convencionais e moleculares na diagnose de <i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> A. S. Costa em sementes de algodão.....	19
2.4 Transformação genética de fungos com marcadores GFP ( <i>Green fluorescent protein</i> ) e RFP ( <i>Red Fluorescent protein</i> ).....	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
CAPÍTULO 1 - TRANSMISSÃO DE <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> A PARTIR DE SEMENTES DE ALGODÃO .....	29
1 RESUMO .....	30
3 INTRODUÇÃO .....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1 Isolados fúngicos e inoculação das sementes.....	36
4.2 Avaliação da taxa de transmissão.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
6 CONCLUSÕES .....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
CAPÍTULO 2 - TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> COM O MARCADOR RFP ( <i>Red Fluorescent protein</i> ) .....	50
1 RESUMO .....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	59
4.1 Obtenção do isolado e do vetor de transformação.....	59
4.2. Obtenção e transformação dos protoplastos de <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> com RFP. ....	59
4.4 Seleção, verificação da estabilização e características dos transformantes ..	61

4.5 Patogenicidade e localização do fungo transformado em plântulas de Algodoeiro.....	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63
6 CONCLUSÕES .....	75
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
CAPÍTULO 3 - DETECÇÃO DE <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> POR MEIO DE PRIMERS ESPECÍFICOS EM SEMENTES DE ALGODOEIRO .....	80
1 RESUMO .....	81
3 INTRODUÇÃO .....	83
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	87
4.1 Obtenção dos isolados .....	87
4.2 Extração de DNA .....	88
4.3 Desenho de <i>primers</i> específicos e confirmação da homologia dos fragmentos amplificados com o gene <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (GAPDH).....	89
4.4 Teste de especificidade dos <i>primers</i> .....	89
4.5 Sensibilidade da reação de PCR utilizando os <i>primers</i> desenvolvidos em amostras de sementes para estabelecimento de protocolo.....	90
4.5.1- Inoculação das sementes.....	90
4.5.2 Extração de DNA de amostras de sementes.....	91
4.5.3 Amplificação da PCR .....	91
6 CONCLUSÕES .....	99
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	103

## RESUMO GERAL

A ocorrência de doença é uma das principais causas que condicionam o fracasso da cultura do algodão, em particular aquelas cujos agentes etiológicos são transmitidos por sementes. Entre as doenças de maior destaque na cultura do algodão no Brasil encontra-se a ramulose causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A. S. Costa. A transmissão deste patógeno por sementes a plântulas/plantas pode ser elevada, havendo citações de níveis de até 70 %. Entretanto, demonstração e quantificação deste processo em algodão não são encontradas de maneira conclusiva na literatura. A detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão tem sido alvo de inúmeros estudos até o momento, porém, a similaridade morfológica entre este fungo e *C. gossypii*, agente da antracnose, tem gerado dúvidas sobre a segurança e viabilidade dos testes desenvolvidos. Tendo em vista a necessidade de se desenvolver técnicas seguras de detecção desse fungo em amostras de sementes, mediante demanda dos atuais programas de certificação no país e, em razão do pouco conhecimento de que se dispõe sobre a transmissão do referido fungo por sementes de algodão, novos estudos tornam-se necessários. Neste trabalho, os objetivos foram quantificar a transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* a partir de sementes de algodão; otimizar um protocolo de transformação que utiliza o gene marcador tipo RFP; desenvolver metodologia de detecção deste fungo em sementes de algodão utilizando um par de *primers* específico para este organismo. Para avaliar a transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* as sementes foram inoculadas, artificialmente, pelo método de condicionamento fisiológico. A transmissão foi constatada tanto em plantas sintomáticas como em assintomáticas, sendo as taxas totais calculadas em condições favoráveis para a ocorrência da doença em questão. O protocolo para obtenção dos protoplastos, utilizado no estudo, foi eficaz para a produção de protoplastos de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, obtendo-se assim, isolados transformados e, foi possível, observar pela inoculação das sementes, a localização do patógeno nos tecidos das sementes, por meio de microscopia de fluorescência. Para a detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* desenvolveu-se um par de *primers* que se mostrou específico para o referido patógeno, quando comparado com outras espécies de fungos encontradas em sementes de algodão, entre patógenos e endófitos. Por estes estudos, ficou evidenciado que o protocolo de detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, em sementes de algodão, torna-se promissor para uso em programas de certificação e de vigilância sanitária vegetal no Brasil.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, transformação genética, *primers*, ramulose, algodão.

## ABSTRACT

The occurrence of disease is one of the main factors which cause serious losses in cotton crop, in particular those in which etiologic agents are seed-transmitted. Among those diseases ramulosis caused by *Colletotrichum gossypii* var *South. cephalosporioides* A. S. Costa may be considered one of the most devastating in Brazil. The transmission of this pathogen from seeds to emerging plants can be high, reaching levels up to 70%. Several studies have been conducted to evaluate the transmission process of the pathogen to emerging cotton plants, however, this kind of association has not been demonstrated and quantified conclusively. The detection of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* on cotton seeds has been subject of numerous studies, however, the morphological similarity between this fungus and *C. gossypii*, which is the agent of anthracnose, has brought doubts regarding the reliability and feasibility of the available tests. In this work the objectives were: demonstration and quantification of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* transmission in cotton seeds; optimization of a protocol to transform the fungus with a RFP gene; development of a methodology to detect this organism in cotton seeds using specific primers previously developed for this pathogen. To assess the transmission *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, the seeds were artificially inoculated by the osmotic conditioning method, by which seeds are kept in contact with the fungus colonies for 36, 72 and 108h. The transmission was observed in both asymptomatic and symptomatic plants and the total transmission rates being calculated for favorable conditions for ramulose occurrence. The protocol to transform the fungus with RFP gene marker was suitable for production of protoplasts and to carry on studies on the colonization of cotton seeds by the. For the detection of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* the pair of primers which was designed for that aim proved to be specific in comparison with other fungal species associated to cotton seeds. In general, the protocol established for detection of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* in cotton seeds stands up as quite promising for incorporation by official seed testing as demanded by Certification and Phytosanitary Programs.

Keywords: molecular markers, genetic transformation, primer, ramulose, cotton.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é considerado uma das culturas mais importantes do Brasil, em virtude da utilização de sua fibra, óleo e outros subprodutos e, ainda, pelo grande volume de produção obtido. O Brasil é o quinto maior produtor, sendo a região centro-oeste a responsável pela maior parte da produção nacional.

Embora alguns avanços, do ponto de vista tecnológico, tenham sido alcançados na cultura do algodão, o desempenho médio nacional desta espécie, ainda, continua baixo, quando comparado a outros países. Este fato pode ser explicado, em face da alta sensibilidade do algodão e a ação conjugada de vários fatores bióticos e abióticos.

A qualidade da semente é um dos importantes fatores que condicionam o sucesso ou o fracasso de uma planta em campo. O controle desta qualidade envolve tanto ações governamentais quanto do setor privado. Outro fator importante que condiciona o sucesso ou fracasso, em qualquer cultura, é a incidência de pragas e doenças.

As sementes, além de serem um veículo de informações genéticas responsáveis por levar características agronômicas ao campo, são, também, consideradas o principal veículo de disseminação de grande número de patógenos considerados de risco dentro ou entre países como é o caso dos fungos *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*, agentes etiológicos da ramulose e antracnose, respectivamente, do algodão.

No Brasil, o agente causal da ramulose do algodão tem causado prejuízos dos mais elevados, sendo ele já caracterizado como uma praga não quarentenária regulamentada (PQNR), o que exige o estabelecimento de padrões sanitários para o mesmo em sementes. Isto faz com que métodos seguros e

precisos de detecção do referido patógeno sejam disponibilizados ao sistema de produção.

Com isso, percebe-se que há necessidade de se contar com métodos de detecção para uso em análise de rotina, que preencham os requisitos de maior precisão, rapidez e baixos custos, havendo uma tendência na atualidade de lançar mão de marcadores que tornem o método mais específico e mais seguro.

Mais recentemente, estudos desenvolvidos no Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, baseado no uso de *primers* desenvolvidos de regiões genômicas ITS, B-Tubulina e GAPDH, revelaram que o uso de alguns desses marcadores possibilitou distinguir o agente da ramulose do agente causador da antracnose do algodão.

Com base nestes resultados, os estudos foram focados em desenvolver metodologia de detecção do fungo em questão por meio de técnicas moleculares.

A dinâmica de transmissão, via sementes dos membros do complexo *Colletotrichum* em algodão, tem sido um dos temas mais complexos e pouco esclarecidos em nossas condições. Neste trabalho, especial atenção foi dada à aplicação de técnicas inovadoras de estudo das relações patógeno-semente, como os marcadores gênicos tipo “*Red fluorescent protein*” (RFP). Até o momento, o uso desses marcadores em estudos de Patologia de Sementes representa um desafio para a área, havendo uma grande expectativa pelo seu uso, uma vez que possibilita acompanhar a dinâmica e rota de acesso dos patógenos a partir de sementes com inóculo infectivo.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Aspectos gerais sobre qualidade de sementes na cultura do algodoeiro**

O algodoeiro é uma cultura de grande expressão econômica para o Brasil., tendo sido estimado o plantio na safra 2011/12 de uma área de 1.361,8 mil hectares com produção de caroço em torno de 3.183,5 mil toneladas e de pluma de 1.934,1 mil toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2012). Esses valores demonstram a importância da cultura para o país, tanto pela sua participação expressiva no contexto sócio-econômico, gerando divisas pela exportação e como atividade que emprega um crescente número de mão de obra nas diferentes etapas de seu cultivo e distribuição final aos consumidores.

A exemplo de qualquer lavoura de espécies cultivadas, o estabelecimento de populações de algodão, com padrão uniforme e saudável, é o primeiro passo para se obter sucesso na produção. A obtenção de uma população de plantas adequada, por sua vez, está intimamente ligada à utilização de sementes de alta qualidade. A qualidade das sementes de algodão pode ser influenciada por diversos fatores, que podem ocorrer no campo, antes e durante a colheita e, por outros que podem ocorrer no período pós-colheita, podendo se estabelecer pelas etapas seguintes de produção, tais como o beneficiamento, deslintamento e armazenagem. O controle de qualidade envolve ações governamentais como, implantação de uma legislação específica, estabelecimento de padrões mínimos de qualidade, regulamentação para certificação e análises laboratoriais e do setor privado, que se organiza em associações estaduais, cooperativas, para que os programas de produção de sementes sejam monitorados, a fim de garantir a pureza genética e as qualidades física, fisiológica e sanitária das sementes (MACHADO, 2012). Esse sistema

coordenado de ações do governo e do setor sementeiro visa assegurar que apenas sementes de qualidade sejam comercializadas (BRUNETTA; BRUNETTA; FREIRE, 2011).

Alguns cuidados devem ser tomados, antes do plantio, como a escolha da variedade ou cultivar, escolha da região e área, sendo a área livre de infestações de ervas daninhas, pragas e patógenos que acarretam dificuldades de cultivo e de colheita e, também, comprometem, significativamente, a qualidade da fibra. A incidência de pragas e doenças, ao lado do aspecto de viabilidade da semente depende em grande parte do histórico da área em que foi produzida. Por essa razão, recomenda-se a instalação de campos, para multiplicação de sementes, em locais de boa fertilidade e livres de doenças e pragas de importância econômica, transmissíveis pelas sementes, como é o caso da ramulose causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A.S. Costa e o bicudo do algodoeiro - *Anthonomus grandis*, ou em áreas provenientes de rotação de culturas, prática esta que reduz, substancialmente, o inóculo de doenças e a disseminação de pragas específicas do algodoeiro (BRUNETTA; BRUNETTA; FREIRE, 2011).

A seleção da semente pura da variedade que se pretende multiplicar é o primeiro passo para a obtenção de sementes de alta qualidade. As sementes destinadas aos campos de multiplicação devem ser adquiridas de entidades (públicas ou privadas) idôneas, devidamente registradas no Ministério da Agricultura. É importante que o lote de sementes de classe superior apresente elevada percentagem de germinação, vigor e o mínimo possível de qualquer praga ou patógeno. A qualidade das sementes, normalmente, é atestada por Boletins de Análise expedidos por laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura (BRUNETTA; BRUNETTA; FREIRE, 2011).

A produção e controle de qualidade de sementes de algodão são aspectos alvos de programas oficiais no Brasil, pelos quais padrões de campo e

laboratório são propostos com abrangência nacional. Especificamente para padrões sanitários de sementes, alguns índices têm sido propostos, para alguns patógenos do algodão, entre eles encontram-se *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. Atualmente, estes padrões fixados em zero, ainda, não foram implementados.

## **2.2 Ramulose do algodoeiro: etiologia e sintomatologia**

Entre as doenças de maior destaque na cultura do algodão no Brasil, encontra-se a ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* A.S. Costa. Trata-se de um organismo que faz parte do complexo *Colletotrichum* que se associa ao algodão. Membros deste complexo, onde está incluída a espécie *Colletotrichum gossypii*, agente causal da antracnose, pertencem ao Filo Ascomycota, cuja característica principal é a produção de massa conidial de coloração geralmente alaranjada em acérvulos. Muitas espécies desse gênero causam antracnose ou manchas em uma ampla gama de plantas cultivadas de importância econômica e, também, em plantas ornamentais (BAILEY; JEGER, 1992; MENEZES, 2006).

Tanto *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* como *Colletotrichum gossypii* pode causar doenças em qualquer fase de desenvolvimento das plantas de algodão e são encontrados, predominantemente, em tecidos acima do solo, no entanto, os órgãos subterrâneos, tais como raízes e tubérculos, também, podem ser afetados. Em razão destes fatores, ambos os fungos podem causar danos, economicamente, significativos (PRUSK; FREEMAN; DICKMAN, 2000).

A ramulose do algodoeiro, causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, foi relatada pela primeira vez no município de Rancharia-SP,

em 1936. Diferentemente dos sintomas de antracnose, causados por *Colletotrichum*, a variedade *cephalosporioides* foi descrita por Costa & Fraga Jrem 1937, associada ao sintoma de superbrotamento (VIÉGAS, 1946).

Atualmente, a doença já se encontra disseminada por todas as regiões do Brasil, nas quais se cultiva o algodão e vem causando danos nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e em algumas localidades do Nordeste brasileiro. Ocorre, também, nos Estados de São Paulo e do Paraná. Fora do Brasil, foi relatada somente na Venezuela e Paraguai (CIA; SALGADO, 2005).

A ramulose pode afetar plantas em qualquer fase de desenvolvimento, principalmente, em tecidos jovens. Os sintomas diretos aparecem primeiramente nas folhas novas, tanto na haste principal como nas laterais, na forma de manchas necróticas, mais ou menos circulares, quando situadas no limbo entre as nervuras, e alongadas, quando no sentido longitudinal. O tecido necrosado tende a formar perfurações com formas angulosas sendo reconhecidas como “mancha estrelada”. As lesões, principalmente das nervuras, acarretam o desenvolvimento desigual dos tecidos foliares, ocasionando o enrugamento da superfície do limbo. O fungo afeta o meristema apical provocando sua necrose, o que estimula o desenvolvimento dos brotos laterais, conferindo à planta um aspecto de superbrotamento ou envassouramento com ramos e entrenós curtos e contorcidos, o que reduz o porte da planta Costa, Fraga Júnior (1937) citado por Suassuna e Coutinho (2011).

Quando a doença afeta plantas jovens, as gemas terminais dos ramos com superbrotamento podem sofrer novas infecções e, ao morrerem, estimulam o desenvolvimento de novas gemas. Esse carrear de energias para o crescimento vegetativo, em resposta à sucessiva destruição das gemas apicais, exaure completamente a planta para a finalidade de frutificação. Plantas doentes podem ser, então, facilmente distinguidas das sadias, pela queda de folhas e a produção de um grande número de capulhos abertos, além de produção de densa massa de

folhagem escura. Normalmente, observam-se, na parte inferior de plantas com muitos sintomas, algumas folhas mais desenvolvidas, de coloração verde mais escura e aspecto coriáceo ou quebradiço.

A manifestação tardia da doença originou a denominação ramulose tardia de sintomas muito semelhantes, plantas doentes apresentam o superbrotamento só no ápice (CARVALHO et al., 1978; CIA; SALGADO, 2005).

A principal via de disseminação do agente da ramulose é a semente, por meio da qual o patógeno pode ser veiculado externamente, na forma de conídios, ou internamente, na forma de micélio dormente. O fungo pode, ainda, sobreviver em restos culturais. Veiculado pela semente ou presente no solo em restos culturais, o inóculo primário causa lesões primárias em algumas plantas que vão servir como fonte de inóculo secundário. Lesões secundárias ocorrem nas plantas adjacentes propagando-se rapidamente, formando reboleiras (CIA; SALGADO, 2005). O progresso da incidência e da severidade da doença é influenciado pelo nível de inóculo nas sementes (ARAÚJO, 2004).

