

**GILMA SILVA CHITARRA**

**VARIABILIDADE CULTURAL DE *Colletotrichum* ASSOCIADO A SEMENTES DE  
ALGODÃO E SUA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD  
SOB CONDIÇÕES PADRÕES DO TESTE DE SANIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

Prof. Dr. JOSÉ DA CRUZ MACHADO

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1996**

**Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da  
Biblioteca Central da UFLA**

Chitarra, Gilma Silva

Variabilidade cultural de *Colletotrichum* associado a sementes de algodão e sua diversidade genética através de marcadores RAPD sob condições padrões do teste de sanidade / Gilma Silva Chitarra. -- Lavras : UFLA, 1996.

56 p. : il.

Orientador: José da Cruz Machado.

Dissertação (mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Algodão - *Colletotrichum* - Antracnose - Ramulose. 2. Diversidade genética. 3. Marcador molecular. 4. Sanidade-teste. 5. Fungo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.5194

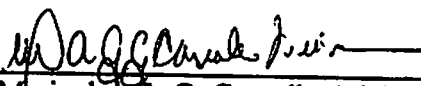
589.2

**GILMA SILVA CHITARRA**

**VARIABILIDADE CULTURAL DE *Colletotrichum* ASSOCIADO A SEMENTES DE  
ALGODÃO E SUA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD  
SOB CONDIÇÕES PADRÕES DO TESTE DE SANIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade, para obtenção do título de "Mestre".

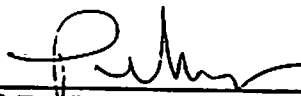
APROVADA em 30 de agosto de 1996



Prof.ª Dr.ª Maria das G. G. Carvalho Vieira



Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro



Prof. Dr. José da Cruz Machado  
(Orientador)

Ao criador, por fazer fluir em mim o seu amor;

Aos meus pais, Armando Pereira da Silva e  
Zenir Neto da Silva, pela dedicação e amor na  
minha criação;

Aos meus irmãos, Djalma, Dilma e André Luiz;  
Sogra, cunhados, demais familiares e amigos, pelo  
incentivo constante.

## **OFEREÇO**

Ao meu esposo, Luiz, e aos meus filhos,  
Cristiane e Guilherme, pelo amor,  
compreensão e tolerância em todos os  
momentos.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso.

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

A todas as empresas e cooperativas que cederam amostras de sementes para realização desta pesquisa.

Ao Professor José da Cruz Machado, pela preciosa orientação, pelo apoio e estímulo em todos os momentos.

À Professora Maria das Graças Guimarães Carvalho Vieira, pelos ensinamentos, colaboração e indispensável acompanhamento deste trabalho.

Ao Professor Hilário Antônio de Castro, pela participação, críticas e sugestões apresentadas.

Aos Professores Acelino Couto Alfenas, Silvaldo Felipe da Silveira, Adimilson Bosco Chitarra e Maria Isabel Fernandes Chitarra, pela oportunidade concedida, pelo companheirismo, pela valiosa e imprescindível contribuição.

Ao Professor Antônio Carlos Fraga, pelas informações e sugestões acrescentadas ao trabalho.

Aos professores e funcionários da UFLA, em especial aos Departamentos de Fitossanidade, Ciência dos Alimentos, Agricultura e Biologia, pelos conhecimentos transmitidos e importante colaboração.

Aos funcionários da Biblioteca Central, pelo apoio e esclarecimentos na revisão deste trabalho.

Aos amigos Sérgio, Tom, Claudine, Terezinha, Hudson, Cássia, Samara e Renata, pela ajuda durante o decorrer desta pesquisa.

Aos amigos do passado e presente, pelo incentivo, auxílio, respeito e carinho demonstrados durante toda a minha caminhada.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 Aspectos etiológicos e sintomatologia de antracnose e ramulose em algodoeiro .....	4
2.2 Detecção em sementes e diferenciação de <i>C. gossypii</i> e <i>C. gossypii</i> <i>cephalosporioides</i> .....	7
2.3 Uso de marcadores moleculares na identificação de fungos .....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1 Obtenção dos isolados de <i>Colletotrichum</i> associado a sementes de algodoeiro de diferentes procedências .....	17
3.2 Caracterização morfológica das colônias dos isolados desenvolvidos em meio BDA, sob condições do teste de sanidade de sementes .....	21
3.3 Determinação da identidade de <i>Colletotrichum</i> , através do hábito de crescimento em sementes de algodoeiro .....	22
3.4 Análise RAPD de isolados de <i>Colletotrichum</i> associados a sementes de algodoeiro .	23

3.4.1 Obtenção de micélio .....	23
3.4.2 Extração do DNA .....	24
3.4.3 Amplificação do DNA .....	25
3.4.4 Eletroforese .....	25
3.4.5 Análise dos dados .....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
4.1 Caracterização cultural de isolados de <i>Colletotrichum</i> em meio BDA .....	27
4.2 Determinação da identidade de <i>Colletotrichum</i> , através do hábito de crescimento em sementes de algodoeiro artificialmente inoculadas .....	32
4.3 Análise de RAPD de isolados de <i>Colletotrichum</i> associados a sementes de algodoeiro .....	34
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Procedência das amostras de sementes de algodoeiro e número de isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos pelo “Blotter test”. UFLA-MG, 1996	18
2	Porcentagem de fungos detectados em sementes de algodoeiro, pelo método de incubação em papel de filtro “Blotter test”. UFLA-MG, 1996 .	22
3	Agrupamentos dos isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos de sementes procedentes de várias localidades do país, através do teste incubação em papel filtro “Blotter test”, e em função de suas características culturais em meio BDA sob condições do teste padrão de sanidade de sementes. UFLA-MG, 1996 .....	28
4	Agrupamento dos isolados de <i>Colletotrichum</i> em função da coloração micelial da colônia em meio BDA pelo sistema Munsell. UFLA-MG. 1996	31

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
5	Procedências das amostras de sementes de algodoeiro, submetidas ao “Blotter test”. UFLA-MG, 1996 .....	33
6	Identificação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> ao estereomicroscópio com base no hábito de crescimento em sementes de algodão ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.) inoculados artificialmente. UFLA, MG, 1996 .....	33
7	Padrões de bandas de DNA dos trinta isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos através de RAPD. UFLA-MG, 1996 .....	35
8	Estimativas, em porcentagem, das similaridades genéticas (método Simple Matching) entre os 30 isolados de <i>Colletotrichum</i> , baseadas em dados de RAPD. UFLA, MG. 1996 .....	41
9	Estimativas das similaridades genéticas (método Simple Matching) entre 22 isolados de <i>Colletotrichum</i> , provenientes do Estado do Paraná. UFLA, MG. 1996 .....	43
10	Estimativas das similaridades genéticas (método Simple Matching) entre 8 isolados de <i>Colletotrichum</i> , provenientes do Estado de São Paulo. UFLA, MG. 1996 .....	44

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Distribuição geográfica das localidades da origem dos isolados de <i>Colletotrichum</i> nos Estados do Paraná e São Paulo. UFLA-MG, 1996 .....	19
2	Aspectos das colônias de <i>Colletotrichum</i> em meio BDA (A e B) com anéis circulares concêntricos e (C) sem a formação de anéis típicos. UFLA-MG. 1996 .....	29
3	Gel de agarose mostrando padrão dos produtos amplificados dos isolados de <i>Colletotrichum</i> procedentes dos Estados do Paraná e São Paulo, obtidos com o primer G <sub>2</sub> da marca Operon .....	40
4	Agrupamentos entre isolados de <i>Colletotricum</i> , baseados em coeficiente de similaridade Simple Matching. UFLA-MG. 1996 .....	45