Após o estabelecimento do patógeno na área de cultivo, sua dispersão ocorre, principalmente, por meio de respingos de chuva. Os ciclos secundários da doença são favorecidos por chuvas intensas, temperaturas entre 25 °C e 30 °C e umidade relativa acima de 80% (MIRANDA; SUASSUNA, 2004). A sobrevivência do patógeno no solo em restos culturais é de até nove meses, o que garante novas infecções em caso de plantios sucessivos (ARAÚJO et al., 2003).

### **2.3 Métodos convencionais e moleculares na diagnose de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* A. S. Costa em sementes de algodão**

Mesmo em países onde se empregam testes de sanidade de sementes como rotina, considera-se o seu nível de desenvolvimento ainda insatisfatório

para um grande número de patógenos. Por exemplo, a detecção de fungos pelos métodos de incubação, utilizados em rotina de laboratório em todo o mundo, ainda, requer o exame individual de sementes no microscópio, o que torna esta prática vulnerável, em função de variações que ocorrem com os organismos alvos da análise nas condições dos testes (VIEIRA, 1996). O problema se torna mais complexo quando se considera a diferenciação entre espécies com características próximas. Ainda mais complexo se torna a tarefa de diferenciar formas variantes, como raças patogênicas e “*formae specialis*” por meio somente da observação em microscópio.

A diferenciação entre espécies de fungos fitopatogênicos, em culturas axênicas é, convencionalmente realizada, em sua maioria, por meio da observação de características morfológicas e fisiológicas (ELLIS, 1971; 1976; BARNETT; HUNTER, 1986).

Os critérios utilizados para a detecção de fungos em sementes seguem as regras aprovadas pela International Seed Testing Association (ISTA) e, em sua maioria, consistem em estimular os microrganismos a produzirem estruturas típicas de cada fungo, formadas sobre ou ao redor das sementes que permitam a sua identificação, por meio do *blotter test* ou teste de incubação em substrato de papel de filtro embebido em meio de cultura (NEERGAARD, 1979; ISTA, 1981; MACHADO; LANGERAK, 1993; 2002).

Para a detecção de fungos que exibem variações em níveis de “*formae specialis*”, raças patogênicas e variedades, alguns trabalhos têm sido voltados para a utilização de substratos seletivos ou utilização de técnicas moleculares que analisam o perfil proteico ou DNA do organismo que indica a grande potencialidade do uso dessas técnicas em programas de certificação de sementes e de quarentena vegetal (VIEIRA, 1996; VIEIRA; MACHADO, 2002).

Atualmente, percebe-se que, ainda, há necessidade de se contar com métodos de detecção para uso em análise de rotina, que preencham os requisitos

de maior precisão, rapidez e baixos custos, havendo uma tendência na atualidade de lançar mão de marcadores que tornem o método mais específico e mais seguro.

Um exemplo dessa necessidade de métodos de detecção rápidos e precisos é a detecção e diferenciação do complexo *Colletotrichum* em sementes de algodão. *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* são transmitidos pela semente e são morfológicamente semelhantes e, portanto, sua distinção é extremamente difícil (MEHTA; MEHTA, 2010). Um alto grau de precisão na identificação destes patógenos é necessário para que apenas os lotes de sementes livres da presença dos mesmos sejam liberados para o plantio.

Tanaka, Menten e Machado (1996) realizaram um estudo sobre a diagnose de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, considerando o hábito de crescimento dos fungos em sementes de algodoeiro. Estes autores observaram que não houve variação no hábito de crescimento dos isolados de cada patógeno. Chitarra (1996), estudando características de 30 isolados de *Colletotrichum* associados às sementes de algodão 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.

Pela caracterização patogênica, observa-se intensa variação de agressividade entre isolados do complexo *Colletotrichum* associado ao algodão (SILVA-MANN et al., 2002), 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. Até o momento, não foram realizados estudos mais aprofundados envolvendo os processos de infecção desses agentes.

Técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas para a diferenciação e determinação de variabilidade genética de um grande número de fungos e outros agentes fitopatogênicos.

Em estudo realizado por Silva-Mann et al. (2002), marcadores RAPD e AFLP não se mostraram eficientes para a distinção dos isolados de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Carvalho (2005), estudando as regiões ITS 1, ITS 2 e o gene 5,8 S do DNA ribossomal de dezessete isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e cinco isolados de *Colletotrichum gossypii* não encontrou, também, diferença entre os dois agentes.

Mehta e Mehta (2010), por meio das técnicas moleculares de RAPD, ERIC- e REP-PCR da região ITS rDNA para verificar a variabilidade genética entre *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* demonstraram que existem diferenças genéticas entre os isolados provenientes das sementes e aqueles provenientes de parte aérea, e esses dois grupos foram claramente distintos.

Segundo Glass e Donaldson (1995), genes conservados como histonas 3 e histonas 4, beta-tubulina e plasma membrana ATPase podem ser usados com sucesso em estudos de filogenia e análise do genoma de Ascomycetos e Deuteromycetos para diferenciação entre espécies por meio de PCR.

Em recente estudo realizado por Salustiano et al. (2012), utilizando métodos filogenéticos, confirmou-se que a ramulose e a antracnose do algodoeiro são causados por dois agentes patogênicos distintos e pertencem ao complexo *Colletotrichum gloeosporioides*. Neste trabalho, isolados de ambos os fungos do referido complexo e outras espécies deste gênero, foram comparados por meio de diferentes genes com regiões recomendadas para estes fungos, e com o uso de regiões específicas de sequências dos genes B tubulina e GAPDH foi possível separar estes organismos.

Dessa forma, postula-se que, por meio desses genes e, possivelmente outros ainda não estudados, seja possível diferenciar estes organismos, e isto pode tornar-se uma ferramenta de grande utilidade na tarefa de diferenciá-los em análises de rotina para diferentes finalidades.

#### **2.4 Transformação genética de fungos com marcadores GFP (*Green fluorescent protein*) e RFP (*Red Fluorescent protein*)**

Além dos marcadores moleculares que surgem para auxiliar na identificação, quantificação e diferenciação de fungos fitopatogênicos e outros organismos nocivos com características morfológicas semelhantes, como é o caso dos patossistemas em foco, também, estão sendo utilizados marcadores proteicos do tipo GFP (*Green fluorescent protein*) e RFP (*Red Fluorescent protein*), dentre outros, cujo alvo é a transformação genética desses organismos com o intuito de auxiliar nos estudos dos mecanismos de transmissão dos mesmos por meio das sementes.

Diversos são os marcadores genéticos, utilizados na transformação de microrganismos na atualidade, mas muitos empregam técnicas onerosas, que podem ocasionar modificações indesejadas nos organismos em estudo. Entretanto, os marcadores moleculares GFP e RFP, que codificam a proteína fluorescente verde e vermelha, respectivamente, aparecem como opção valiosa para estudos sobre a interação de agentes patogênicos em plantas (CHALFIE, 1994). Atualmente, já foram desenvolvidos muitos variantes do *gfp* por meio de mutações que induzem à substituição dos nucleotídeos que codificam vários aminoácidos. Este tipo de marcador apresenta inúmeras vantagens, como a não descaracterização do isolado transformado em relação à sua natureza original.

Atualmente, na literatura, são encontrados relatos sobre a transformação de diversos fungos, havendo para cada espécie a necessidade de ajustes nos

protocolos utilizados. Para que a concentração de GFP na célula seja satisfatória, a escolha do promotor e da metodologia empregada para fazer a transformação da célula deve ser otimizada para cada tipo de célula com que se está trabalhando (LORANG et al., 2001; BALINT- KURTI; MAY; CHURCHILL, 2000).

Para alguns patossistemas de importância para a agricultura em geral, protocolos de transformação gênica com marcadores proteicos têm sido desenvolvidos e muitos têm sido usados com sucesso para diferentes espécies de fungos. No caso do algodão, estudos recentes desenvolvidos por Pedrozo (2009) com o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* demonstraram a eficácia desta técnica, sendo esta ferramenta de grande valor para o conhecimento mais detalhado das relações entre este fungo e sementes de algodão.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.E.; FREITAS,J.S.; SUASSUNA, N.D.; FARIAS, F.J.C. Sobrevivência de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em restos de cultura no solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4, 2003, Goiânia. Algodão, um mercado em evolução – Anais ... Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. Disponível em [http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba4/182.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba4/182.pdf)

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.

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.

BALINT-KURTI, P. J.; MAY, G. D.; CHURCHILL, A. C. L. Development of a transformation system for Mycosphaerella pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 9-15, Dec. 2001.

BARNETT,H.L. & HUNTER B.B. *Illustrated Genera of Imperfecti Fungi*, 4th ed. Mac Millan Publish.Co. N.York, 1986.

BRUNETTA, E; BRUNETTA, P.S.F. & FREIRE, E.C. Produção de Sementes de Algodão. 413-438p. In: Algodão no Cerrado do Brasil/ Associação Brasileira dos Produtores de Algodão – ABRAPA. 2 edição revisada e ampliada – Aparecida de Goiânia - GO: Mundial Gráfica, 2011. 1082p.

CARVALHO, E. M. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* associados a sementes do algodoeiro: aspectos morfológicos e moleculares.** 2005. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

CARVALHO, Y. ;MORAES, J.D.; CALIL, F. PACHECO, Q. I. *aspectos epidemiológicos da ramulose (*Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa) do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.).* Pesquisa Acropecuária Tropical, v. 8, n. 1, jan./dez. 1978.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein a marker for gene expression. **Science**, New York, v. 263, n. 5148, p. 802-805, Feb. 1994.

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 (*Gossypium* spp.) In: Manual de Fitopatologia/edição de Hiroshi kimati [et al.] 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 41-52p.663p.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento.Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento**, maio 2012 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/> .Acesso em 2012.

ELLIS, M.B. *More Dematiaceous Hyphomycetes*, C.A.C. Kew,UK, 1976.

ELLIS,M.B. *Dematiaceous Hyphomycetes*, C.A.B. Kew, UK, 1971.

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

ISTA - *INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION*, Handbook on seed health testing, Zurich, 1981. n.p. ( Working sheedts, section 2)

LORANG, J. M.; TOURI, R. P.; MARTINEZ, J. P.; SAWYER, T. L.; REDMAN, R. S.; ROLLINS, J. A.; WOLPERT, T. J.; JOHNSON, K. B.; RODRIGUEZ, R. J.; DICKMAN, M. B.; CIUFFETTI, L. M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 1987-1994, 2001.

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. 47-80 p.

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.

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

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 3, p.170-179, 2006.

MIRANDA, J.E.; SUASSUNA, N.D. Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Campina Grande: Embrapa algodão, 2004. 47p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 76).

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

PEDROZO, R. Transformação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* com os genes marcadores GFP E DsRed. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. *Colletotrichum* host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. St Paul, USA: APS Press. 2000. 393p.

SALUSTIANO, M.E.; RONDON, M.N., ABREU, L.M.; COSTA, S.S.; MACHADO, J.C.; PFENNING, L. H. **Ramulosis of cotton is caused by a distinct phylogenetic lineage within the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex.** *Phytopathology*. (Submetido em Novembro de 2012).

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

SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado Brasileiro. 567 – 612p. In: Algodão no Cerrado do Brasil/ Associação Brasileira dos Produtores de Algodão – ABRAPA. 2 edição revisada e ampliada –Aparecida de Goiânia - GO: Mundial Gráfica, 2011. 1082p.

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.

VIÉGAS, A.P. Alguns fungos do Brasil XII. **Bragantia**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 1-37, Janeiro 1946.

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.

**CAPÍTULO 1 - TRANSMISSÃO DE *Colletotrichum gossypii* var.  
*cephalosporioides* A PARTIR DE SEMENTES DE ALGODÃO**

## 1 RESUMO

Entre as doenças de maior destaque na cultura do algodão no Brasil, encontra-se a ramulose causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. A transmissão deste patógeno de sementes a plântulas/plantas pode ser elevada atingindo níveis intoleráveis e sendo dependente de inúmeros fatores. O objetivo neste trabalho foi demonstrar e quantificar a taxa de transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* a partir de sementes de algodão em condições favoráveis para esta interação. Foram utilizadas duas cultivares de algodão, Delta Opal e Delta Penta, e as sementes foram inoculadas artificialmente pelo método de condicionamento osmótico com dois isolados, 260 (CNPA 054) e 262 (CNPA 056). As sementes foram mantidas em contato com as colônias fungicidas pelos períodos de tempos: 36, 72 e 108 horas, que corresponderam a diferentes potenciais de inóculo. Sementes inoculadas e não inoculadas foram semeadas e acondicionadas em câmaras de crescimento vegetal com temperaturas de 20 e 25 °C, por um período de 25 dias. A transmissão foi constatada tanto em plantas sintomáticas como em plantas assintomáticas. Sob as condições das duas temperaturas utilizadas foi possível observar sintomas típicos da doença nas plantas das duas cultivares e nos três potenciais de inóculo do patógeno. A maior taxa de transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, que ocorreu no maior potencial de inóculo inicial e na temperatura de 25° C foi de 95%. Este resultado indica o alto grau de relação entre o agente da ramulose e as sementes do algodão.

Palavras-Chave: transmissão, ramulose, potencial de inóculo.

## 2 ABSTRACT

Among the diseases occurring in cotton in Brazil, ramulose caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* is one of the most important. The transmission rate of this pathogen from seeds to emerging plants can be high and variable according to various factors. The objective in this study was to demonstrate and to evaluate the transmission of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* from cotton seeds under controlled conditions. For that two cotton cultivars, Delta DeltaPenta and Opal two isolates of the fungus, 260 (CNPA 054) and 262 (CNPA 056), and two growing temperatures, 20 and 25 ° C, were used. Seeds were inoculated by the pathogen through the osmotic pre-conditioning technique described in literature which provided three inoculum potentials in seeds of both cultivars used. Inoculated and non inoculated seeds were sowed in soil substrate and left in growth chambers with temperatures of 20 and 25 ° C for a period of 25 days. Transmission of the pathogen was demonstrated in both symptomatic and in asymptomatic plants, and the transmission rates of the fungus were quantified. The highest transmission rate of *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, occurred at highest level of inoculum potential (108h contact between seeds and fungus) at the temperature of 25 °C.

Keywords: transmission, ramulosis, inoculum potential.

### 3 INTRODUÇÃO

Especificamente para cultivos, como do algodão, a qualidade das sementes é de extrema relevância, não só como um veículo das informações genéticas responsáveis por características agronômicas, mas também como um meio de agregar valores pela incorporação física de outros insumos de grande importância para o aumento de produtividade.

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.

No Brasil, o cultivo do algodão em uma grande diversidade de ecossistemas faz com que inúmeros fatores, como as doenças, tornem-se limitantes à sua produção. A grande maioria dos patógenos encontra na semente sua principal via de disseminação. Dentre eles o fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, agente etiológico da ramulose do algodoeiro, destaca-se por causar danos irreversíveis à cultura.

*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, agente da ramulose, pode causar danos variáveis no algodoeiro como, manchas e perfurações nas folhas, enrugamento da superfície do limbo, nanismo de plantas, encurtamento de entrenós e superbrotamento, os quais comprometem o crescimento da planta e a formação de capulhos (PIZZINATO; TANAKA, 1996; PIZZINATO; CIA; FUZZATTO, 1994; ZANDONÁ et al., 2006).

Pela literatura, a transmissão planta-semente deste patógeno, não tem sido correlacionada com a severidade da doença no campo. Entretanto, baixos níveis de incidência têm, muitas vezes, resultado em altos índices de infecção das sementes pelo patógeno. A incidência de ramulose acima de 5% em campos

de cultivo pode induzir níveis elevados de infecção na semente, esse fato conduz ao cancelamento de campos de produção de sementes em algumas regiões produtoras (Araújo et al., 2009).

A transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes-plântulas/plantas pode atingir níveis entre 60 a 70%, e isto pode gerar um aumento intolerável da intensidade da doença (Tanaka, 1990; Machado et al., 2003).

De acordo com Machado (1994), o significado econômico da associação do patógeno com a semente pode ser estimado considerando a expressão de cada doença e na forma como ela se manifesta na natureza. Os danos decorrentes dessa associação não se limitam apenas às perdas diretas da população de plantas hospedeiras no campo, mas alcançam uma série de outras implicações que podem levar a danos irreparáveis em todo o sistema agrícola.

As condições mais favoráveis ao desenvolvimento da ramulose são normalmente, temperaturas entre 25 e 30°C e umidade relativa do ar acima de 80% (Mirandae Suassuna, 2004). Além do fator temperatura e umidade, também, se deve considerar o potencial de inóculo, sua localização na semente, genótipo, dentre outros que são de extrema importância no processo infeccioso (Tanaka & Machado, 1985, Araújo et al. 2006).

Em estudos sobre relação de doença em plantas e incidência de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e a transmissão subsequente, Tanaka e Menten (1992) relatam a obtenção de sementes infectadas com índices de incidência na faixa de 1,5% a 11,5% do fungo, e índices de transmissão do patógeno em proporções de 1% a 6,5% de plântulas/plantas com sintomas da ramulose.