## RESUMO

CHITARRA, Gilma Silva. Variabilidade cultural de *Colletotrichum* associado a sementes de algodão e sua diversidade genética através de marcadores RAPD sob condições padrões do teste de sanidade. Lavras: UFLA, 1996. 56p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)\*

O presente trabalho objetivou comparar as características culturais dos isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em meio BDA, em relação ao hábito de crescimento em sementes de algodoeiro artificialmente inoculadas com ambos os fungos sob condições padrões do teste de sanidade, bem como em relação ao grau de similaridade genética entre os isolados desses fungos procedentes dos Estados do Paraná e São Paulo, através de marcadores RAPD. Os resultados mostraram que houve variabilidade morfológica entre os isolados de *Colletotrichum* baseada em morfologia das culturas puras, bem como quanto ao hábito de crescimento sobre as sementes. O polimorfismo de fragmentos amplificados possibilitou estimar os valores de similaridade de 55% a 99% entre os isolados, indicando a ocorrência de variações genéticas. Todavia, não houve correlação entre o agrupamento baseado em morfologia e o baseado em análise RAPD.

---

\* Orientador: José da Cruz Machado. Membros: Maria das G.G.Carvalho Vieira, Hilário Antonio de Castro.

## ABSTRACT

### CULTURAL VARIABILITY OF *Colletotrichum* ASSOCIATED WITH COTTONSEEDS AND THEIR GENETIC DIVERSITY THROUGH RAPD MARKERS UNDER SEED HEALTH TEST CONDITION

The presente work was carried out with the objective to compare the cultural characteristics of *Colletotrichum gossypii* and *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* on PDA medium, in relation to their growth habit on cottonseeds inoculated artificially under the seed health test condition, as well as to verify the relationship of genetic similarity degree among some fungal isolates from Paraná and São Paulo States through RAPD markers. The results showed that there were morphologic variability among *Colletotrichum* isolates based on the morphology of pure culture and growth habit. The polimorphism of amplified fragments was able to make an estimative between 55% and 99% of similarity among the isolates, showing the occurrency of genetic variability. However, there was not correlation between the grouping based on morphology and RAPD analysis.

## 1 INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) tem grande importância econômica na agricultura brasileira por produzir a mais importante fibra têxtil natural e por fornecer diversos produtos utilizados pelo homem e pelo animal.

A produtividade média brasileira do algodoeiro em 1994/95 foi de 1.232 kg/ha (Informações Econômicas, 1995), o que representa um valor bem inferior à média potencial desta cultura que é de 4.000 kg/ha. Vários fatores podem colaborar nesta redução drástica de produtividade e de qualidade de sementes, destacando-se entre eles a interferência de várias doenças cujos agentes causais podem ser transmitidos por sementes. A antracnose, causada por *Colletotrichum gossypii* South. e a ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* Costa, são duas das mais importantes doenças do algodoeiro e responsáveis por perdas econômicas anuais de valor considerável.

A grande semelhança morfológica, assim como os sintomas de tombamento produzidos por ambos organismos, não tem permitido a identificação precisa dos mesmos quando incidem em sementes ou plântulas de algodoeiro (Costa, 1939).

Observações microscópicas sobre o hábito de crescimento dos dois fungos em sementes deslindadas e plântulas de algodoeiro podem possibilitar a diferenciação entre os organismos (Malaguti, 1955; Follin e Mangano, 1983; Tanaka, Menten e Machado, 1995). Sementes infectadas por *Colletotrichum gossypii*, durante o teste de sanidade ("Blotter test"),

apresentam uma coloração rosada devido a abundante esporulação do patógeno. O crescimento micelial mais rente ao tegumento das sementes e geralmente ocorrem setas mais curtas. Os aglomerados de conídios produzidos no ápice das setas nesta espécie são brilhantes sob a luz. Em se tratando de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, esses mesmos aglomerados de conídios são produzidos em setas muito mais longas e a colônia apresenta, nas sementes, um aspecto acinzentado e com micélio uniformemente cobrindo a superfície da semente. As setas emergem da superfície das sementes ou do micélio aéreo.

Sementes de algodoeiro naturalmente portadoras de *Colletotrichum gossypii* e/ou *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, observadas pelos métodos rotineiros ao estereomicroscópio, não tem permitido a distinção precisa entre eles, pois as espécies de um mesmo grupo apresentam formas intermediárias.

A separação dos dois fungos baseada em características culturais só tem sido feita por comparação e isto torna-se questionável em razão da existência de culturas atípicas de ambos os organismos que muitas vezes se assemelham entre si, dificultando o referencial de identificação (Tanaka, 1995).

Com o advento de técnicas moleculares, a variação genética dos organismos passa a ser estudada de maneira a resolver os problemas relacionados à taxonomia e evolução em diversas áreas da micologia. O ensaio RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma técnica viável para avaliação rotineira, devido a sua rapidez e simplicidade na identificação de agrupamentos geneticamente homogêneos (Grajal-Martin, Simon e Muehlbauer, 1993); diferenciação (Chowhurst et al., 1991; Schafer e Wostemeyer, 1992) e caracterização de populações variáveis de fungos (Vilarinhos et al., 1995). Este teste permite a avaliação da similaridade e diversidade genética entre indivíduos com base no DNA e detecta um elevado

número de caracteres que não estão sujeitos nem a alterações do meio ambiente e nem daqueles resultantes da diferenciação celular (Junghans, 1995).

Considerando-se os pontos anteriormente mencionados, o presente trabalho foi realizado, primeiramente, visando avaliar a variação cultural de isolados de *Colletotrichum* em meio BDA, bem como sua variação quanto ao hábito de crescimento sob condições do teste de sanidade padrão de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro, tendo-se em mente a aplicação dessas técnicas em análise de sanidade de rotina. Também foi objetivo deste trabalho determinar o grau de similaridade entre os isolados de *Colletotrichum* obtidos de sementes de algodoeiro procedentes dos estados do Paraná e São Paulo, através de marcadores RAPD.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos etiológicos e sintomatologia de antracnose e ramulose em algodoeiro

*Colletotrichum* é um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Segundo Bailey e Jeger (1992), existem aproximadamente 900 espécies descritas. O gênero *Colletotrichum* envolve inúmeras espécies pertencentes à subdivisão Deuteromycotina, ordem Melanconiales, classe Coelomycetes e engloba fungos que formam os conídios em acérvulo, estrutura característica que rompe a epiderme ou cutícula de plantas hospedeiras, quando produzida na natureza.

Espécies do gênero *Colletotrichum* produzem tipicamente conídios unicelulares hialinos e alongados com extremidades arredondadas. Os conídios podem ser retos ou alantóides; as setas pontiagudas, coloração castanha, podendo ser férteis, encontrados mais comumente nos acérvulos (Ainsworth, Sparrow e Sussmar, 1973; Alexopoulos e Mims, 1962; Muchovej e Muchovej, 1989; Menezes e Oliveira, 1993).

Na literatura fitopatológica, *Colletotrichum gossypii* e o teleomorfo *Glomerella gossypii* ficaram separados de *C. gloeosporioides* e *G. cingulata* (Watkins, 1981) mas, inicialmente, pensava-se tratar de mesma espécie (Von Arx, 1957). Existem mais evidências morfológicas e culturais suportando a manutenção de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* como um grupo distinto (Sutton, 1992).