Machado et al. (2003) estudaram o efeito de níveis de inóculo nas sementes e constataram que em 1% de sementes infectadas ocorria 3,37% de plantas com sintomas de ramulose por hectare. Os autores observaram, ainda,

que com 5% de sementes infectadas, o nível de incidência aos 28 dias após a semeadura atingiu 13,3%. Com níveis de incidência, variando entre 0 e 16%, Araujo et al. (2004) verificaram que os níveis da doença foram diretamente proporcionais ao nível de incidência do patógeno nas sementes.

Araújo e Chitarra (2005) constataram o incremento na severidade da ramulose em relação ao aumento dos níveis de incidência de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes. A doença apresentou alta severidade mesmo a partir de lotes com 1% de incidência do patógeno.

Com base nestes trabalhos, observa-se que a ramulose pode sofrer grande influência do aumento do nível do inóculo inicial a partir de sementes infectadas, portanto, o padrão de tolerância do patógeno nas sementes deve levar em consideração esta informação. Este padrão e tolerância guardam estreita vinculação com a taxa de transmissão (Machado, 1994; Talamini et al., 2001), embora se verifique que a infecção da semente não assegure a transmissão do patógeno para planta.

Considerando recomendações do Grupo Técnico Permanente de Sanidade de Sementes criado pelo MAPA (MAPA, 2000), a determinação de padrões sanitários para quaisquer patossistemas considerados de risco para a Agricultura brasileira deve ser baseada em estudos científicos com metodologia adequada para estes tipos de estudos. Neste sentido, as informações encontradas em literatura sobre avaliação da transmissão do agente da ramulose por sementes de algodão não esclarecem devidamente a relação deste fungo com as sementes desta espécie, em função de variáveis que são condicionadoras da intensidade com que este processo ocorre na prática. Em geral os trabalhos são baseados na relação de incidência e não potencial de inóculo do patógeno presente nas sementes e os sintomas visuais da doença nas plantas oriundas das sementes portadoras do patógeno.

O objetivo neste trabalho foi avaliar a transmissão em sementes de *C.*

*gossypii* var. *cephalosporioides* a partir de duas cultivares suscetíveis de algodão sob diferentes condições de temperatura e em função do potencial de inóculo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Para estes estudos foram utilizadas sementes de duas cultivares de algodão, DeltaOpal e DeltaPenta, ambas suscetíveis à ramulose, submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio a 1 %, durante um minuto e, em seguida, secas em câmara de fluxo laminar, sobre papel germitest durante 24 horas.

### 4.1 Isolados fúngicos e inoculação das sementes

As sementes das duas cultivares de algodão foram inoculadas artificialmente com dois isolados: 260 (CNPA 054) e 262 (CNPA 056) de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* fornecidos pela Embrapa Algodão, coletados em Primavera do Leste- MT e Alto Taquari-MT respectivamente, em 2008.

O método de inoculação via condicionamento osmótico foi utilizado para obtenção das sementes com os referidos isolados em diferentes potenciais de inóculo (Costa, 2000; Machado *et al.*, 2001).

Os isolados foram cultivados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo meio batata-dextrose-agar (BDA), modificado pela adição de manitol com potencial hídrico ajustado para -1,0 MPa, segundo cálculo do Software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995), por sete dias em BOD à 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, as sementes desinfestadas de ambas as cultivares, foram colocadas sobre as colônias do fungo, onde permaneceram por diferentes tempos de incubação (36, 72 e 108h), sendo retiradas e secas em câmara de fluxo laminar por 24 horas. Como testemunhas, foram utilizadas sementes que foram submetidas à restrição hídrica sem o fungo nos tempos de (36, 72 e 108h) e sementes sem o fungo e sem restrição hídrica.

## 4.2 Avaliação da taxa de transmissão

Os experimentos foram conduzidos em duas câmaras de crescimento vegetal com temperaturas de 20 e 25 °C, respectivamente, e fotoperíodo de 12 horas. Foram semeadas 100 sementes de cada tratamento em copos plásticos de 300 mL, contendo como substrato autoclavado da mistura de PLANTIMAX<sup>®</sup> mais areia na proporção de (1:2). A umidade do substrato foi mantida em níveis padronizados para garantir o desenvolvimento normal das plantas durante o período de 25 dias. A taxa de transmissão total foi estimada pelo somatório da morte das plântulas/sementes em pré-emergência mais a transmissão para as plantas com infecção sintomática e assintomática (Baker e Smith 1966; Shah e Bergstrom 2000; Botelho, 2011). As plantas foram consideradas sintomáticas quando apresentavam superbrotamento, lesões necróticas angulares, às vezes, acompanhadas de perfurações nas folhas e lesões necróticas no colo e assintomáticas as plantas com ausência dos sintomas já descritos. A avaliação de todas as plantas foi realizada pelo método destrutivo, coletando-se todas as partes com sintomas de cada planta e das assintomáticas foram seccionados somente a região do colo e meristema apical. Todas as partes seccionadas foram desinfestadas na sequência de álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e água destilada e esterilizada, por 1 minuto. Após secagem em papel absorvente, as partes de uma mesma planta foram distribuídas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo meio BDA e mantidas em incubadora a 20°C com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Após esse período, a ocorrência de crescimento micelial em cada parte da planta foi observada com o auxílio de microscópio estereoscópico e, quando necessário, as estruturas fúngicas foram examinadas com o auxílio de microscópio óptico. A transmissão da semente para a planta foi positiva quando, no mínimo, uma parte da planta sintomática ou assintomática apresentou o crescimento micelial de *C. gossypii* var.

*cephalosporioides* (Baker e Smith 1966; Shah e Bergstrom 2000; Botelho, 2011). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial triplo 2 x 2 x 3 (2 temperaturas – 20 e 25°C; 2 cultivares e 3 potenciais de inóculo), com quatro repetições por tratamento. Cada parcela experimental foi composta por 25 copos com uma semente por copo, totalizando 100 sementes por tratamento.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Sisvar<sup>®</sup> versão 5.3 (Ferreira, 2008). As análises de variância foram realizadas, individualmente, para cada isolado de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* além do controle (não inoculado) no esquema fatorial triplo. As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes das duas cultivares utilizadas estavam isentas de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* conforme resultados da análise sanitária realizada antes da implantação deste trabalho.

Ambos os isolados do referido patógeno foram transmitidos para a parte aérea das plantas a partir das sementes inoculadas em taxas variáveis e diretamente proporcionais aos potenciais de inóculo, equivalentes aos diferentes tempos de exposição das sementes às colônias desenvolvidas em substrato agarizado, contendo o restritor hídrico manitol, não havendo variação em função da cultivar e temperatura, durante os 25 dias de cultivo. A transmissão foi constatada tanto em plantas sintomáticas como em assintomáticas, sendo com menor incidência nas assintomáticas.

Na temperatura de 20°C, foi possível observar sintomas típicos da doença nas plantas das duas cultivares nos três potenciais de inóculo, havendo uma variação entre os isolados 260 e 262 na faixa de 11 e 29 % e, morte de pré-emergência entre 17 e 48% para a menor e maior temperatura. Quando se comparou as temperaturas observou que não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) nos dois potenciais de inóculo superiores (P2 e P3) correspondendo aos tempos de contato semente-fungo de 72 e 108h (Figura 1) para o isolado 260. Para o isolado 262, na mesma temperatura, essa variação foi de 9 a 37% (Figura 2) com morte de pré-emergência variando entre 13 e 48% (Figura 1). Já para as plantas assintomáticas, houve uma variação entre 2 e 9% para o isolado 260 e entre 1 e 13 % para o isolado 262 (Figura 3).

Por sua vez na temperatura de 25°C, as taxas de transmissão com observação de sintomas de ramulose variaram de 13 a 27% para o isolado 260 e de 9 a 38% para o isolado 262 (Figura 2) e morte de pré-emergência de 17 a 74 % e 7 e 72 %, respectivamente (Figura 1). As plantas assintomáticas oriundas de

sementes inoculadas apresentaram o patógeno em seus tecidos na proporção de zero e 6% para o isolado 260 e de 0 a 13 % para o isolado 262 (Figura 3).

Um dos sintomas que pode ser visualizado logo após a semeadura em condições favoráveis para a germinação das sementes de algodão é o tombamento de plântulas em pré e pós emergência causadas por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Cia e Salgado, 2005).

Em relação às taxas totais de transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, que correspondem ao somatório de todas as percentuais de plantas mortas em pré e pós-emergência, plantas com sintomas típicos da ramulose e plantas assintomáticas com o patógeno em seus tecidos, os maiores valores foram observados na temperatura de 25°C para a cultivar Delta Opal. Neste caso as taxas variaram de 32 a 95% para o menor e maior potencial de inóculo, respectivamente. Do mesmo modo, na cultivar Delta Penta, os maiores valores de taxa de transmissão total foram observados, também, na temperatura de 25°C com taxas variando de 26 a 91%. Com esses resultados pode-se inferir que a temperatura elevada é mais favorável ao processo de transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* de sementes para as partes aéreas do algodão (Figura 4).

A temperatura e o potencial de inóculo são, portanto fatores condicionantes no processo de transmissão do agente da ramulose por sementes infectadas, havendo um limiar a partir do qual os efeitos desta variável deixam de ser progressivamente lineares.

Merece atenção neste estudo o fato de plantas assintomáticas serem portadoras de inóculo de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, o que é de grande significado do ponto de vista epidemiológico. Embora a proporção destas plantas possa ser considerada baixa, o papel delas como fonte de inóculo em condições de campo pode provocar situações inesperadas e negativas para o cultivo do algodão.

Fica clara, também, por este trabalho, a capacidade elevada de *C. gossypii* var *cephalosporioides* em causar mortes de sementes e plântulas de algodão na fase de pré-emergência. Em se tratando de um fungo necrotrófico, os tecidos mortos portadores de inóculo no presente caso, podem constituir fontes de inóculo importantes para novos processos infecciosos de plantas na sequência do desenvolvimento da população sobrevivente no campo.

Vale lembrar que Araújo et al. (2006) observaram que a intensidade da doença não foi influenciada pelo tempo de exposição, no entanto, a temperatura foi fator determinante para a transmissibilidade do patógeno. Os autores relataram, ainda, que o aumento da temperatura proporcionou altos valores de incidência e severidade.

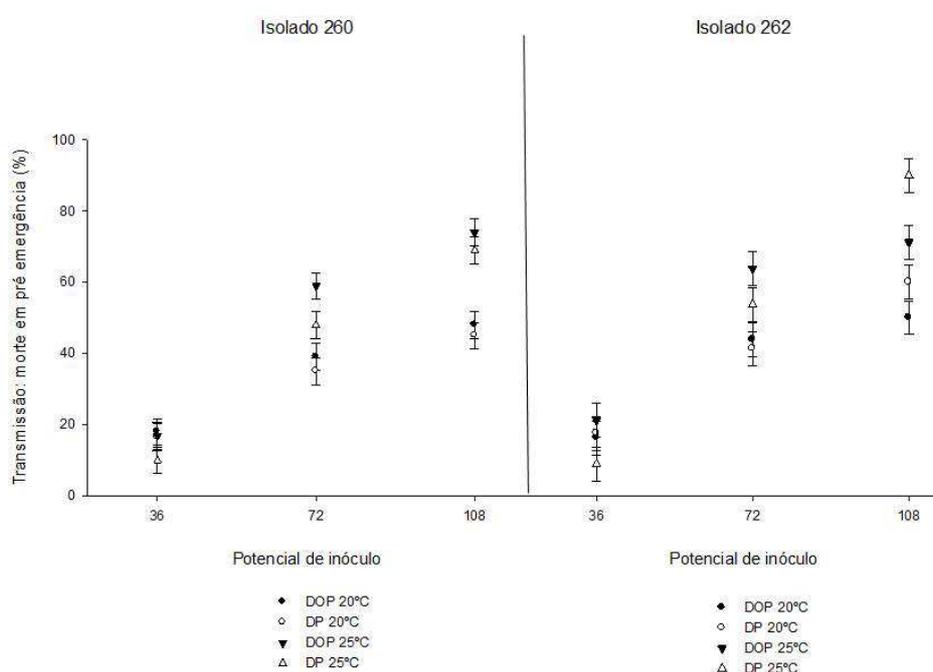
Rey et al. (2009) colocaram as sementes de *Colletotrichum lindemuthianum* em contato com o fungo por 96 horas e relataram que o fungo demonstrou um significativo poder de transmissão sendo o inóculo suficiente para causar taxas de transmissão da ordem de 70 a 80%.

Barrocas (2008) já havia observado também que à medida que aumentou o potencial de inóculo do patógeno das sementes houve uma redução da porcentagem de plantas emergidas e um aumento gradual da taxa de transmissão sintomática, um componente diferencial do trabalho desenvolvido se deu em relação a cultivares, uma vez que apresentou diferença na avaliação da transmissibilidade, o que indica a importância dos padrões sanitários, exigidos em programas de certificação, percebendo que fatores como genótipos do hospedeiro, potencial de inóculo entre outros devem ser considerados no estabelecimento desses padrões.

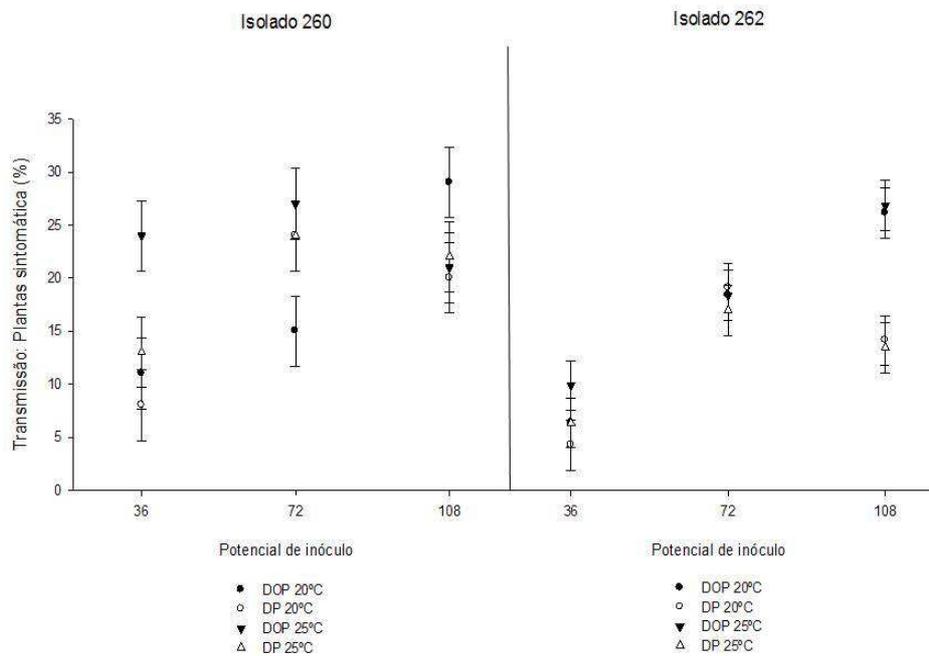
Vale também destacar que Araújo et al. (2009) observaram uma correlação significativa entre os níveis de inóculo inicial e a incidência da ramulose, quando 70% das maçãs estavam formadas, bem como entre os níveis

de incidência no campo e a incidência do patógeno nas sementes, sendo esta correlação altamente significativa no ano de avaliação, 2006.

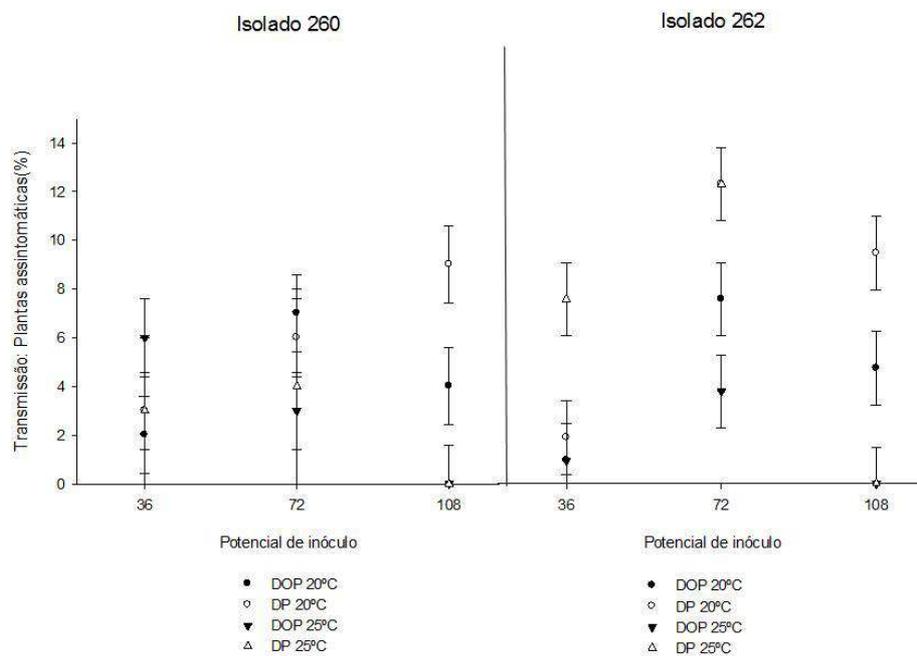
Com base nos resultados deste trabalho, ficou evidenciado que a transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* via sementes é influenciada pela pressão de inóculo nas sementes, temperatura por ocasião do desenvolvimento inicial do algodão, além da resistência do hospedeiro.