*Colletotrichum gossypii* South., agente causal da antracnose e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* Costa, agente causal da ramulose, são dois dos mais importantes patógenos do algodoeiro. Ambos são frequentemente transportados, tanto externa como internamente, pelas sementes de algodão que se constituem na principal via de disseminação desses patógenos (Lima et al., 1985; Tanaka, 1995).

Costa (1939), utilizando sementes inoculadas artificialmente com *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, observou diferenças na reação das plantas a cada um dos patógenos. Ambos os organismos causam tombamento de pré e pós emergência, atacando o hospedeiro sempre no início do seu desenvolvimento, ocasionando redução do estande. *Colletotrichum gossypii* causa lesões escuras e deprimidas nas maçãs do algodoeiro, envolvendo todo o fruto. O fungo infecta as sementes que, posteriormente, ao germinarem, originam plântulas com lesões avermelhadas na região do colo e raiz enegrecida. As plântulas podem reagir ou morrer, provocando reduções no estande (Bitancourt, 1935; Pizzinatto, 1987; Dudienas, 1990; Teixeira, 1995).

Por sua vez, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* manifesta os sintomas mais rapidamente: em plantas jovens e adultas os sintomas são caracterizados por superbrotamento dos galhos, o que confere à planta um aspecto ramalhudo, um porte mais baixo, galhos contorcidos e dilatados, folhas encarquilhadas e deformadas. As folhas apresentam áreas cloróticas que evoluem para lesões necróticas arredondadas, alongadas ou angulares, e, às vezes, acompanhadas de perfurações. As lesões necróticas, deprimidas ou elevadas, algumas vezes fendilhadas, são observadas nas hastes e nos pecíolos das folhas. O patógeno causa a morte da gema apical, estimulando as gemas axilares a formarem número excessivo de galhos, reduzindo conseqüentemente a frutificação. (Abrahão e Costa, 1949; Abrahão, 1961; Drummond, 1961; Kimati, 1980, Costa e Fraga Júnior, 1937; Tanaka, 1990; Dudienas, 1990; Tanaka, 1995).

A ramulose reveste de importância maior, em virtude das perdas que ocasiona à cultura do algodoeiro (Kimati, 1980; Watkins, 1981; Tanaka, 1991; Santos, Zambolin e Batista, 1993; Pizzinatto, Cia e Fuzato, 1991). Dependendo da susceptibilidade da variedade e das condições climáticas, especialmente o alto índice pluviométrico e temperaturas entre 25 a 30°C (Kimati, 1980; Carvalho et al., 1984, 1986), a produção pode se reduzir fortemente ou ser quase nula (Abrahão, 1952; Abrahão e Costa, 1949, Cia, 1977).

Descrições da sintomatologia das duas doenças, antracnose e ramulose, apresentadas com base na patogenicidade dos isolados, muitas vezes não são suficientes para a separação dos dois patógenos. Follin e Mangano (1983) relataram resultados divergentes a Costa (1939), ou seja, *Colletotrichum gossypii*, agente causal da antracnose, provocou uma mortalidade mais rápida e mais forte em plantas.

Devido a variação em patogenicidade entre isolados de ambos os patógenos, Dudienas (1990), Tanaka (1990) e Tanaka e Menten (1991) evidenciam que este teste possui característica variável em função do isolado utilizado, podendo-se encontrar isolados de ambas as doenças com o mesmo nível de patogenicidade em plantas jovens. Portanto, a patogenicidade em plantas jovens não fornece informações seguras para auxiliar na diferenciação dos fungos *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Follin e Mangano, 1983; Dudienas, 1990).

Tendo em vista o aumento da importância da ramulose no cultivo de algodoeiro, é fundamental que o seu agente causador seja identificado nas sementes, durante a análise de sanidade de rotina em laboratório. Até o momento, em resultados dos testes de rotina de sementes de algodão, apenas se relata a presença de *Colletotrichum gossypii*, sem que se considere a presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

## **2.2 Detecção em sementes e diferenciação de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides***

Os testes de sanidade de sementes têm como fundamento estimular os patógenos a produzir estruturas típicas na superfície das sementes, permitindo ao analista a sua identificação rápida e segura e, deste modo, indexando lotes contaminados com patógenos, permitindo ao produtor tomar a decisão correta em função de legislação pertinente ou recomendações técnicas aplicáveis (Brasil, 1992; Neergaard, 1977; Machado, 1988; Sobreira, 1988; Lucca Filho, 1987).

Neergaard (1977), Sobreira (1988) e Machado (1988) evidenciam o teste de Incubação em Papel de Filtro e em meio ágar, como a metodologia mais empregada para detecção de fungos em sementes de algodão.

O método do papel de filtro pode ser utilizado para todos os tipos de sementes, tendo a vantagem de detectar um grande número de fungos associados à amostra. Através deste método, é possível avaliar os tipos, a frequência e o potencial de ocorrência de agentes fitopatogênicos presente nas sementes.

Entretanto, o método de incubação em papel de filtro apresenta certas limitações, entre elas a dificuldade na detecção e identificação de fungos, quando se trata de subespécies, variedades, raças e até mesmo espécies morfológicamente próximas, devido a semelhança da maioria das características morfológicas desses agentes (Tanaka e Menten, 1988; Tanaka, 1991; Tanaka, 1995; Vieira, 1996).

Machado e Langerak (1993) questionam a utilização do método de sanidade por Incubação em Papel de Filtro para sementes de algodoeiro, da forma como é recomendado, envolvendo o pré-tratamento de sementes com um desinfestante. Neste caso, constata-se a

remoção de parte do inóculo superficial de fungos patogênicos presentes nas sementes. Por outro lado, ressaltam também que o método favorece a ocorrência de contaminações secundárias entre sementes adjacentes por fungos como *Rhizopus stolonifer* e *Botryodiplodia theobromae*, dificultando o exame das sementes. Portanto, modificação do método convencional através da incorporação de produtos químicos - dichloram, iprodione e 2,4 D sal de sódio - ao papel substrato faz com que fungos de crescimento rápido, incluindo patogênicos e saprófitos, não interfiram na ocorrência de outros, dispensando o pré-tratamento das sementes e tornando o método mais realístico.

Naves, Chitarra e Machado (1995), comparando a eficiência do “Blotter test” convencional e o “Blotter test” modificado na detecção diferencial de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em amostras de sementes de algodoeiro inoculadas com esses fungos, demonstram que a análise de sementes através de “Blotter test” modificado apresenta vantagens em relação ao “Blotter test” convencional sob vários aspectos: maior sensibilidade na detecção dos fungos, tempo de análise e redução da interferência de fungos de crescimento rápido. E, ainda, revelam que o “Blotter test” convencional e o “Blotter test” modificado são igualmente eficientes na distinção entre *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, em análise do hábito de crescimento de cada fungo sob condições do teste de sanidade padrão.

No Brasil, vários trabalhos foram conduzidos na tentativa de diferenciar *Colletotrichum gossypii* de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, visando fornecer subsídios à taxonomia desses dois fungos.