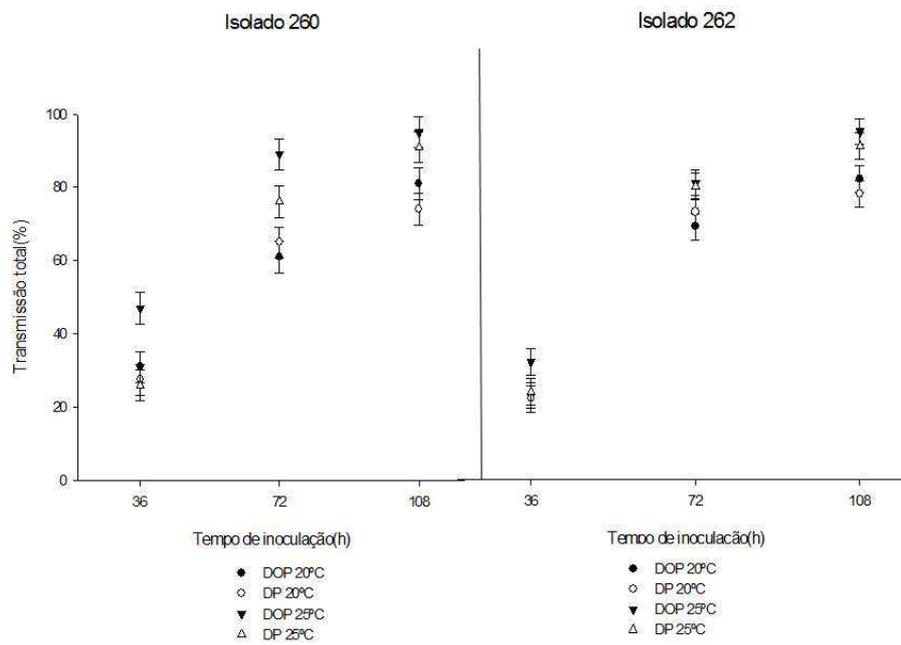
**Figura 1-** Taxas de transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, a partir de sementes de algodão, considerando morte de sementes/plântulas na fase de pré-emergência, em função da temperatura, genótipo do hospedeiro e potencial de inóculo inicial do fungo em sementes inoculadas.



**Figura 2-** Taxas de transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, a partir de sementes de algodão, considerando plantas sintomáticas, em função da temperatura, genótipo do hospedeiro e potencial de inóculo inicial do fungo em sementes inoculadas.



**Figura 3-** Taxas de transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, a partir de sementes de algodão, considerando plantas assintomáticas, em função da temperatura, genótipo do hospedeiro e potencial de inóculo inicial do fungo em sementes inoculadas.



**Figura 4-** Taxa de transmissão total de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, a partir de sementes de algodão, considerando a fase de pré-emergência e em plantas sintomáticas e assintomáticas, em função da temperatura, genótipo do hospedeiro e potencial de inóculo inicial do fungo em sementes inoculadas.

## 6 CONCLUSÕES

A taxa de transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, de sementes infectadas a plântula/planta de algodão, é variável em função de alguns fatores, como potencial de inóculo inicial do patógeno e temperatura prevalente na fase inicial de desenvolvimento das plântulas/plantas. As maiores taxas ocorrem nos potenciais de inóculo mais elevados e em temperaturas mais altas, no caso 25° C em comparação com 20° C.

Em condições de temperatura mais baixa, utilizada neste trabalho, a taxa de transmissão do agente da ramulose por sementes no menor potencial de inóculo foi da ordem de 22%.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. E., CHITARRA L. G. Efeito de diferentes níveis de inóculo nas sementes sobre o progresso da ramulose do algodoeiro no Mato grosso. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. s193, 2005.(Resumo)

ARAÚJO, A.E.; MENTEN, J.O.M.; FERREIRA, A.C.B.; DIAS, C.T.S.; NÓBREGA, M.B.M.; MORELLO, C.L. Efeito de diferentes níveis de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, em plantas de algodão no campo e sua incidência nas sementes. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.310-315, 2009.

ARAÚJO, D.V., POZZA, E.A., MACHADO, J.C., ZAMBENEDETTI, E.B., CELANO, F.A.O., CARVALHO, E.M. & CAMARGOS, V.N. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira** v.31, n.1, p.035-040, 2006.

BAKER, KF, SMITH, SH. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, v.4, p.311-332, 1966.

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

BOTELHO, L.S. Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

CIA, E. & SALGADO, C.L., Doenças do Algodoeiro (*Gossypium* spp.) In: **Manual de Fitopatologia**/edição de Hiroshi kimati [et al.] 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 41-52p.663p.

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

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Rev Symposium**. v.6 p.36-41, 2008.

MACHADO, A.Q. & CASSETARI NETO, D. Nível de tolerância de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão no Mato Grosso. Resumos, 4º Congresso Brasileiro de Algodão, Goiânia, GO. 2003.

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

MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 2, p. 229-264, 1994.

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

MIRANDA, J.E.; SUASSUNA, N.D. Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Campina Grande: Embrapa algodão, 2004. 47p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 76).

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

PIZZINATTO, M. A. & TANAKA, M.A.S. Método para identificação de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro baseado no hábito de crescimento. II. Avaliação em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal. v.22, n.2, p.122-127. 1996.

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

REY, M.S.; LIMA N.B.; SANTOS, J.; PIEROBOM, C.R. Transmissão semente-plântula de *colletotrichum lindemuthinum* em feijão (*phaseolus vulgaris*) Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.76, n.3, p.465-470, jul./set., 2009.

SHAH, DA, BERGSTROM, GC. Temperature dependent seed transmission of *Stagonospora nodorum* in wheat. *Eur J Plant Pathol*, v. 106, p. 837-842, 2000.

TALAMINI, V. Progresso espacial e temporal da antracnose a partir de

diferentes níveis de inóculo inicial em sementes de feijoeiro. Tese (Doutorado). Lavras. Universidade Federal de Lavras. 2001.

TANAKA, M.A.S. Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro. Tese (Doutorado) Piracicaba: ESALQ, 1990. 111p.

TANAKA, M.A.S. & MACHADO, J.C. Patologia de sementes. *Informe Agropecuário* v. 11, p.40-46, 1985.

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

ZANDONÁ, C.; NOVAES, T.G.; MEHTA, Y.R.; SCHUSTER, I.; TEIXEIRA, E.A.; CUNHA, A. Herança de resistência a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em algodoeiro brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.76-78, 2006.

**CAPÍTULO 2 - TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Colletotrichum*  
*gossypii* var. *cephalosporioides* COM O MARCADOR RFP (*Red*  
*Fluorescent protein*)**

## 1 RESUMO

Entre os patógenos que se associam às sementes de algodão, considerados de alto risco, destaca-se o fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, agente causal da ramulose. Diversos estudos têm sido realizados para verificar o processo de transmissão do referido patógeno das sementes, para a parte aérea das plantas de algodoeiro, entretanto, até o presente momento, este tipo de associação, ainda, não foi esclarecido de forma conclusiva. Diferentes metodologias e ferramentas são utilizadas para investigar o processo de infecção e colonização de patógenos. Além de marcadores moleculares, têm sido também utilizados marcadores de expressão gênica do tipo GFP (*Green fluorescent protein*) e RFP (*Red fluorescent protein*), visando à transformação genética de microrganismos. O objetivo neste trabalho foi adequar um protocolo de transformação que emprega o gene marcador tipo RFP, com vistas à sua aplicação para a espécie *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e, por meio deste procedimento elucidar o processo de transmissão/trajetória de colonização do referido patógeno em associação com sementes de algodoeiro. Para este trabalho foi utilizado o vetor plasmidial pSC002, contendo o gene de resistência ao antibiótico higromicina-B, gene promotor *pToxA*, e o gene da proteína fluorescente vermelha. As colônias de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* resistentes à higromicina-B foram selecionadas e as observações do crescimento micelial e as características morfológicas dos transformantes foram feitas com auxílio de Microscópio Esteroscópico com câmera Leica DFC310 FX. Teste de patogenicidade foi realizado e a localização do fungo transformado em plântulas de algodão pôde ser observada. O protocolo para obtenção dos protoplastos utilizados neste estudo mostrou-se eficiente para a produção de protoplastos do fungo em foco. A intensidade da fluorescência vermelha foi variável entre os indivíduos transformados com RFP. Em relação à estabilidade, a maioria dos transformantes não permaneceu estável, hifas parcialmente fluorescentes perderam esta característica. Quanto à patogenicidade, o isolado LAPS 263 de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* transformado com RFP manteve-se patogênico. Por meio do marcador em teste foi possível observar a localização do patógeno sobre os cotilédones de plântulas assintomáticas. Diante dessas observações, ficou evidenciado que o uso de marcar proteico tipo RFP é promissor para o estudo das relações entre o agente da ramulose e sementes do algodão, entretanto mais pesquisas são ainda

requeridas para ajustes do protocolo utilizado neste trabalho tendo em vista a obtenção de isolados mais estáveis após o processo de transformação gênica em foco.

Palavras-chave: proteína fluorescente, marcador gênico, higromicina.

## 2 ABSTRACT

Among the pathogens that are associated with cotton seeds, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, causal agent of ramulose is considered of high risk to that crop in Brazil. Although several reports can be found in literature on the transmission of that pathogen by cotton seeds, demonstration and quantification of the transmission rates are not well known. In this study the aim was to establish a protocol to obtain transformants of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* with protein markers like RFP (*red fluorescent protein*), having in sight the application of that procedure to better understand the relationship between that pathogen and colonized cotton seeds. For this study the vector pSC002 plasmid, containing the gene for resistance to the antibiotic hygromycin B gene promoter pToxA and red fluorescent protein gene was used. By that procedure it was possible to select colonies of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* resistant to hygromycin B, which were used for other steps in the transformation process. From the pathogenicity test, localization of the transformed fungal isolates fungus on cotton seedlings was observed. The protocol used for obtaining the protoplasts proved to be efficient for that purpose in *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. The red fluorescence intensity was variable between individuals transformed with RFP and for the majority of the transformants that characteristic was not stable. Based on pathogenicity test, the isolate 263 of *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, transformed with RFP, remained pathogenic to cotton seedlings in the same way as the wild isolate. Localization of the pathogen in the cotyledon of asymptomatic seedlings was also observed in this study. Although those results indicate the potentiality of the use of RFP markers to study the relationship between *C. gossypii* var.

*cephalosporioides* and cotton seeds they show the necessity of further investigation for more conclusive information on the use of that technique.

Keywords: Fluorescent protein ,marker gene, hygromycin.

### 3 INTRODUÇÃO

Entre os patógenos que se associam às sementes de algodão, considerados de alto risco para esta cultura, destaca-se o fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, agente etiológico da ramulose, considerado uma doença importante que ocorre em todas as regiões produtoras desta espécie no Brasil. Trata-se de uma doença que ocorre em plantas de qualquer idade, preferencialmente, em tecidos jovens comprometendo o crescimento do meristema apical (Suassuna e Coutinho, 2011).

Diversos estudos têm sido feitos, para verificar o processo de transmissão do referido patógeno das sementes, para a parte aérea das plantas de algodoeiro, entretanto, até o presente momento, este tipo de associação ainda não foi esclarecido de forma conclusiva.

O acompanhamento de eventos que ocorrem no ambiente de células procariotas e eucariotas, a visualização de organelas e monitoramento da localização, movimentação e atuação de produtos gênicos têm sido ainda um dos desafios da pesquisa (Figueira, 2002).

Diferentes metodologias e ferramentas são utilizadas para investigar o processo de infecção e colonização de patógenos. Atualmente o uso de marcadores moleculares tem sido utilizado em estudos de uma grande diversidade de microrganismos entre outros. Em Fitopatologia as técnicas, empregando marcadores genéticos, têm sido de grande importância, uma vez que auxiliam na identificação, quantificação, diferenciação de microrganismos fitopatogênicos, além de auxiliar na determinação da variabilidade genética. Além dos marcadores moleculares, também vêm sendo utilizados marcadores de expressão gênica do tipo GFP (*Green fluorescent protein*) e RFP (*Red fluorescent protein*), dentre outros, visando à transformação genética de microrganismos.

A descoberta das proteínas fluorescentes e sua aplicação no estudo da biologia celular trouxeram vantagens para elucidar o processo de infecção e colonização dos fungos e de outros microrganismos que, por meio da transformação destes, torna possível visualizar com auxílio de microscopia de fluorescência e confocal a expressão desses genes. Essas ferramentas têm sido empregadas com sucesso por alguns pesquisadores (Dumas et al., 1999; Bloemberg et al., 2000; Horowitz et al., 2002, Chen et al., 2002; Oren et al., 2002).

As proteínas fluorescentes são marcadores importantes que têm revolucionado a biologia celular na última década, principalmente no estudo de células vivas (Freitag et al., 2004).

A partir da clonagem do cDNA de um gene que codifica uma proteína fluorescente verde (green fluorescent protein – GFP) de *Aequorea victoria* realizada por Prasher (1992), citado por Lorang et al. (2001), muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando este gene e seus derivados, inclusive em fungos filamentosos.

A utilização da técnica de transformação de patógenos com uso de proteínas RFP, assim como de GFP, apresenta inúmeras vantagens na marcação gênica, pois a sua expressão pode ser visualizada em observações *in vivo* de células individuais, populações de células ou em organismos interagindo com simbiontes ou com o ambiente em tempo real. Além disso, possui baixa ou nenhuma toxicidade ou atividade endógena, sendo extremamente estável, além de manter a atividade, quando associada a muitas proteínas celulares e extracelulares (Lorang et al., 2001; Lagopodi et al., 2002).

Na literatura, são encontrados relatos sobre a transformação de diversos fungos, havendo para cada espécie a necessidade de ajustes nos protocolos utilizados. Para que a concentração desses marcadores gênicos na célula seja satisfatória, a escolha do promotor e a metodologia empregada para fazer a

transformação da célula deve ser otimizada para cada tipo de célula com que se está trabalhando (Tombolini et al., 1999; Lorang et al.2001; Spelling et al. 1996; Balint- Kurti et al., 2000).

Para estudos envolvendo fungos transformados e sementes, alguns resultados já conhecidos têm revelado que esta técnica tem sido útil para o conhecimento destas relações biológicas. Exemplo destas aplicações é fornecido pelo trabalho de Du et al. (1999), pelo qual Um bom nível de expressão do GFP em *Aspergillus flavus* mostrou a viabilidade do uso da técnica para monitorar a colonização de sementes de milho e indicando também ser possível a sua utilização na triagem de sementes provenientes de linhagens resistentes obtidas em programas de melhoramento genético.

Em estudo desenvolvido por Rajasekaran et al. (2008) foi possível elucidar com detalhes a dinâmica do processo de colonização de sementes de algodão com *Aspergillus flavus* transformado com GFP. Foram observados todos os tecidos das sementes colonizadas e a velocidade dessa colonização, concluindo-se que o fungo coloniza o interior da semente, o tegumento e os cotilédones, no prazo de 72 horas. Observaram também que a entrada do patógeno ocorre por meio de poros existentes nas sementes.

Apesar dos trabalhos citados acima, estudos com fungos geneticamente modificados na área de patologia de sementes para elucidar os mecanismos de transmissão semente- planta ainda são escassos.

O conhecimento dos mecanismos que envolvem a infecção e transmissão de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* via sementes a plantas de algodão, ainda é aspecto pouco esclarecido. O uso de técnicas moleculares via marcadores genéticos, podem auxiliar na elucidação desses mecanismos.

O objetivo neste trabalho foi adequar um protocolo de transformação que emprega o gene marcador tipo RFP, com vistas à sua aplicação para a espécie *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e, por meio deste procedimento

elucidar o processo de transmissão/trajetória de colonização do referido patógeno em associação com sementes de algodão.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de Patologia de Sementes e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

### 4.1 Obtenção do isolado e do vetor de transformação

O isolado de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* utilizado neste estudo, LAPS 263 (CNPA 0058) foi fornecido pela Embrapa Algodão, coletado em Primavera do Leste- MT em 2008. O vetor plasmidial de transformação utilizado foi o pSC002, contendo o gene de resistência ao antibiótico higromicina-B e o gene promotor *pToxA*, originado do fungo *Aspergillus nidulans*, para expressão da proteína fluorescente vermelha. Este plasmídeo foi cedido pelo pesquisador Dr. Theo van der Lee (Plant Research International/Wageningen University and Research Center- NL).