Dudienas (1990), realizando estudos sobre caracterização morfológica, auxanográfica e patogênica de ambos os organismos, verificou que os mesmos são semelhantes quanto a presença de um núcleo, em conídios de *Colletotrichum* isolados de lesões de ramulose

e antracnose. Em relação às dimensões dos conídios, todos os isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* neste trabalho apresentaram um comprimento médio maior que os isolados de *Colletotrichum gossypii*, utilizando as classes de medida de 13, 14 e 16  $\mu\text{m}$ . Alguns isolados do fungo da ramulose e da antracnose podem, no entanto, apresentar os mesmos comprimentos médios de conídios, o que dificulta sua distinção, se comparados com o seu padrão. Dudienas (1990) demonstra que apenas o fungo, agente causal da ramulose, apresentou 18,7% dos conídios com comprimento acima de 16  $\mu\text{m}$ . Conforme Follin e Mangano (1983), os conídios de ambos os fungos apresentaram comprimento médio de 15 a 16  $\mu\text{m}$ , com variação de 10 a 20  $\mu\text{m}$ . Referente a largura dos conídios, esta característica é inviável para sua separação, pois os dois fungos foram muito semelhantes, variando de 3 a 5  $\mu\text{m}$ .

Em relação a diferenciação dos dois fungos, considerando os apressórios, Dudienas (1990) relata a semelhança entre ambos. Em estudos com outras espécies de *Colletotrichum*, este aspecto morfológico tem auxiliado nos trabalhos de diferenciação. Sutton (1968) relata as características de *Colletotrichum graminicola* que são: a presença de um grande número de apressórios, coloração amarronzada e borda muito irregular medindo 17,5 - 20 (-30) x 12,5 - 14  $\mu\text{m}$  (Mordue citado por Bailey e Jeger, 1992; Sutton, 1980; Baxter, van der Westhuizen e Eicker, 1983; Baxter e van der Westhuizen (1984); Holliday, 1980; Holliday, 1989).

Segundo relato de Viégas (1946), Costa (1939) observou que *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* produz colônias com raios curvos e de aparência gelatinosa. Malaguti (1955) cita que, quando trabalhou com isolados do fungo da ramulose, contrariando os estudos de Viégas (1946), encontrou variações morfológicas como coloração das culturas, tipo de micélio e presença ou ausência de anéis circulares, colônias que apresentavam raios mais

ou menos diferenciados sem apresentar a forma curva. Follin e Mangano (1983) também não observaram em culturas do agente da ramulose os raios curvos das colônias.

Características da cultura de *Colletotrichum gossypii* constituem-se de crescimento geralmente mais uniforme, superfície mais homogênea e coloração rosada devido ao grande número de conídios formados. Culturas de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* são, em geral, mais escuras, tendendo aos tons pardos, acinzentados ou cinza esverdeado, com aspecto granuloso e menor esporulação (Malagutti, 1955; Follin e Mangano, 1983). Baseando-se nessas descrições, não é possível a separação segura de ambos os patógenos, uma vez que culturas atípicas de um dos organismos, devido a diferenças acentuadas quanto à esporulação, taxa de crescimento, pigmentação, forma e relevo das colônias, etc, podem se assemelhar com culturas do outro fungo (Lima, 1981; Tanaka, 1990).

Diante das dificuldades observadas por diversos autores, Tanaka e Menten (1988); Tanaka (1991) e Tanaka (1995) evidenciaram que algumas características em relação ao hábito de crescimento dos dois patógenos podem ser empregadas para distinguir ambos *Colletotrichum* sobre sementes deslintadas de algodoeiro, inoculadas artificialmente com *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Tanaka (1991) observou conídios produzidos nos conidióforos curtos do acérvulo, formando a massa conidial gelatinosa como também nos ápices de algumas setas. Na superfície das sementes, os acérvulos raramente são visíveis, as setas são flexuosas, podendo ser ramificadas, isoladas ou em tufos. Os conídios podem ser vistos brilhantes sob a luz, nos ápices das setas, aderidos uns aos outros, isto é, aglomerados em arranjos semelhantes a cachos. Em sementes com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, as setas que emergem do tegumento são mais altas e menos densas. É freqüente a presença de setas férteis no micélio, funcionando como conidióforos. As setas são escuras e numerosas demonstrando, portanto, a tonalidade acinzentada e aspecto menos

compacto das sementes. Comparativamente, em sementes com *Colletotrichum gossypii* os conídios são formados, predominantemente, em conidióforos curtos e hialinos, frequentemente ramificados, no topo dos quais ficam aderidos, formando aglomerados. As sementes exibem uma coloração mais rosada em decorrência da abundante esporulação, as setas são mais curtas do que em *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e o micélio geralmente é escasso, resultando em um crescimento mais rente ao tegumento.

Segundo Vieira (1996), essas semelhanças estruturais entre os fungos da antracnose e da ramulose, observadas pelos métodos rotineiros, não têm permitido distingui-los com a segurança requerida.

### **2.3 Uso de marcadores moleculares na identificação de fungos**

Métodos tradicionais para a identificação de fungos envolvem estudos de sua morfologia, teste de patogenicidade e mais frequentemente crescimento em cultura. Estes métodos são geralmente lentos e não tem se mostrado sensíveis na identificação e diferenciação de fungos quando se trata de níveis taxonômicos como: subespécies, variedades e raças.

O estudo genético de qualquer organismo necessita da presença de caracteres ou marcadores. Marcadores morfológicos, apesar de serem úteis em estudos de laboratório, são raros e pouco observados em populações naturais de fungos, envolvendo número limitado de alelos, possuindo efeitos fenotípicos freqüentes e adversos (Junghans, 1995).

Técnicas moleculares tem sido amplamente empregadas visando analisar a diversidade genética entre organismos, tais como os marcadores moleculares de proteínas (isoenzimas) e marcadores de DNA, como RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphisms), PCR (Polymerase Chain Reaction) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).



As isoenzimas são enzimas com forma molecular diferente que catalizam uma mesma função e são codificadas por diferentes locos gênicos, que podem ser utilizadas como marcadores codominantes. Baseiam na migração de proteínas em um suporte de gel em função de suas cargas elétricas e das suas estruturas, seguida por processos de coloração baseados na atividade específica de cada enzima (Markert e Moller, 1959; Alfenas et al., 1991). Esta técnica foi utilizada na distinção de isolados agressivos ou raças de patógenos (Bernier, Jeng e Hubbes, 1983; Jeng e Hubbes, 1983; Huettel, Dickson e Kaplan, 1983; Jeng, Bernier e Brasier, 1988). Pode ser utilizada em estudos genéticos e filogenéticos de organismos superiores e fungos fitopatogênicos (Alfenas et al., 1991; Micales, Bonde e Peterson, 1986), apresentando potencialidade na caracterização de raças de fitopatógenos (Alfenas et al., 1987; Kim, Martens e Howes, 1984; Kimura e Dianese, 1983), nos estudos genéticos e evolução de fungos fitopatogênicos (Brommonschenkel, Alfenas e Matsuoka, 1987; Burdon et al., 1982; Tooley, Fry e Gonzalez, 1985).

Em *Colletotrichum orbiculare*, Rego, Maffia e Alfenas (1994) realizaram estudo de variabilidade por meio de isoenzimas e de reação de variedades diferenciadoras. Desenvolveram eletroforese em gel de amido, empregando diferentes sistema/tampão gel/eletrodo e testaram 11 enzimas, sendo que 9 apresentaram boa resolução. Os autores concluíram que o uso de isoenzimas foi importante, pois confirmou que a variabilidade dos isolados ocorre devido às diferenças genotípicas e não por diferenças nos métodos de inoculação, avaliação e estágio de desenvolvimento da cultura e das plantas diferenciadoras. Com o objetivo de identificação, caracterização e diferenciação, vários estudos foram feitos com diversas espécies do gênero *Cylindrocladium* (Crous, Alfenas e Wingfield, 1993; Crous, Philips, Wingfield, 1992; El-Gholl et al., 1992; Crous, Wingfield e Alfenas, 1993; Hodges, Alfenas e Ferreira, 1986; Crous et al., 1993).