### 4.2. Obtenção e transformação dos protoplastos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* com RFP.

O protocolo utilizado foi o mesmo descrito por Botelho (2010) destinado a obtenção de protoplastos de *Sclerotinia sclerotiorum*. Inicialmente o isolado de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* foi cultivado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio batata-dextrose-agar (BDA), por cinco dias em BOD à 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Para a obtenção dos protoplastos, a metodologia foi adaptada, de acordo com Boland & Smith, (1991) e Liljeroth et al (1993). A partir do fungo desenvolvido em BDA, foi feita uma suspensão de esporos por raspagem do micélio com alça de Drigalski e água destilada esterilizada da qual

se restirou  $1,0 \times 10^6$  esporos/mL que foi vertido em Erlenmeyer, contendo 50 mL de meio BD (batata-dextrose) os quais foram colocados em agitador mecânico horizontal a 100 rpm com temperatura controlada a 25°C, por 72 horas. Após esse período fez-se a filtração e secagem do material fúngico por meio de bomba a vácuo. Duzentos miligramas de micélio do fungo foram colocados em tubos falcon contendo 6 mL de estabilizador osmótico NaCl 0,7M mais a enzima Lyzing Enzimes (Sigma- L1412-10G), na proporção de 100 mg para cada 3 mL de solução osmótica. Os tubos foram acondicionados em agitador a 75 rpm em temperatura de 28°C onde permaneceram por 3 horas. Em seguida, a solução foi filtrada com uma camada de gaze esterilizada e transferida para microtubos, os protoplastos foram observados em microscópio ótico e quantificados em câmara de Neubauer. A suspensão de protoplastos obtida foi centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em 200 µL de NaCl 0,7M gelado (4°C) e, novamente, ressuspensionado em tampão de armazenamento contendo: quatro partes de STC (0,8 M sorbitol, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl<sub>2</sub>) e uma parte de SPTC (0,8 M Sorbitol, 40% PEG4000, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl<sub>2</sub>).

Foram adicionados a suspensão protoplasmática, com concentração final de  $2,1 \cdot 10^8$  em 100 µL, 10 µL do DNA plasmidial pSC002 DsRed (0,35-1,66 µg/µL), misturando-os vagarosamente com auxílio de uma pipeta. Os microtubos, contendo a solução, foram mantidos em gelo por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL de SPTC (40% do PEG4000- FLUKA), deixando a suspensão em temperatura ambiente de 22°C por mais 20 minutos.

Após esse período, a suspensão foi vertida em 200 mL de meio de regeneração a 43°C (0,1% de extrato de levedura (Sigma-Y4250-250G), 0,1% do casienhydrolysate (Sigma-C8845-500MG), 34,2% de sacarose (Sigma-84100-1KG) e 1,0% de ágar granulado (Difco-1016141000-1KG) em 1.000 mL de água destilada, autoclavados a 120 °C por 20 minutos). Em seguida, 20 mL

do meio com a suspensão foi vertida em dez placas de Petri de 9 mm de diâmetro. contendo meio. As placas contendo o meio/isolados foram mantidas em BOD por 48 horas, a 25<sup>o</sup>C. Ao final desse período, 10 mL de ágar-água contendo o antibiótico higromicina-B na concentração de 100 µg/mL foram vertidos sobre os isolados de cada placa, sendo elas mantidas em BOD, a 25 °C por 7 e 10-dias .

#### **4.4 Seleção, verificação da estabilização e características dos transformantes**

As colônias de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* resistentes à higromicina-B foram selecionadas e, em seguida transferidas para meio BDA contendo diferentes concentrações do antibiótico seletivo (40, 50, 60, 80 e 100 mg de Higromicina B/mL de BDA).

Para garantir a estabilidade dos transformantes, realizaram-se sucessivas repicagens das colônias de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em meio BDA com e sem higromicina B (60 µg/mL). Observações foram feitas sobre o crescimento micelial e as características morfológicas dos transformantes. Quanto à testemunha o monitoramento da fluorescência realizou-se com auxílio de Microscópio Esteroscópico com câmera Leica DFC310 FX (Fluorecence Microscope Digital Color Camera).

#### **4.5 Patogenicidade e localização do fungo transformado em plântulas de Algodoeiro**

Sementes de algodão, cultivar Delta Opal, foram submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio a 1 %, durante 1 minuto e, em seguida, secas em câmara de fluxo laminar, sobre papel germitest durante 24 horas. Em seguida procedeu-se a inoculação das sementes com o fungo transformado, por meio da técnica de condicionamento fisiológico (Machado et al., 2001), em diferentes

tempos, que corresponderam a diferentes potenciais de inoculo (P) (P1 = 24 horas, P2= 48, P3 = 72 e P4 = 96). Após esses períodos de tempo, as sementes foram submetidas à secagem em câmara de fluxo laminar por 24 horas.

Para a avaliação da patogenicidade e localização do fungo transformado, as sementes inoculadas foram semeadas individualmente em copos plásticos com capacidade para 300 mL contendo substrato PLANTIMAX<sup>®</sup> mais areia na proporção de 1:2, previamente autoclavado. O ensaio foi conduzido em câmara de crescimento vegetal com temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Dois e dezoito dias após a emergência (DAE) as plantas foram excisadas em três e cinco partes respectivamente, sendo as de dois DAE, hipocótilo, inserção dos cotilédones e cotilédones e nas de 18 DAE hipocótilo, inserção do cotilédone, cotilédones, epicótilos e folhas verdadeiras. Todas as partes excisadas passaram por assepsia em álcool 70%, hipoclorito 1% e lavadas três vezes em água destilada esterilizada, sendo as mesmas distribuídas em placas de Petri de 9 mm de diâmetro contendo meio seletivo BDA mais Higromicina B e incubadas em câmara BOD à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas por 5 dias. O crescimento micelial sobre as partes das plântulas plaqueadas foram observadas em Microscópio Esteroscópico com câmera Leica DFC310 FX (Fluorecence Microscope Digital Color Camera). Lâminas com cortes transversais e longitudinais das partes excisadas foram preparadas e visualizadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axio Observer Z.1) equipado com o filtro RFP, com filtro de excitação 510 a 560 nm e pico de transmissão para excitação em 540 a 583 nm. As imagens obtidas das avaliações foram editadas utilizando-se os softwares Axio Vision Release V.4,7 e o Microsoft Office Picture Manager.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

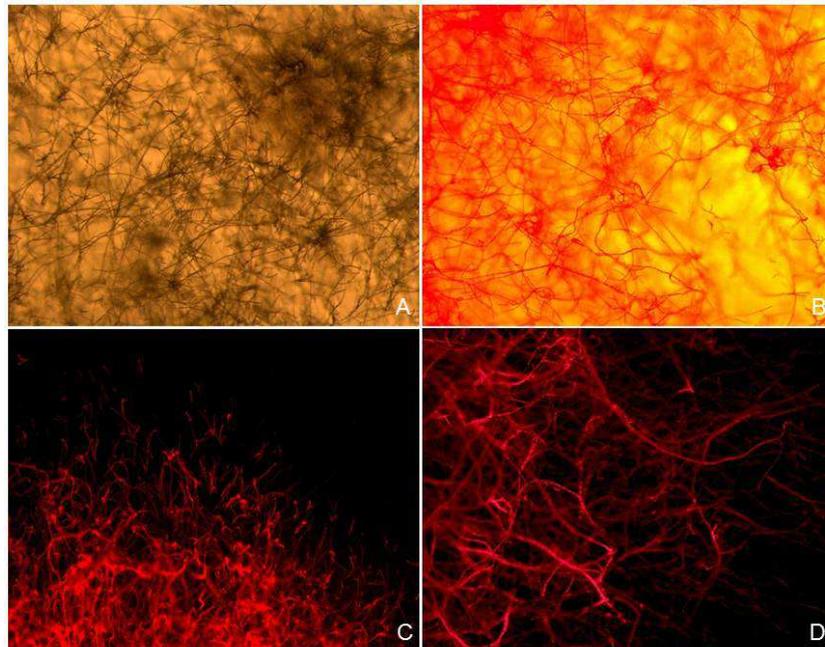
Pelo procedimento de obtenção de protoplastos seguido neste trabalho ficou evidenciado que o protocolo modificado por Botelho (2011) mostrou-se também adequado para a produção de protoplastos ( $2,1 \times 10^8/100 \mu\text{L}$ ) de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Os protoplastos obtidos quando adicionados ao meio de regeneração e plaqueados em placas de Petri, foram capazes de formar micélio em quantidade satisfatória sobre o meio ágar-água contendo o antibiótico higromicina-B na concentração de  $100 \mu\text{g/mL}$ , confirmando assim, a regeneração do fungo. Foram obtidos 10 transformantes de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* contendo o gene DsRed.

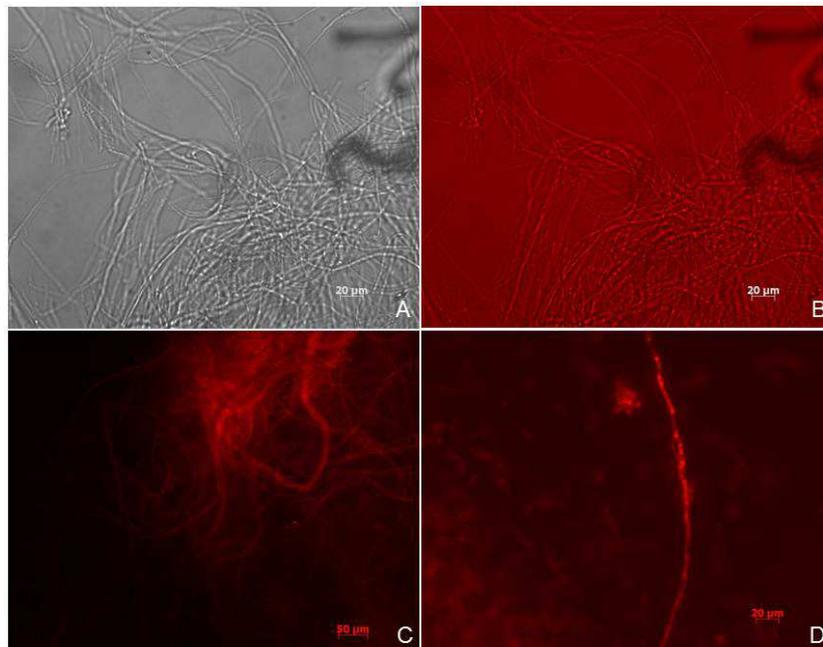
Quanto ao teste com diferentes concentrações de higromicina, os transformantes do fungo em estudo, desenvolveram-se melhor na concentração de  $60 \text{ mg}$  de higromicina B/mL de BDA. De acordo com dados da literatura, as concentrações do antibiótico utilizadas nos protocolos de transformações para outros fungos são bastante variáveis, como, por exemplo, para *Mycosphaerella fijiensis*, cuja concentração é  $20 \mu\text{g}$  higromicina-B/mL (Balint-Kurti et al., 2000), para *Fusarium graminearum* em que a concentração inibitória do antibiótico chega a  $300 \mu\text{g/mL}$  (Maier et al., 2005). Siqueira (2009) observou que até a concentração de  $25 \mu\text{g/mL}$  de higromicina-B, o fungo *Stenocarpella maydis* apresentou crescimento gradual, havendo redução acentuada entre  $30$  e  $45 \mu\text{g/mL}$ , o que caracterizou, ainda, o crescimento do referido isolado nessas concentrações. Botelho (2011) observou que a concentração de higromicina de  $100 \text{mg/ml}$  proporcionou o desenvolvimento maior de *Sclerotinia sclerotiorum*. Isso faz com que essa determinação seja feita para cada caso.

A intensidade da fluorescência vermelha foi variável entre os indivíduos transformados com RFP, havendo comprovação da ausência de fluorescência no

isolado original utilizado, Isolado 263 (sem transformação), quando foi excitado com filtro RFP (Figura 1). Em relação à estabilidade, a maioria dos transformantes não permaneceu estável. Foram observadas hifas parcialmente fluorescentes, as quais após sucessivas repicagens, perderam esta característica (Figuras 2 e 3). Segundo Lorang et al (2001), transformantes gerados a partir de protoplastos multinucleados como é o caso de *Botrytis cinerea*, *Pyrenophora tritici-repentis* e *Sclerotinia sclerotiorum*, muitas vezes são expostos à fluorescência apenas algumas células fúngicas, que mantêm a expressão do fenótipo de fluorescência, necessitando ser transferidos várias vezes para meios seletivos para uniformizar a expressão do gene marcador nas hifas. O que não acontece em transformantes gerados a partir de protoplastos uninucleados em que a fluorescência é mais uniforme, como acontece com alguns fungos transformados e relatados em literatura como, *Colletotrichum magna*, *Verticillium dahliae*, *Alternaria alternata*, *sativus Cochliobolus*, *sambucinum* e *Fusarium* spp.



**Figura 1** - Fotomicrografias de microscópio estereoscópico de fluorescência, da expressão da proteína vermelha fluorescente, RFP, em *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. (A) Micélio do isolado 263 sem transformação com filtro de luz normal; (B) Micélio do isolado 263 sem transformação com filtro de luz RFP; (C e D) Micélio do isolado 263 transformado com filtro de luz RFP apresentando fluorescência.

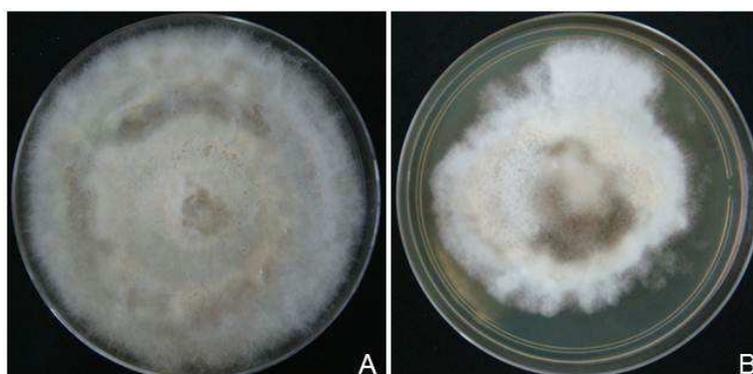


**Figura 2** - Fotomicrografias de microscopia de epifluorescência, da expressão da proteína vermelha fluorescente, RFP, em *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. (A) Micélio do isolado 263 sem transformação com filtro de luz normal; (B) Micélio do isolado sem transformação com filtro de luz RFP; (C) Micélio do isolado transformado com filtro de luz RFP e (D) Hifa isolado do fungo apresentando fluorescência.

Vale destacar que estudos citogenéticos já realizados com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* por Roca et al. (2004) evidenciaram a ocorrência de conídios com dois a três núcleos em baixas proporções e isto pode ter sido uma causa da baixa estabilidade observada entre os isolados do referido fungo transformado neste estudo.

Outro aspecto que chama atenção neste trabalho, relacionado às características morfológicas, foi o comportamento diferente apresentado entre os dois isolados, transformado e não transformado. Nestes sentido o crescimento

micelial do isolado transformado foi mais lento e com baixa produção de esporos nas mesmas condições e período de incubação avaliados (Figura 4). Porém, foi observada que uma alta proporção de conídios formados na colônia do isolado transformado oriunda da recuperação do fungo de plantas infectadas pelo referido isolado apresentaram-se com a fluorescência vermelha intensa (Figura 5).



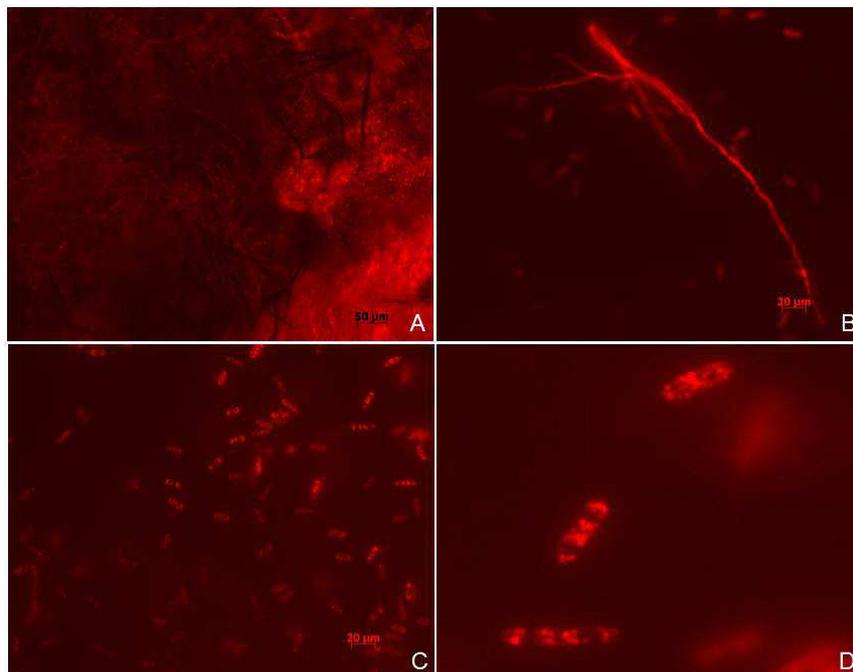
**Figura 3** – Isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. (A) Isolado LAPS 263 não transformado e (B) Isolado LAPS 263 transformado com RFP.

Segundo Chalfie et al. (1994), o uso desses marcadores gênicos tipo GFP e RFP não interferem nas funções normais das células e, portanto, pode ser utilizada para análise dos processos celulares (Cormack, 1996; Tsien, 1998).

Vale destacar alguns exemplos relatados na literatura que demonstram a eficácia da transformação gênica com marcadores proteicos com o intuito de estudar as relações em alguns patossistemas. Em trabalho relativamente recente Siqueira (2009) com o fungo *Stenocarpella maydis* transformado com os genes marcadores GFP e DsRed houve manutenção das características morfológicas e

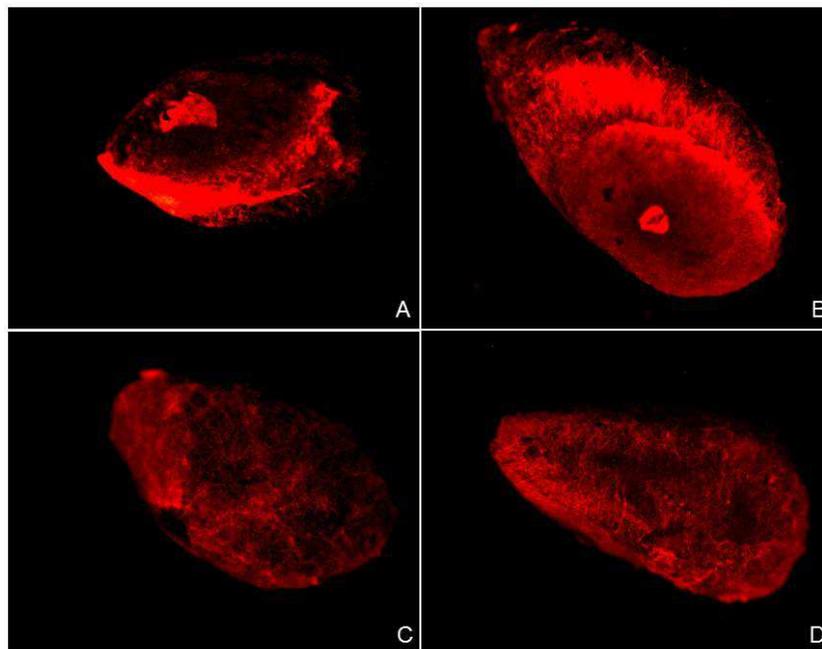
infectividade originais, quando comparado aos isolados originais, não transformado. Da mesma forma, Pedrozo (2009), conseguiu com o mesmo protocolo usado neste trabalho com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, transformar *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*, tendo havido a manutenção das características avaliadas no isolado transformado à semelhança do isolado original.

Diante desses resultados, fica evidenciado que mais estudos são ainda requeridos para o uso de marcadores proteicos com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, havendo necessidade de algumas modificações e ajustes no protocolo seguido, o qual tem sido de grande utilidade para estudos com outros patossistemas de interesse no Brasil.



**Figura 5** - Fotomicrografias de microscopia de epifluorescência, de estruturas de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. (A) Micélio, setas e massa de esporos (B) hifa isolada e esporos; (C e D) esporos do fungo apresentando fluorescência.

Quanto à colonização das sementes inoculadas percebe-se que a inoculação do isolado transformado pode ser considerada bem sucedida, sendo possível visualizar um considerável volume de hifas nos tecidos das sementes (Figura 6).

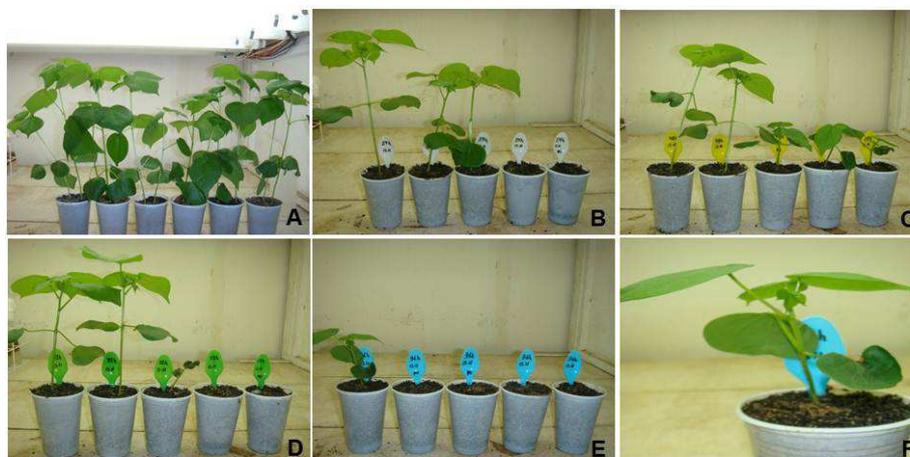


**Figura 6** – Fotomicrografias de microscópio estereoscópico de fluorescência, de sementes inoculadas com *C. gossypii* var.

*cephalosporioides* transformado. (A) 24h horas de inoculação (B) 48h (C) 72 horas e (D) 96 horas.

Observa-se que o isolado LAPS 263 de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* transformado com RFP manteve-se patogênico ao algodoeiro apresentando os sintomas típicos da ramulose (Figura 7).

Importante salientar que em outros estudos com uso de marcadores protéicos não houve diferenças na patogenicidade entre isolados transformados e não transformados com GFP de *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum* e de *Sclerotinia sclerotiorum* sob condições controladas (Pedrozo,2009; Botelho, 2011). Entretanto, observou-se que na primeira semana o isolado não transformado (LAPS242) de *S. sclerotiorum* ocasionou maior severidade da doença.

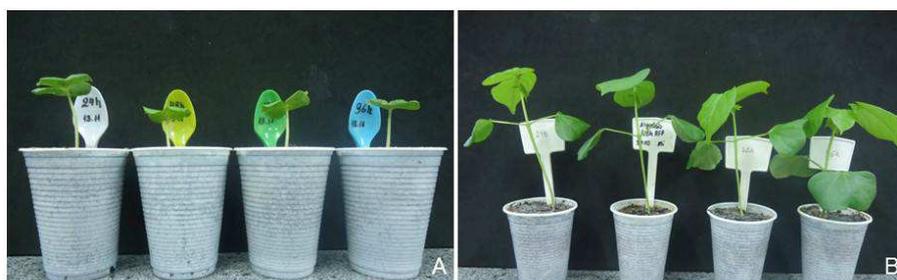


**Figura 7** – Patogenicidade do isolado 263 transformado com gene RFP em diferentes tempos de inoculação das sementes. (A) Testemunha sem a presença do patógeno (B) 24h horas de inoculação (C) 48 horas; (D) 72 horas (E) 96

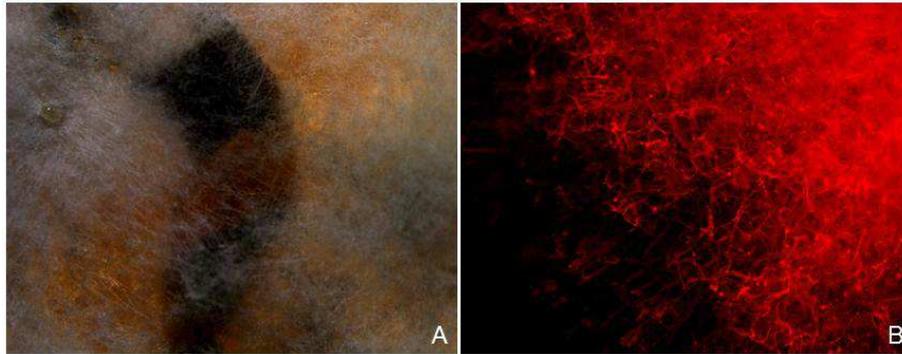
horas e (F) Plântula com sintoma de encurtamento dos entrenós e superbrotamento.

Em relação à trajetória do patógeno em plântulas infectadas, que foi avaliado com auxílio do plaqueamento de fragmentos vegetais em meio seletivo, foi possível observar a presença do fungo sobre o cotilédone de plântulas assintomáticas coletadas com dois DAE (Figura 8A), no maior potencial de inóculo utilizado (96 horas de exposição das sementes ao fungo) (Figura 9 A e B). No hipocótilo e cotilédone de plântulas/plantas assintomáticas, coletadas com 18 DAE (Figura 8 B), a presença do fungo foi observada nos maiores potenciais de inóculo, P3 e P4 (Figura 10 A, B, C e D). As plântulas/plantas das testemunhas não apresentaram crescimento micelial do fungo. Estas observações foram feitas cinco dias após o plaqueamento dos fragmentos de tecidos das plantas avaliadas.

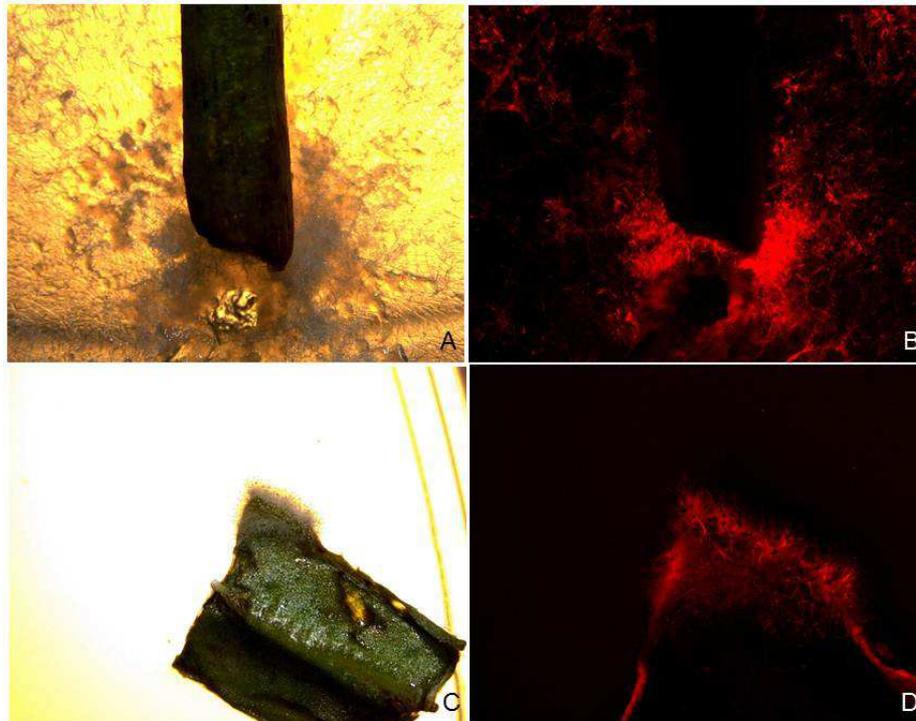
A visualização de hifas fluorescentes de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, com o auxílio de microscopia de epifluorescência, somente foi possível nos cortes transversais do hipocótilo coletado com 18 DAE (Figura 11). Nos cortes transversais da testemunha não foi observado crescimento micelial.



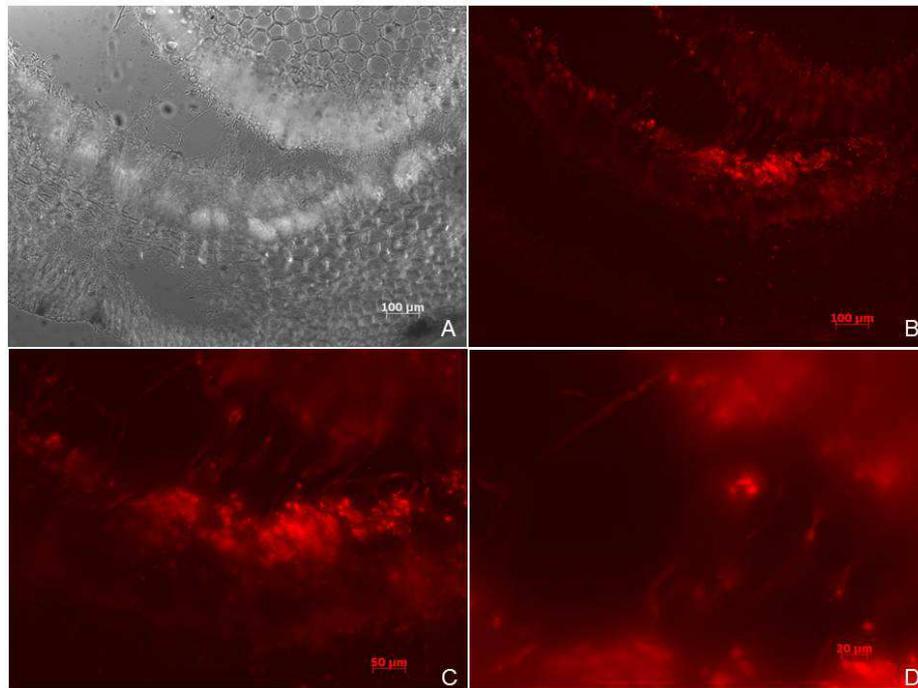
**Figura 8** – Plântulas de algodoeiro infectadas com o isolado 263 transformado com gene RFP em diferentes tempos de inoculação das sementes. (A) Plântulas com dois DAE e (B) Plântulas com 18 DAE.



**Figura 9** - Fotomicrografia de microscópio estereoscópico de fluorescência do cotilédone com crescimento micelial de *C. gossypii* var. *cephalosporioide* transformado sementes inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* transformado. (A) Potencial de inoculo P1 (B) P2 (C) P3 e (D) P4.



**Figura 10** - Fotomicrografia de microscópio estereoscópico de fluorescência do crescimento micelial de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* transformado nos tecidos de partes de plântulas de algodoeiro. (A e B) hipocótilo com filtro luz normal e com filtro de luz RFP, respectivamente; (C e D) cotilédone com filtro luz normal e com filtro de luz RFP, respectivamente.



**Figura 11-** Fotomicrografias de microscopia de epifluorescência, de corte transversal do hipocótilo de plântula com a presença de hifas fluorescentes de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* com diferentes dimensões. (A) com filtro luz normal (B, C e D) com filtro de luz RFP e aumentos de 10x, 20 e 40x, respectivamente, evidenciando a presença de hifas fluorescentes.

Pela literatura, informações sobre transformação de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* com o marcador DsRed não foram ainda relatadas.

## 6 CONCLUSÕES

A transformação genética de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* com o marcador DsRed foi alcançada com sucesso, porém o protocolo utilizado ainda requer ajustes para um uso mais extensivo desta técnica em estudos sobre relações entre o referido patógeno e sementes de algodão

Por meio do uso desta tecnologia, foi possível visualizar a colonização diferenciada dos tecidos das sementes de algodão em função de diferentes potenciais de inóculo e outros fatores que podem interferir nesta relação.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALINT-KURTI, P. J.; MAY, G. D.; CHURCHILL, A. C. L. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 9-15, Dec. 2001.

BLOEMBERG, G.V. ; O'TOOLE,G.A.; LUTGTENBERG, B.J.J.; KOLTER, R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp *Applied Environmental Microbiology* v.63, p. 4543-4551. 1997.

BOLAND, G.J.; SMITH, E.A.Variation in cultural morphology and virulence among Protoplast -regenerated isolates of *Sclerotiniam*s sclerotiorum.**Phytopathology** v.81.n.7,1991.

BOTELHO, L.S. Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein a marker for gene expression. **Science**, New York, v. 263, n. 5148, p. 802-805, Feb. 1994.

CHEN, N.; HSIANG, T.; GOODWIN, P. H. Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 113-122, Jan. 2003.

CORMACK, B.; VALDÍVIA, R. H.; FALKOW, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 33-38, July 1996.

DU, W.; HUANG, Z.; FLAHERTY, J. E.; WELLS, K.; PAYNE, G. A. Green fluorescent protein as a reporter to monitor gene expression and food colonization by *Aspergillus flavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 834-836, Mar. 1999.

DUMAS, B.; CENTIS, S.; SARRAZIN, N.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1769-1771, Apr. 1999.

FIGUEIRA, A. R. O uso de *gfp* (Green Fluorescent Protein gene) como marcador da expressão gênica. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: APLICAÇÕES NO MANEJO INTEGRADO DE FITODOENÇAS, 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. 1 CD-ROM.