Recentemente, a caracterização genética de microrganismos tem sido feita com o uso de marcadores moleculares baseados em DNA. Como vantagens sobre outros tipos de técnicas, a análise do DNA por RFLP, PCR e RAPD apresenta número praticamente ilimitado de marcas a serem detectadas, além de não sofrerem variação em função do estágio de desenvolvimento do organismo e do tipo de tecido utilizado, bem como influência das condições ambientais (Neale et al., 1992).

Para estudo mais detalhado sobre a variabilidade genética existente em organismos, principalmente naqueles onde a variabilidade não é tão aparente e mesmo para aqueles onde há dificuldade de classificação, autores utilizam nestes estudos, tanto o DNA genômico (total), como DNA nuclear, ribossomal ou mitocondrial (Braithwaite, Irwin e Manners, 1990; Guthrie et al., 1992; Förster, Oudemans e Coffey, 1990; Schesser, Luder e Henson, 1991).

A técnica RFLP, que significa polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição, vem sendo empregada para investigar relações filogenéticas de fungos fitopatogênicos em vários níveis taxonômicos (Coddington e Gould, 1992). Consiste no uso de enzimas de restrição que cortam o DNA em sítios específicos e uso de sondas marcadas para identificar os fragmentos.

Um dos primeiros estudos de taxonomia dos fungos foi demonstrado por Kozłowski e Stepien (1982) utilizando mt DNA, em sete espécies de *Aspergillus*. Estes autores encontraram diferenças distintas no padrão de bandas entre os fragmentos de *A. awamori*, *A. niger*, grupo de *A. nidulans* (*A. nidulans* e *A. echinulatus*), grupo de *A. flavus* (*A. oryzae*, *A. tamarii*) e *A. wentii*.

Förster, Oudemans e Coffey (1990), trabalhando com isolados de seis espécies de *Phytophthora* originados de várias partes geográficas e plantas hospedeiras, estudaram a extensa variabilidade subespecífica dos isolados através de análise mt DNA e DNA total. Neste estudo,

utilizando a técnica de RFLP de mt DNA, foi possível a distinção entre todas as espécies de *Phytophthora* e a constatação da existência de grupos subespecíficos. Um grupo de sete isolados de *Phytophthora citrophthora* de citrus da Austrália, Califórnia e África do Sul apresentaram padrões de fragmentos de bandas idênticos, que foram distintos de outros isolados *P. citrophthora*. Resultados semelhantes foram observados ainda neste estudo com cinco isolados de *Phytophthora* de cacau oriundos do Brasil. Segundo os autores, dois grupos de *Phytophthora megakarya* foram aparentemente distintos, sendo um grupo procedente da Nigéria e outro de Camarões. Este trabalho mostrou também pequena variação subespecífica entre isolados de *Phytophthora palmivora* ou *Phytophthora parasitica*, apesar da larga gama de isolados testados.

O polimorfismo de fragmentos clivados do rDNA de 87 isolados de *Rhizoctonia solani* mostrou-se consistente com a classificação intra-específica usual, baseada na anastomose de hifas (Vilgalys e Gonzalez, 1990). A similaridade dos padrões de restrição, dentro dos grupos intra-específicos, constitui uma forte evidência da homogeneidade genética dos mesmos.

Braithwaite, Irwin e Manners (1990) utilizaram RFLP para estimar a origem dos tipos A e B da espécie *Colletotrichum gloeosporioides* e as relações genéticas entre eles. Fungo causador da antracnose em culturas de *Stylosanthes* spp, o tipo A ocorre em muitas espécies desta cultura e caracteriza-se por lesões nas folhas e caules. O tipo B ocorre somente em *Stylosanthes guianensis* e causa necrose generalizada na planta. Oito isolados, quatro de cada tipo, de origem australiana, foram hibridizados com sonda heteróloga de DNA ribossômico de *Aspergillus nidulans* e sondas homólogas constituídas de fragmentos de DNA randômicos de tipos A e B. Com base nos padrões de bandas, os dois tipos puderam ser distinguidos, claramente. Paralelamente, com estudos morfológicos, bioquímicos e etiológicos, os autores concluíram que os dois tipos são populações distintas na região da Austrália.

Coddington e Gould (1992); Ball e Reeves (1992); Förster et al. (1993), no entanto, comentam a complexidade desta técnica, que apresenta algumas desvantagens como: custo elevado, necessidade de radioisótopos e complexa para ser utilizada em rotina.

A amplificação de DNA usando a reação da Polimerase em cadeia (PCR) foi descrita por Saiki et al. (1985). Um dos primeiros usos do PCR em estudo de fungos foi a amplificação das seqüências do DNA ribossomal (rDNA) e a determinação de sua relação evolutiva (White et al., 1989).

O PCR (Polymerase Chain Reaction ou Reação da polimerase em cadeia), surgiu como uma técnica alternativa ao uso de radioisótopos. Baseia-se na amplificação de fragmentos específicos de DNA, que são visualizados sob luz ultravioleta. Para a utilização dessa técnica é necessário o conhecimento prévio da seqüência nucleotídica dos fragmentos a serem amplificados para a síntese dos primers, o que a torna difícil de ser utilizada (McPherson, Quirke e Taylor, 1992).

Em estudos com PCR na identificação e detecção de fungos, Schesser, Luder e Henson (1991) trabalharam com todos os fungos *Gaeumannomyces graminis* detectados de plantas cultivadas de solos infestados e sem infestação. Sherriff e Bailey (1991) seqüenciaram DNA ribossomal por PCR de 18 isolados de espécies de *Colletotrichum*, a maioria de gramíneas tropicais e leguminosas, agrupando os isolados em 3 grupos distintos. Outros autores utilizaram PCR, como Rollo, Salvir e Torchia (1990), trabalhando com *Phoma tracheiphila* e Mills, Sreenivasaprasad e Brown (1992), trabalhando com *Colletotrichum gloeosporioides*, envolvidos na identificação de fungos por PCR.

Outro tipo de marcador molecular foi desenvolvido concomitantemente por dois grupos independentes, sendo denominado RAPD (Williams et al., 1990) ou AP-PCR (Welsh-McClelland, 1990).

A metodologia RAPD baseia-se na técnica de PCR, porém utiliza oligonucleotídeos com seqüência de nucleotídeos única e arbitrária, de pequeno tamanho (nove ou dez nucleotídeos), composição de bases G + C igual ou superior a 50% e menor temperatura de pareamento. A análise tem sido útil para mapeamento genético e estudos de taxonomia e evolução e trata-se de uma técnica altamente precisa e sensível. Diferenças de um nucleotídeo entre o primer e o DNA molde podem resultar em diferentes fragmentos amplificados (Williams et al., 1990).

As características do ensaio RAPD como simplicidade, rapidez, baixo custo e segurança, comparadas com os marcadores RFLP, vem acelerando a aplicação de marcadores moleculares em estudos biotecnológicos.

Em fungos, esta técnica já foi utilizada para a caracterização genética de isolados de *Fusarium graminearum* (Ouellet e Seifert, 1993) e raças de *Fusarium oxysporum* f.sp *pisi* (Grajal-Martin, Simon e Muehlbauer, 1993), assim como para *Cochliobolus carbomum* (Jones e Dunkle, 1993). Schafer e Wostemeyer (1992) utilizaram marcadores RAPD para a separação entre isolados agressivos e não-agressivos de *Phoma lingam*. Guthrie et al. (1993) utilizaram-na para a diferenciação de *Colletotrichum graminicola*, Chowhurst et al. (1991) trabalharam na diferenciação de 2 raças de *Fusarium solani* f.sp. *curcubitae* e Vilarinhos et al. (1995) utilizaram para a caracterização de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*.

RAPD tem mostrado resultados satisfatórios para a identificação e caracterização genética e sua utilização constitui-se em uma opção valiosa e viável aos diferentes tipos de análise em fungos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitossanidade e Laboratório de Biotecnologia de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA), no período de outubro de 1995 à agosto de 1996.

#### 3.1 Obtenção dos isolados de *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro de diferentes procedências

Em razão da complexidade de se distinguir, no início, *Colletotrichum gossypii* de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, considerou-se a identidade dos isolados obtidos como *Colletotrichum*.

Foram analisadas 27 amostras de sementes procedentes de várias localidades do país, através do teste incubação em papel de filtro ("Blotter test"), obtendo-se diferentes isolados, conforme Tabela 1.

Na Figura 1 encontra-se a distribuição geográfica das localidades de origem dos isolados dos Estados do Paraná e São Paulo.

TABELA 1. Procedência das amostras de sementes de algodoeiro e número de isolados de *Colletotrichum* obtidos pelo "Blotter test". UFLA-MG, 1996.

Amostra	Procedência		Cultivar/Linhagens	Nº de Isolados de <i>Colletotrichum</i> sp.
	Estado	Cidade		
1	PR	Andirá	IAPAR 71-PR3	11
3	PR	Andirá	IAPAR 71-PR3	3
4	PR	Andirá	IAPAR 71-PR3	7
5	PR	Cambará	IAPAR 71-PR3	4
6	PR	Andirá	IAPAR 71-PR3	9
9	PR	Andirá	IAPAR 71-PR3	1
10	PR	Itambaracá	IAPAR 71-PR3	6
11	PR	Campo Mourão	L 001 IAC 20	28
12	PR	Campo Mourão	L 010 IAC 20	21
13	PR	Campo Mourão	L 016 IAC 20	11
15	PR	Londrina	IAC 20 PR	22
16	PR	Jataizinho	PRO3	8
17	PR	Assaí	PRO3	14
20	PR	Itambaracá	IAPAR 71-PR3	3
21	PR	Cambará	IAPAR 71-PR3	11
22	PR	Itambaracá	IAPAR 71-PR3	5
23	PR	Andirá	IAPAR 71-PR3	1
2	SP	Ibitinga	IB 007/95 IAC20-A	30
7	SP	Lucélia	Lu 012/95 IAC-21	3
8	SP	Inúbia Paulista	Lu 010/95 IAC-20	16
14	SP	Ibitinga	IB 010/95 IAC-20	21
18	SP	Cervalinho	IB 013/95 IAC 21-A	8
19	SP	Ibitinga	IB 002/95 IAC-20-A	24
25	SP	Ituverava	IAC-20	1
24	MG	Capinópolis	IAC-21	1
26	PB	Bom Sucesso	CNPA Precoce 1	1
27	PB	São J. do Bonfim	CNPA 7H	1
<b>Total</b>				<b>271</b>

Para o isolamento, as amostras foram deslindadas quimicamente pela adição de 200 ml de ácido sulfúrico comercial concentrado (96-98° GL) por quilo de sementes, seguido de agitação com bastão de vidro durante dois minutos e meio e, então, lavados em água corrente. Para neutralizar o ácido sulfúrico residual, procedeu-se a imersão das sementes durante 1 minuto em solução de bicarbonato de cálcio 1%, seguido de lavagem em água corrente, sendo secas à temperatura ambiente sobre papel de filtro.

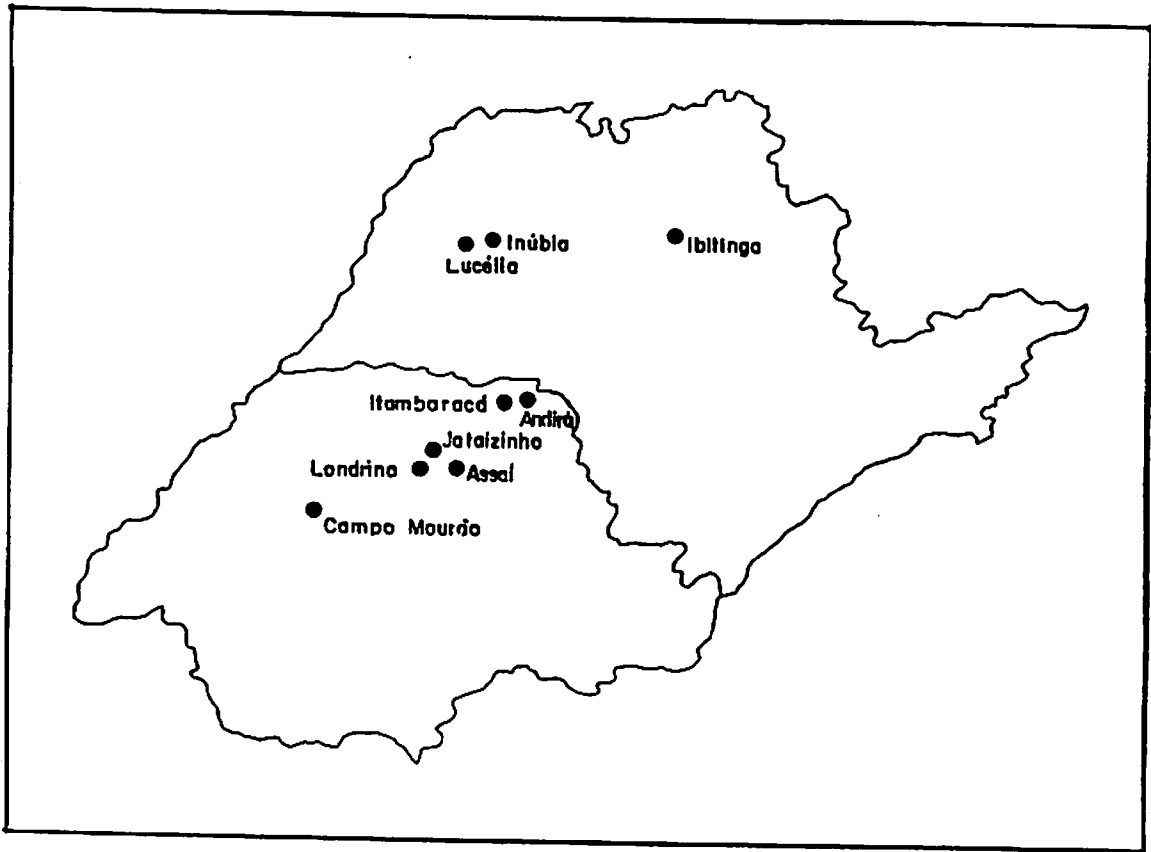


FIGURA 1. Distribuição geográfica das localidades da origem dos isolados de *Colletotrichum* nos Estados do Paraná e São Paulo. UFLA-MG, 1996.