FREITAG.M.; HICKEY, P. C.; RAJU N. B.; SELKERA, E. U.; READ, N.D. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 10, p. 897-910, oct. 2004.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 7, p. 743-749, July 2002.

LAGOPODI, A. L.; RAM, A. F. J.; LAMERS, G. E. M.; PUNT, P. J.; HONDEL, C. A. M. J. J. van den; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 2, p. 172-179, Feb. 2002.

LILJEROTH E, JANSSON HB, SCHAFER W,. Transformation of *Bipolaris sorokiniana* with the GUS gene and use for studying fungal colonization of barley roots. **Phytopathology** **83**, 1484–9.1993.

LORANG, J. M.; TOURI, R. P.; MARTINEZ, J. P.; SAWYER, T. L.; REDMAN, R. S.; ROLLINS, J. A.; WOLPERT, T. J.; JOHNSON, K. B.; RODRIGUEZ, R. J.; DICKMAN, M. B.; CIUFFETTI, L. M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 1987-1994, May 2001.

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

MAIER, F. J.; MALZ, S.; LOSH, A. P.; LACOUR, T.; SCHAFER, W. Development of a highly efficient gene targeting system for *Fusarium*

graminearum using the Disruption of a polyketide synthase gene as a visible marker. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, n. 6/7, p. 653-662, Nov. 2005.

OREN, L.; EZRATI, S.; COHEN, D.; SHARON, A. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1695-1701, Mar. 2003.

PEDROZO, R. Transformação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* com os genes marcadores GFP e DsRed. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Lavras, 2009.

PRASHER, D. C. Primary structure of *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 229-233, Feb. 1992.

RAJASEKARAN, K.; CARY, J. W.; COTTY, P. J.; CLEVELAND, T. E. Development of a GFP-Expressing *Aspergillus flavus* strain to study fungal invasion, colonization, and resistance in cottonseed. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 165, n. 2, p. 89-97, Feb. 2008.

ROCA M., M. G. ; MACHADO, J.C. ; VIEIRA, M.G. ; DAVIDE, L. C. ; ROCHA, M.L. . Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella- Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n.1, p. 16-20, 2004.

SIQUEIRA, C.S. Transformação de *Stenocarpella maydis* com os genes marcadores GFP e DsRed e patogenicidade dos transformados em sementes de milho . Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

SPELLING, T.; BOTTIN, A.; KAHMANN, R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Molecular General Genetics**, New York, v. 252, n. 5, p. 503-509, Nov. 1996.

SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado Brasileiro. 567 – 612p. In: Algodão no Cerrado do Brasil/ Associação Brasileira dos Produtores de Algodão – ABRAPA. 2 edição revisada e ampliada – Aparecida de Goiânia - GO: Mundial Gráfica, 2011. 1082p.

TOMBOLINI, R.; VAN DER GAAG, D.J.; GERHARDSON, B. & JANSSON, J.K. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis*

MA342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. *Appl. Env. Microbiol.* 65:3674-3680.1999

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annual Review Biochemistry**, Oxford, v. 67, n. 4, p. 509-544, Aug. 1998.

**CAPÍTULO 3 - DETECÇÃO DE *Colletotrichum gossypii* var.  
*cephalosporioides* POR MEIO DE PRIMERS ESPECÍFICOS EM  
SEMENTES DE ALGODOEIRO**

## 1 RESUMO

Os fungos *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, causadores da antracnose e ramulose, respectivamente, são morfologicamente semelhantes. A precisão na identificação entre esses dois patógenos é necessária, porém, nem sempre esta distinção tem sido possível de maneira segura. Por este motivo, estudos recentes com filogenia utilizando os genes  $\beta$ -tubulina, GPDH e a região ITS, demonstram o potencial do uso de primers específicos destes genes na distinção entre *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*, agentes causais da ramulose e antracnose em algodão. Com base em estudos anteriores realizados pela equipe envolvida com este estudo, o objetivo neste trabalho foi desenhar primers específicos de regiões estáveis dos referidos genes e testá-los pela técnica de PCR para distinção dos dois fungos em associação com sementes de algodão infectadas pelo agente da ramulose. A especificidade dos *primers* foi testada pela amplificação do DNA genômico, extraído de isolados do agente etiológico da ramulose e de outras espécies fúngicas relatadas em algodão. A sensibilidade da reação de PCR foi avaliada na detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão com níveis de infecção de 100 %, 10% e 1% e como testemunha sementes sem inoculação. Os resultados demonstraram que *primers* desenvolvidos CGCf e CGCr, foram específicos para *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e foram eficazes para a detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em amostras de sementes de algodão, com níveis de incidência do fungo variáveis na faixa de 1 a 100%.

Palavras-chave: *primers*, genes, algodão e ramulose.

## 2 ABSTRACT

The fungi, *Colletotrichum gossypii* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, causal agents of anthracnose and ramulose in cotton, are organisms morphologically similar. The accuracy in the identification of those pathogens is essential for the diagnosis of their diseases, however, the distinction between them has not always been possible in a reliable way. For this reason, recent studies on phylogeny using  $\beta$ -tubulin genes, GPDH ITS region demonstrate the potential use of specific primers to these genes in distinguishing *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and *C. gossypii*. Based on previous studies conducted by the team involved with this study, the objective in this work was to design specific primers from stable regions of those genes and to test them by PCR technique for distinguishing the two fungi in association with cotton seeds artificially inoculated. The specificity of the primers was tested by amplification of genomic DNA extracted from isolates of the etiologic agent of ramulose and other fungal species reported in cotton. The sensitivity of the PCR was evaluated for the detection of *C. gossypii* var. *cephalosporioides* cotton seed with different levels of infection and seeds with no infection. The results demonstrated that designed primers, CGCF CGCR, were specific for *C. gossypii* var. *cephalosporioides* and were effective for the detection of this fungus in cotton seed samples, with incidence levels of the pathogen in the range of 1 to 100%.

Keywords: primers, genes, cotton and ramulose.

### 3 INTRODUÇÃO

Os fungos *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, causadores da antracnose e ramulose respectivamente em algodão provocam danos variados nesta cultura, sendo ambos organismos transmitidos pelas sementes e, morfológicamente, semelhantes (Pizzinatto et al., 1994; Chitarra, 1996)

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 *Glomerela cingulata*. A variedade *cephalosporioides*, agente etiológico da ramulose, foi relatada por Costa & Fraga (1937) e descrita por Costa em 1946 (Viégas, 1946), sendo identificada primeiramente no estado de São Paulo, associada ao sintoma de superbrotamento do algodoeiro, o que não era observado entre os causadores de antracnose e em outras espécies vegetais.

A taxonomia de *Colletotrichum* tem sido alvo de muita discussão pela variabilidade das espécies classificadas neste gênero, havendo, por conseguinte grandes dificuldades na identificação e separação destes organismos. Tradicionalmente a identificação dos membros do referido gênero tem sido baseada em algumas características morfológicas, com ênfase em morfometria dos conídios, coloração da colônia, taxa de crescimento micelial e patogenicidade (Tozze Junior et al., 2006). Especificamente para o complexo *Colletotrichum* associado a algodão nem sempre se consegue discernir com clareza quais são os patógenos envolvidos na sintomatologia de ramulose e antracnose (Chitarra, 1996).

A precisão na identificação entre *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* é necessária e imprescindível para a adoção de medidas de controle das doenças envolvidas, além da demanda por métodos de detecção

destes fungos em amostras de sementes em atividades de rotina de laboratório (Chitarra, 1996, Carvalho, 2005; Frederick et al., 2002; Ma & Michailides, 2006).

A aplicação de técnicas moleculares tem sido amplamente considerada para a determinação de variabilidade genética e distinção de espécies de fungos. Atualmente, a técnica de PCR tem sido empregada em associação com as características morfológicas para as referidas finalidades (Massola Junior, 2004).

Relatos na literatura têm demonstrado a importância da aplicação da técnica de PCR para a detecção direta de fungos e outros organismos em associação com sementes (Barrocas et al, 2008; Munkvold, 2009). Aplicação desta tecnologia tem sido bem sucedida para a detecção, por exemplo, de *Rynchosporium secalis* em amostras assintomáticas de sementes de trigo (Lee et al. 2001), *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* em sementes de manjericão, pela qual foi possível distinguir este organismo de outras *formae speciales* e de outros fungos associados às sementes dessa cultura. Neste trabalho, a sensibilidade dos marcadores PCR foi aumentada com mais uma etapa de reação, denominada NESTED-PCR (Chiocchetti et al., 2001).

Barrocas et al., (2012) em estudo com o complexo *Sternocarpella* associado a sementes de milho observaram que *primers* utilizados para detecção dos membros deste complexo foram sensíveis em níveis de incidência dos organismos até 2% das sementes infectadas, porém, não foram sensíveis para distinguir *S. maydis* de *S. macrospora*. No estudo, também, mostrou - se que a técnica de PCR foi sensível para detectar *Stenocarpella*, tanto na cultura pura como em associação com a semente.

Em relação à construção dos *primers*, utilizados para detecção de fungos em geral, em diversos trabalhos tem sido considerado o uso de sequências específicas da região ITS1, como nos casos da identificação de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (Afanador-Kafuri et al., 2003; Freeman et al.,

1999), *A. alternata* e *A. radicina* em sementes de cenoura (Konstantinova et al., 2002).

Estudos voltados para o uso de técnicas moleculares no complexo *Colletotrichum* associado ao algodão, têm se limitado ao uso de marcadores moleculares tipo RAPD e AFLP com o intuito de se avaliar o grau de variabilidade genética destes organismos. Em estudos preliminares, Mehta et al. (2001) confrontaram resultados de avaliações morfológicas e de técnicas moleculares de ERIC- e REP-PCR, na tentativa de distinguir isolados do referido complexo, chegando à conclusão de que não houve a diferenciação entre *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. Posteriormente, Silva-Mann et al (2002, 2005) por meio de técnicas de RAPD e AFLP demonstraram uma alta variabilidade genética entre três isolados de *C. gossypii* e oito isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Estudos mais recentes têm sido conduzidos com o intuito de verificar a variabilidade genética de *C. gossypii* e de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* utilizando as técnicas de RAPD-PCR, ERIC- e REP-PCR e PCR-RFLP da região ITS do rDNA. Os resultados desses estudos demonstram que as três técnicas moleculares utilizadas não foram suficientes para distinguir isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (Mehta e Mehta, 2010).

Mais recentemente, estudos desenvolvidos no Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, baseado em filogenia das regiões genômicas ITS, B-Tubulina e GAPDH, revelam que por alguns desses marcadores é possível distinguir o agente da ramulose do causador da antracnose do algodão (Salustiano et al., 2012).

Diante do nível de conhecimento que se dispõe sobre a diagnose molecular de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e em face a demanda de métodos de maior precisão e rapidez para a detecção deste fungo em amostras de sementes de algodão, o alvo neste trabalho foi desenvolver um par de *primer*

específico para este caso, tendo se como base a existência de seqüências já conhecidas e depositadas no GenBank para este organismo, as quais foram o resultado de estudos recentes desenvolvidos pelos membros da equipe de pesquisadores dos setores de Patologia de Sementes e Micologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção dos isolados

Os isolados utilizados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e as outras espécies de fungos, encontrados em sementes de algodão, foram obtidos da coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras (Tabela 1).

**Tabela 1-** Espécies fúngicas associadas ao algodão.

<b>Código<sup>a</sup></b>	<b>Espécies</b>	<b>Origem</b>
LAPS 6	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Luziana - GO
LAPS 22	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Maracaju - MT
LAPS 23	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Maracaju - MT
LAPS 24	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Tangará da Serra - MT
LAPS 32	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT
LAPS 259	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Santa Helena de Goiás - GO
LAPS 260	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT
LAPS 261	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Pedra Preta - MT
LAPS 263	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT
LAPS 264	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Mineiros - GO
LAPS 265	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Campo Verde - MT
LAPS 266	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT
LAPS 267	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Mineiros - GO
LAPS 268	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Mineiros - GO
LAPS 269	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Nova São Joaquim - MT
LAPS 270	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Nova São Joaquim - MT
LAPS 271	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Pedra Preta - MT
LAPS 272	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Itiquira - MT
LAPS 273	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Itiquira - MT
LAPS 275	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Itiquira - MT
LAPS 276	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Itiquira - MT
LAPS 277	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT

LAPS 392	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT
LAPS 393	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT
LAPS 396	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT
LAPS 397	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT
LAPS 398	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT
LAPS 400	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT
CGC UBER	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Uberlândia - MG
CML 2325	<i>Colletotrichum gossypii</i>	Luis E. Magalhães, BA
Epicoccum	<i>Epicoccum</i> sp.	Primavera do Leste - MT
Alternaria	<i>Alternaria alternata</i>	Primavera do Leste - MT
FOV	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Vasinfecum</i>	Primavera do Leste - MT
Stemph	<i>Stemphylium solani</i>	Primavera do Leste - MT
Macroph	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Primavera do Leste - MT

a= Abreviações das coleções de culturas: LAPS = Laboratório de Patologia de Sementes. CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; KSU = *Kansas State University*, Manhattan, Kansas, EUA

#### 4.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de culturas monospóricas dos isolados crescidos durante cinco dias em meio BDA. O micélio foi raspado e macerado em nitrogênio líquido e a extração foi realizada com a utilização do Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) de acordo com o protocolo de extração de DNA recomendado pelo fabricante.

### **4.3 Desenho de *primers* específicos e confirmação da homologia dos fragmentos amplificados com o gene *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH)**

Foram gerados alinhamentos das sequências parciais do gene *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* de isolados das espécies de *Colletotrichum* previamente utilizados no trabalho de Salustiano et al., (2012), identificados como agentes etiológicos da ramulose do algodoeiro e outras espécies do complexo *C. gloeosporioides*. Região única das sequências do agente etiológico da ramulose foi utilizada no desenho de *primers* específicos. Os *primers* desenhados, CGC F (5'- CAG ACT ACA AGG CCA ACG C- 3') e CGC R(5'- GAG TCG TAC TTG AGC ATG TAG- 3') foram analisados utilizando-se o software PRIMER 3 (Rozen & Skaletsky, 2000).

### **4.4 Teste de especificidade dos *primers***

A especificidade dos *primers* foi testada pela amplificação do DNA genômico, extraído de isolados do agente etiológico da ramulose e de outras espécies fúngicas relatadas em algodão.

Os *primers* foram testados inicialmente para o agente etiológico da ramulose e, depois, com as demais espécies. Duas temperaturas de anelamento foram testadas nos ensaio de PCR, 60° e 65° C. A reação de PCR foi conduzida com 25 µL do mix para PCR OneTaq (BioLabs), 0,7 µL dos *primers* forward e reverse e 1 µL de DNA. As condições de amplificação do DNA foram de ciclos de: 94°C por 4 minutos (desnaturação inicial), 94°C por 45 segundos (desnaturação), 60°, 65° (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão), 34 ciclos e 72°C por 10 minutos (extensão final). O produto da PCR foi separado em gel de

agarose 1%. Antes de se utilizar os *primers* específicos, foi feita uma reação de PCR utilizando os *primers* universais GDF (GCC GTC AAC GAC CCCTTCATIGA) e GDR (GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT) (Templeton et al.1992) com o DNA genômico de todas as espécies utilizadas neste trabalho, para verificar a qualidade do DNA para amplificação e, dessa forma, evitar falsos positivos ou negativos.

#### **4.5 Sensibilidade da reação de PCR utilizando os *primers* desenvolvidos em amostras de sementes para estabelecimento de protocolo**

A sensibilidade da reação de PCR utilizando os *primers* desenvolvidos foi testada na detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão com diferentes potenciais de inóculo e incidências em amostras de sementes.

Lotes de 100 sementes foram preparados misturando-se as sementes artificialmente inoculadas com sementes sadias, gerando três níveis de incidência (100 %, 10% e 1%) e como testemunha sementes sem inoculação. As sementes foram maceradas em nitrogênio líquido em moinho automatizado. Para cada nível de incidência de sementes infectadas, o teste foi realizado em quatro repetições e o experimento repetido duas vezes.

##### **4.5.1- Inoculação das sementes**

Sementes de algodão da cultivar Delta Opal suscetível ao agente etiológico da ramulose foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por dois minutos, em seguida foram lavadas quatro vezes com água destilada autoclavada . As sementes foram dispostas em bandeja onde permaneceram por 24 horas até a secagem completa.

Após a secagem, as sementes foram inoculadas artificialmente com o isolado LAPS 263(CNPA 0058) de *C. gossypii* var. *cephalosporioide* fornecido pela Embrapa Algodão, coletado em 2008 em Primavera do Leste- MT. Para a inoculação das sementes foi utilizado o método de condicionamento fisiológico ou restrição hídrica (Carvalho, 1999; Costa, 2000; Machado *et al.*, 2001).