Cada amostra de trabalho foi representada por 400 sementes, sendo 200 desinfestadas com hipoclorito de sódio 1%, por um minuto.

Em capela de fluxo laminar, as sementes foram secas em papel absorvente e transferidas uma a uma para placas de 15 cm de diâmetro contendo, cada, 3 discos de papel de filtro esterilizados e umedecidos em solução de 2,4 Diclorofenoxyacetato de sódio (5,0 ppm) também esterilizada. Em cada placa foram semeadas 25 sementes equidistantes entre si, perfazendo um total de 8 placas contendo sementes não desinfestadas e 8 placas contendo sementes desinfestadas, para cada amostra. As placas foram incubadas em câmara, à temperatura de 21 ( $\pm$ 2) °C, em regime alternado de 12 h luz/12 h escuro, sob luz fluorescente N.U.V., por



um período de 7 dias. Decorrido este período, fêz-se a avaliação com o auxílio de estereomicroscópio (Tanaka, 1995).

Os inóculos dos isolados de *Colletotrichum* encontrados nas sementes de algodoeiro foram transferidos com o auxílio de uma alça de platina para placas de Petri de vidro de 9 cm de diâmetro, contendo 15 ml de BDA (batata-dextrose-ágar). As placas foram incubadas por um período de 7 dias em câmara com temperatura de 21 ( $\pm 2$ ) °C sob luz fluorescente N.U.V., em regime alternado de 12 h luz/12 h escuro. Após este período, foram retirados assepticamente discos de 5 mm de diâmetro da periferia das colônias desenvolvidas nas placas e transferidas para o centro de novas placas de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA, ficando estas incubadas em condições idênticas às das primeiras. Esta operação foi repetida até a obtenção de cultura pura dos fungos.

Após a obtenção de culturas puras dos fungos *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, os isolados foram preservados em água destilada esterilizada, seguindo o método de Castellani (Figueiredo, 1967) com pequenas modificações. Tal método constitui-se na transferência de discos com 5 mm de diâmetro, retirados das extremidades de colônias em crescimento ativo, para vidros com capacidade aproximada para 10 ml, contendo 4 ml de água destilada esterilizada. Os vidros, após tampados com rolha de borracha, foram vedados com filme transparente de PVC ("MAGIPACK") e mantidos sob temperatura ambiente.

Outro procedimento utilizado para preservação dos isolados constituiu-se na transferência de discos 5 mm de diâmetro, retirados da periferia de colônias em crescimento ativo das culturas puras, para tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado. Os tubos foram incubados em câmara com temperatura 21 ( $\pm 2$ ) °C sob luz fluorescente N.U.V., em regime alternado de 12 h luz/12 h escuro, até a formação de colônias cobrindo 2/3 da superfície do

meio. Em seguida foram adicionados aos tubos, óleo mineral, permanecendo os mesmos sob temperatura ambiente (Tanaka, 1987).

### **3.2 Caracterização morfológica das colônias dos isolados desenvolvidos em meio BDA, sob condições do teste de sanidade de sementes**

Para este ensaio foram utilizadas as culturas puras de *Colletotrichum* obtidas conforme procedimento descrito no item 3.1.

Os isolados armazenados foram repicados para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 15 ml de BDA (batata-dextrose-ágar) e incubados por um período de 7 dias em câmara com temperatura de 21 ( $\pm$  2) °C sob luz fluorescente N.U.V., em regime alternado 12 h luz/12 h escuro. Decorrido este período, foi transferido, assepticamente, um disco de meio de 5 mm de diâmetro, retirado da periferia da colônia do fungo para novas placas de Petri contendo meio BDA.

Para avaliações das características culturais das colônias desenvolvidas no meio BDA, as placas foram distribuídas em local com iluminação uniforme.

As características culturais utilizadas na análise dos isolados foram: (a) presença e ausência de anelamento; (b) coloração e tipo de micélio (densidade e homogeneidade das hifas); (c) posição do micélio em relação ao substrato. Essas determinações seguiram critérios utilizados por Arias (1995) em estudos com o complexo *Phomopsis* em soja.

A coloração das culturas foi descrita conforme o sistema de Munsell (1975) de notação de cores. A textura da colônia é classificada como densa quando ocorre uma aglomeração abundante de micélio e pode se apresentar na forma aérea, intermediária ou superficial sobre o substrato, ao passo que a escassez de micélio sobre a superfície representa a

textura rala. Colônia com textura granulosa corresponde a micélios com formação de flóculos sobre o substrato em topografia intermediária, isto é, com a presença de micélio tanto aéreo como superficial. As colônias que apresentam áreas de diferentes texturas em uma mesma colônia, foram classificadas como textura com zoneamento.

### 3.3 Determinação da identidade de *Colletotrichum*, através do hábito de crescimento em sementes de algodoeiro

Foram utilizados neste ensaio, trinta isolados, I-1, I-14, I-22, I-24, I-31, I-35, I-42, I-53, I-69, I-70, I-87, I-93, I-125, I-131, I-142, I-166, I-177, I-183, I-184, I-185, I-196, I-208, I-219, I-230, I-235, I-238, I-243, I-258, I-263, I-266; tomados aleatoriamente dos isolados inicialmente obtidos (Tabela 1).

Os isolados foram inoculados em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), cultivar IAC-20 da safra 1994/1995, proveniente da região do Triângulo Mineiro, isentas de *Colletotrichum*, conforme análise sanitária (Tabela 2). Foram utilizadas nesta etapa apenas sementes da fração sedimentada em água.

TABELA 2. Porcentagem de fungos detectados em sementes de algodoeiro, pelo método de incubação em papel de filtro "Blotter test". UFLA-MG. 1996.

Patógenos	% de ocorrência
<i>Aspergillus glaucus</i>	68,5
<i>Aspergillus flavus</i>	9,5
<i>Aspergillus niger</i>	0,5
<i>Penicillium</i> sp.	56,0
<i>Rhizopus stolonifer</i>	3,5

Para a inoculação das sementes foram utilizadas culturas puras de *Colletotrichum* obtidas conforme procedimento descrito no item 3.1. Em cada placa foram colocadas 50 sementes em contato com a superfície das colônias e a incubação realizada nas mesmas condições do item 3.1, durante 30 horas, procedendo-se de maneira semelhante ao descrito por Tanaka, Mariano e Menten (1989).

### **3.4 Análise RAPD de isolados de *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro**

#### **3.4.1 Obtenção de micélio**

Para a obtenção de micélio, o fungo foi cultivado em meio líquido, formulado com 10 g de glicose; 1 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 g KCl; 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 5 g de extrato de levedura; 1 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \cdot 5\% \text{ p/v}$ ; 1 ml de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot 1\% \text{ p/v}$  para 1.000 ml de água destilada e esterilizada (Mills, Sreenivasaprasad e Brown, 1994). Em cada Erlenmeyer de 250 ml, foram vertidos 150 ml do meio que a seguir foram autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Dois discos de ágar com 5 mm de diâmetro cada, obtidos da periferia de colônias do fungo em BDA com 7 dias de idade, foram transferidos para cada Erlenmeyer. Foram utilizados 2 frascos por isolado, que foram incubados no escuro, à temperatura ambiente, em mesa agitadora Orbital (Modelo MA 140), a 17 rpm durante 7 dias, conforme previamente determinado pela curva de crescimento dos fungos. Para extração do DNA, o micélio foi coletado em papel de filtro sob vácuo, em capela de fluxo laminar. O micélio coletado foi colocado em cápsulas de alumínio de 4 cm de diâmetro e levado a um liofilizador (Modelo L4KR EDWARDS) por 48 horas, onde foi submetido a uma temperatura  $-40^\circ\text{C}$ , pressão  $10^{-1}$  mbar, secagem e armazenamento à vácuo.