O isolado foi cultivado em placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo meio batata-dextrose-agar (BDA) modificado pela adição de manitol com potencial hídrico ajustado para -1,0 MPa, conforme Software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995), por sete dias em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, as sementes foram colocadas sobre a colônia do fungo, onde permaneceram durante 24 e 48 horas, sendo retiradas e secas em câmara de fluxo laminar por 24 horas. Como testemunhas, foram usadas sementes sem o fungo e sem incubação em substrato com restrição hídrica.

#### **4.5.2 Extração de DNA de amostras de sementes**

As amostras de sementes foram maceradas em moinho com adição de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Amostras desse pó, 0,04 g foram colocadas em microtubos de 1,5 mL em quatro repetições. A extração foi realizada com a utilização do Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) de acordo com o protocolo de extração de DNA recomendado pelo fabricante.

#### **4.5.3 Amplificação da PCR**

A reação de PCR foi conduzida com 25 µL do mix para PCR OneTaq (BioLabs), 0,7 µL dos *primers* forward e reverse e 1 µL de DNA. A amplificação do DNA foi feita em ciclos estabelecidos da seguinte maneira:

94°C por 4 minutos (desnaturação inicial), 94°C por 45 segundos (desnaturação), 65° (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão), 34 ciclos e 72°C por 10 minutos (extensão final). Uma alíquota de 10 µl foi utilizada para separar os produtos da PCR em gel de agarose 1% em tampão TBE, corado com GelRed<sup>®</sup>, a 100V por aproximadamente, 2 horas. Os produtos da PCR foram observados em transluminador UV, equipamento L-Pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas diferenças encontradas nas sequências do gene *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* de *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides*, em relação a outras espécies do complexo *C. gloesporioides*, o par de *primers* desenhado mostrou-se eficiente na amplificação do DNA do agente etiológico da ramulose do algodão. Em relação a especificidade deste par de *primers* na detecção de *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides*, observou-se que foram produzidos fragmentos específicos para este organismo de, aproximadamente, 140pb. Por outro lado, não houve amplificação com o DNA das outras espécies de fungos que ocorrem no algodoeiro (Tabela 2) (Figura 1).

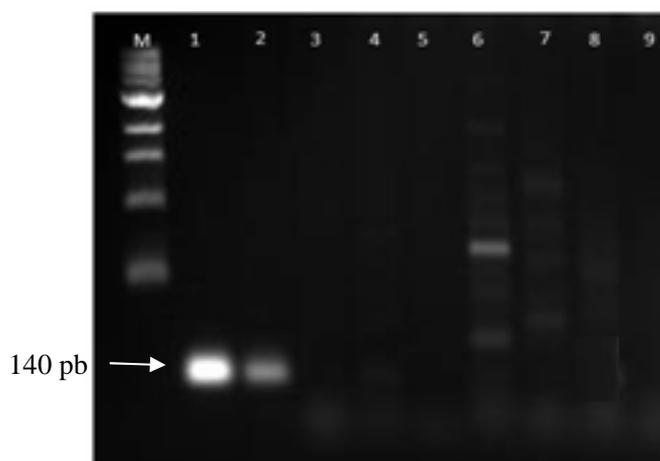
**Tabela 2** - Espécies fúngicas associadas ao algodão utilizadas no teste de especificidade do primer CGCf e CGCr.

Código <sup>a</sup>	Espécies	Origem	P1 <sup>b</sup>
LAPS 6	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Luziana - GO	-
LAPS 22	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Maracaju - MT	+
LAPS 23	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Maracaju - MT	+
LAPS 24	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Tangará da Serra - MT	+
LAPS 32	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS 259	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Santa Helena de Goiás - GO	+
LAPS 260	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS 261	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Pedra Preta - MT	+
LAPS 263	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS 264	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Mineiros - GO	+
LAPS 265	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Campo Verde - MT	+
LAPS 266	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS 267	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Mineiros - GO	+
LAPS 268	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Mineiros - GO	+

LAPS 269	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Nova São Joaquim - MT	+
LAPS 270	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Nova São Joaquim - MT	+
LAPS 271	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Pedra Preta - MT	+
LAPS 272	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Itiquira - MT	+
LAPS 273	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Itiquira - MT	+
LAPS 275	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Itiquira - MT	+
LAPS 276	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Itiquira - MT	+
LAPS 277	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS 392	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS 393	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS 396	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS 397	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS 398	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS 400	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Primavera do Leste - MT	+
LAPS UBER	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Uberlândia - MG	+
CML 2325	<i>Colletotrichum gossypii</i>	Luis E. Magalhães, BA	-
Epicoccum	<i>Epicoccum</i> sp.	Primavera do Leste - MT	-
Alternaria	<i>Alternaria alternata</i>	Primavera do Leste - MT	-
FOV	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	Primavera do Leste - MT	-
Stemph	<i>Stemphylium solani</i>	Primavera do Leste - MT	-
Macroph	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Primavera do Leste - MT	-

a = Abreviações das coleções de culturas: LAPS = Laboratório de Patologia de Sementes. CML = Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; KSU = *Kansas State University*, Manhattan, Kansas, EUA

b = (+) Amplificação na PCR e (-) Não houve amplificação na PCR.



**Figura 1-** Especificidade dos *primers* CGCf e CGCr. M- Ladder 50bp; 1 e 2 - Isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (273 e 263); 3- *C. gossypii* (CG1LEM); 4- CML 348; 5- *Epicocum* sp; 6- *Alternaria alternata*; 7- *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; 8- *Stemphylium solani*; 9- *Macrophomina phaseolina*.

Em estudos anteriores conduzidos por Chitarra (1996), voltados para variabilidade do agente da ramulose, e o agente da antracnose por meio do uso da técnica de RAPD, e análise morfológica de estruturas dos patógenos em foco verificou-se que não foi possível separar os isolados desses fungos considerando 15 *primers* utilizados, assim como, as análises morfológicas não foram suficientes para distinguir isolados de ambos os fungos.

Em outro trabalho subsequente nesta mesma linha de investigação, Silva-Mann et al. (2005) demonstraram que houve também uma variação entre os isolados dos dois membros do complexo *Colletotrichum* do algodão. Por sua vez Mehta e Mehta (2010), verificaram que as técnicas de RAPD-PCR, ERIC- e REP-PCR e PCR-RFLP da região ITS rDNA foram incapazes de distinguir isolados desses patógenos em algodão.

Vale salientar que o gene GAPDH tem sido utilizado para produção de primers por apresentar regiões conservadas que a exemplo de outros genes podem ser utilizados para a distinção e identificação de algumas espécies de fungos. No presente caso o desenho do referido par de *primers* foi realizado por meio de comparações entre as seqüências de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, agente etiológico da ramulose e de outras espécies do complexo *C. gloeosporioides* (*Colletotrichum gossypii*, *C. theobromicola*, *C. asianum*, *C. boninense*, *C. fruticola*, *C. gloeosporioides*, *C. kahawae* subsp. *kahawae*, *C. siamense*), tendo sido o mesmo denominado de CGCf e CGCr.

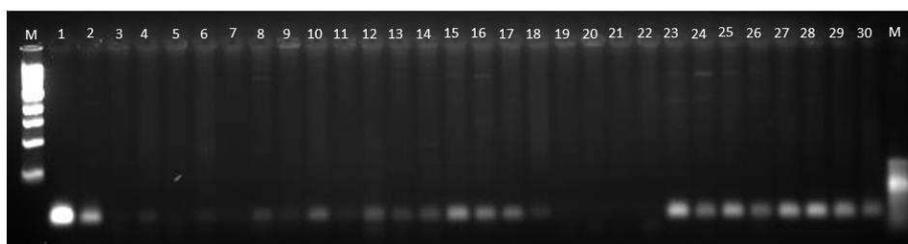
Importante também lembrar que GAPDH é um gene codificador de uma enzima de ~ 37kDa, que catalisa a sexta etapa da glicólise e assim presta - se para quebrar a glicose para as moléculas de energia e de carbono. Neste gene, pode ocorrer uma pequena variação na sequência de seus nucleotídeos, na terceira posição do códon ou na região do íntron com a taxa de substituição de nucleotídeos relativamente alta, porém, sem alterar o produto gênico (Ma & Michailides, 2006). Dessa forma, pode-se utilizar estas regiões onde ocorrem mutações específicas para a síntese de *primers* específicos para espécies de fungos.

No experimento de inoculação das sementes com diferentes potenciais de inoculo e incidência do patógeno nas sementes, o par de *primers* CGCf e CGCr, utilizado para a detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* nas amostras inoculadas, mostrou-se eficiente na detecção do patógeno com até 1% de incidência no menor potencial de inóculo (24 horas de exposição das sementes ao patógeno). Nas sementes da testemunha não houve amplificação do DNA(Figura 2).

Para outros patossistemas, a sensibilidade de detecção dos patógenos em sementes tem sido variável. Por exemplo, em estudo conduzido por Barrocas et al., (2012) *Sternocarpella* foi detectado em sementes de milho infectadas com

incidência mínima de 2% nas amostras utilizadas. Com algumas modificações do protocolo de detecção tem sido possível o aumento da sensibilidade neste caso.

Em outro estudo conduzido por Lee et al. em 2001, por meio da técnica de PCR, *Rynchosporium secalis* foi detectado em amostras assintomáticas de sementes de trigo. Por sua vez, Chiocchetti et al. (2001) conseguiram distinguir *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* de outras *formae speciales* e de outros fungos associados às sementes de manjerição. Nesse trabalho, a sensibilidade dos marcadores PCR foi aumentada com uma segunda etapa de reação, denominada NESTED-PCR.



**Figura 2-** Sensibilidade dos primers CGCf e CGCr em detectar *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em amostras de sementes de algodão com diferentes níveis de infecção. (M) – marcador 1bp; (1 e 2) - Isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (273 e 263 respectivamente); (3 a 6) - 1% de infecção com sementes inoculadas por 24 horas; (7 a 10) – 10% de infecção com sementes inoculadas por 24 horas; (11 a 14) - 1% de infecção com sementes inoculadas por 48 horas; (12 a 18) - 10% de infecção com sementes inoculadas por 48 horas; (19 a 22) - Testemunha sem a presença do fungo; (23 a 26) – 100% de sementes infectadas com inoculação de 24 horas; (27 a 30) -100% de sementes infectadas com inoculação de 48 horas; (M) - marcador Ladder 50bp.

Os produtos de PCR obtidos a partir das sementes neste estudo apresentaram bandas características conforme observadas na amplificação do DNA do patógeno em culturas puras. Desta forma os *primers* foram eficazes na detecção do agente etiológico da ramulose em sementes de algodoeiro infectadas artificialmente, indicando que não houve resultado falso positivo por contaminação. Estes *primers* permitiram a amplificação das amostras de DNAs genômicos de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* testadas, sendo eficazes na detecção do fungo em incidências de 1 a 100% nos diferentes potenciais de inoculo testados.

A acurada e rápida diagnose de doenças de plantas é de grande importância no manejo das mesmas, principalmente no estágio de sementes, o que contribui sobremaneira como parte das medidas preventivas em programas de certificação da qualidade de sementes e também no monitoramento da distribuição do patógeno pela detecção deste no tecido das plantas e na execução de procedimentos de erradicação, além de evitar o transporte de sementes infectadas de uma região para outra (Lee et al., 2001; Tooley et al., 2006).

## 6 CONCLUSÕES

A especificidade e sensibilidade do par de *primers* CGCf e CGCr, pela técnica de PCR, revelaram-se eficazes para a detecção de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em amostras de sementes de algodão, com níveis de incidência do fungo variáveis na faixa de 1 a 100%, testada neste estudo.

Para estabelecimento e aferição de protocolo de detecção do agente da ramulose em sementes de algodão, por meio da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* desenhado neste estudo, recomenda-se o uso de um maior número de amostras de sementes com contaminação/infecção natural do patógeno e com níveis menores de incidência do mesmo, além do uso de sementes com potenciais de inóculo mais baixos deste organismo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANADOR-KAFURI, L., MINZ, D., MAYMON, M., AND FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, v.93, p. 579-587, 2003.

ALMEIDA, L.C.C.; COELHO, R.S.B. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular. **Fitopatologia Brasileira**, v.32 p.318-328, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 2009.

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

BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; ALMEIDA, M.F. ; BOTELHO, L. S.; PINHO, E. V. R. V . Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp. associated to maize seeds. **Revista Brasileira de Sementes** (Impresso), v. 34, p. 218-224, 2012.

CARVALHO, E. M. Caracterização de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* associados a sementes do algodoeiro: aspectos morfológicos e moleculares. 2005. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

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.

CHIOCCHETTI, A, SCIAUDONE, L, DURANDO, F, GARIBALDI, A, AND MIGHELI, Q. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f sp *basilici* on basil. **Plant Disease**, v.85, p. 607-611, 2001.

FREDERICK, R. D.; SNYDER, C. L.; PETERSON, G. L.; BONDE, M. R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the

soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 2, p. 217–227, Feb. 2002.

FREEMAN, S.; MAIMON, M.; PINKAS, Y. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 6, p. 456-461, June 1999.

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.

MA, Z. H.; MICHAILIDES, T. J. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 145-161, 2006.

MASSOLA JÚNIOR, N. S. ; TOZZE JÚNIOR, H. J. Caracterização fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp de hortaliças solanáceas. In: XXVII Congresso Paulista de Fitopatologia, 2004, Campinas. **Summa Phytopathologica**, v. 30. p. 73-74, 2004.

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

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

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. 131-136, Jan. 1995.

MUNKVOLD, G.P. Seed Pathology Progress in Academia and Industry. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p.285- 311, 2009.

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

SALUSTIANO, M.E.; RONDON, M.N., ABREU, L.M.; COSTA, S.S.; MACHADO, J.C.; PFENNING, L. H. Ramulosis of cotton is caused by a

distinct phylogenetic lineage within the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Phytopathology**. (Submetido em Novembro de 2012).

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

SILVA-MANN, R., VIEIRA, M.G.G.C., MACHADO, J.C., BERNARDINO FILHO, J.R., SALGADO, K.C.C. & STEVENS, M.R. AFLP markers differentiate *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p. 169-172, 2005.

TOOLEY, P. W.; MARTIN, F. N.; CARRAS, M. M.; FREDERICK, R. D. Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, n. 4, p. 336-345, Apr. 2006.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; BUENO, C. R. N. C. MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. de hortaliças solanáceas. Campinas. **Suma Phytopathologica**, v. 30, p. 73-73. 2006.

VIÉGAS, A.P. Alguns fungos do Brasil XII. **Bragantia**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 1-37, Janeiro 1946.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos, envolvendo a transmissão de patógenos via sementes, assim como a correta detecção e identificação de espécies de fungos de difícil distinção, quando apresentam espécies com características morfológicas semelhantes, como é o caso dos agentes da ramulose e antracnose do algodão, em análises de rotina, são ainda incompletos e pouco conclusivos. Diante disso, torna-se evidente a necessidade de desenvolvimento de métodos que permitam esclarecer a interação entre fungos e sementes de espécies hospedeiras e que sejam eficazes para a detecção precisa e rápida destes organismos em associação com as sementes, uma vez que este tipo de associação pode causar danos irreversíveis aos sistemas de produção de sementes.

Por meio do estudo de transmissibilidade (Capítulo 1) ficou claro que as sementes de algodão são um importante veículo de disseminação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, uma vez que a taxa de transmissão por esta via atingiu níveis de 95% em condições controladas e favoráveis para que a interação deste fungo com sementes. Em se tratando de um organismo considerado uma praga não quarentenária regulamentada, estes resultados constituem um subsídio de grande significado principalmente na fase de estabelecimento de padrões sanitários, conforme tem sido proposto no país para uma série de agentes patogênicos transmitidos por sementes de espécies vegetais cultivadas.

Neste trabalho evidenciou-se também o grande potencial do uso de marcador gênico como uma ferramenta importante para estudos da interação entre *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e sementes de algodão (Capítulo 2), porém, algumas dificuldades encontradas com o protocolo utilizado recomendam a continuidade de estudos mais aprofundados nesta linha de pesquisa visando à uma adequação mais segura do protocolo de transformação em foco.

Outro ponto de extrema importância para o setor de produção e controle de qualidade de sementes de algodão, foi a comprovação da especificidade e sensibilidade do par de *primers* desenvolvido anteriormente pela equipe deste trabalho na detecção *C.gossypii* var. *cephalosporioides* em amostras de sementes de algodão (Capítulo 3). Trata-se de uma contribuição das mais aguardadas pelo sistema de controle de qualidade sanitária de sementes de algodão em razão da indisponibilidade até o momento de métodos seguros de detecção do referido fungo em amostras de sementes do algodão, que possam ser recomendadas para análises de rotina. A expectativa é de que logo após a fase de validação do protocolo em foco, este procedimento de detecção do agente da ramulose seja disponibilizado ao segmento envolvido com certificação e controle de qualidade de sementes no Brasil. Vale destacar que para a próxima etapa deste trabalho, um maior número de amostras de sementes, representativas da diversidade do cultivo do algodão no país, seja utilizado para a aferição do protocolo de detecção do patógeno em foco em sementes desta espécie.