Após liofilização, as cápsulas de alumínio contendo micélio foram colocadas em dessecador e armazenadas em Deep-freezer (-85°C) até sua utilização.

### 3.4.2 Extração do DNA

Por amostra, foram utilizados os mesmos isolados referidos no item 3.3, perfazendo um total de 30 isolados.

Extraiu-se o DNA de 5 g de micélio/amostra mediante trituração com N<sub>2</sub> líquido, em almofariz de porcelana. Foram adicionados 10 ml de tampão de extração de CTAB 2% (100 mM TRIS-HCl (pH = 8); 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 1% PVP), acrescido de 20 µl de 2-β-mercaptoetanol para 10 ml de tampão, afim de evitar a oxidação de metabólitos secundários. O homogeneizado obtido foi incubado a 65°C por 30 minutos em banho-maria. Ao término da incubação, foram adicionados 10 ml de mistura de clorofórmio-álcool isoamíl (24:12) e os tubos foram gentilmente vertidos por ± 20 vezes para a obtenção de uma emulsão, a qual foi centrifugada a 5.000 rpm, em centrífuga BECKMAN, modelo GS-15 R centrífuge, por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado do tubo com o auxílio de uma pipeta e vertido em 30 ml de álcool 95% - acetato de amônio 7,5 M (6:1), levado ao freezer durante no mínimo 1 hora, para a precipitação dos ácidos nucleicos.

Após a precipitação, os ácidos nucleicos foram recolhidos e dissolvidos em TE (1,0 mM TRIS-HCl, 0,1 mM EDTA) seguindo-se novas precipitações em álcool isopropílico e ressuspensão em TE para purificação.

As amostras de DNA tiveram a concentração determinada com o auxílio de um fluorômetro Hoefér Scientific, modelo TKO 100, onde foram empregadas alíquotas de 2µl de

amostra para cada 2 ml de tampão TNE 10x (1,3% TRIS base; 0,37% Na<sub>2</sub> EDTA . 2H<sub>2</sub>O; 11,68% NaCl - pH = 7,4).

### 3.4.3 Amplificação do DNA

A amplificação do DNA foi baseada em método descrito por Williams et al. (1990), utilizando 15 primers de 10 bases (A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>6</sub>, A<sub>7</sub>, A<sub>10</sub>, A<sub>12</sub>, A<sub>15</sub>, A<sub>18</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>19</sub>, D<sub>2</sub>, G<sub>2</sub> e G<sub>9</sub>) da marca Operon Technologies.

Na reação de amplificação, utilizou-se 2 µl de DNA de concentração 10 ng/µl, e mais 8 µl de mix (3,8 µl de água pura; 2,2 µl de tampão Promega; 0,4 µl de nucleotídeos; 0,1 µl de taq polimerase Promega; 2µl de primer), obtendo-se, ao final, 10 µl de reação.

As amplificações, efetuadas em termociclador Perkin-Elmer (Gene Amp. PCR System 2400), seguiram o programa a seguir: 1 primeiro ciclo a 94°C por 5 minutos, 45 ciclos (desnaturação a 94°C, por 15 segundos; anelamento a 36°C, por 30 segundos; alongamento a 72°C, por 1 minuto). Após os 45 ciclos, seguiram-se 10 minutos à 72°C, com a finalidade de assegurar a amplificação dos segmentos.

### 3.4.4 Eletroforese

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%; o tampão utilizado foi TBE 1x e a corrida foi de aproximadamente 3 horas a 60 volts. Terminada a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 30 minutos, sob

agitação constante e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Hoefler. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com câmara Polaroid, utilizando-se filme Polaroid 667.

### 3.4.5 Análise dos dados

Na avaliação dos géis, foram utilizados os códigos: **um** quanto a presença de uma banda em um indivíduo e **zero** quanto a ausência em outro indivíduo, para cada experimento. A estimativa da similaridade genética ( $S_{gij}$ ) entre cada par de isolados foi efetuada pelo coeficiente “Simple Matching” (Rohlf, 1992), através da seguinte expressão:

$$S_{gij} = m/n$$

onde:

$m = a + d$  (presença e ausência de uma dada banda nos dois genótipos considerados);

$n =$  número total de bandas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização cultural dos isolados de *Colletotrichum* em meio BDA

A classificação das colônias dos isolados estudados encontra-se na Tabela 3. Vale ressaltar que, em função do procedimento adotado para a caracterização, foram destacados 22 isolados que representavam a coleção inicial de 271. Com base nessa classificação, os isolados dividiram-se em 2 grandes grupos: com e sem anelamento de colônia (Figura 2). Tanto no grupo que apresentava anéis circulares em colônia quanto no que não apresentava anéis circulares, houve ampla variação de coloração, topografia e textura das colônias. Maior variação de coloração se deu no grupo sem anelamento (branco, rosa claro, acinzentado e rosa pardo), ao passo que o grupo com anelamento apresentou colorações rosa, pardo e rosa pardo, demonstrando ser impossível a caracterização de *Colletotrichum* por estas características.

Tais resultados demonstraram a grande variabilidade em termos de características culturais dos isolados e a impossibilidade de um único padrão baseado nas características consideradas para *Colletotrichum*. Esses dados confirmam resultados encontrados por Malaguti (1955); Follin e Mangano (1983), quando trabalharam com isolados do fungo da ramulose e encontraram variações morfológicas em relação a presença ou ausência de anéis circulares, coloração e tipo de micélio. Contrariando o relato de Viégas (1946), Costa (1939) observou que



TABELA 3. Agrupamentos dos isolados de *Colletotrichum* obtidos de sementes procedentes de várias localidades do país, através do teste incubação em papel filtro "Blotter test", e em função de suas características culturais em meio BDA sob condições do teste padrão de sanidade de sementes. UFLA-MG, 1996.

Referência dos Isolados	Colônia	Coloração	Topografia	Textura
I - 121 I - 201 I - 204	Sem anelamento	Branco	Aéreo	Denso
I - 019 I - 277	Sem anelamento	Rosa claro	Aéreo	Denso
I - 073 I - 087 I - 230 I - 238	Com anelamento	Rosa	Aéreo	Denso
I - 266	Com anelamento	Rosa	Aéreo	Ralo
I - 174 I - 221	Com anelamento	Pardo	Aéreo	Ralo
I - 035 I - 150 I - 173	Com anelamento	Pardo	Intermediário	Granuloso
I - 029 I - 203 I - 045	Sem anelamento	Acinzentado	Intermediário	Denso Ralo Com zoneamento
I - 033 I - 053 I - 096	Com anelamento	Rosa pardo	Superficial	Ralo
I - 237	Sem anelamento	Rosa pardo	Superficial	Denso

*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* produz colônias com raios curvos e de aparência gelatinosa.

Os resultados obtidos para as colônias de coloração branca, foram os mesmos apresentados para as colônias rosa claro quanto a topografia, textura e presença ou ausência de anéis circulares para os isolados estudados. As colônias de coloração rosa apresentaram as mesmas características entre si, exceto o isolado I-266 que diferiu em textura. As colônias de cor

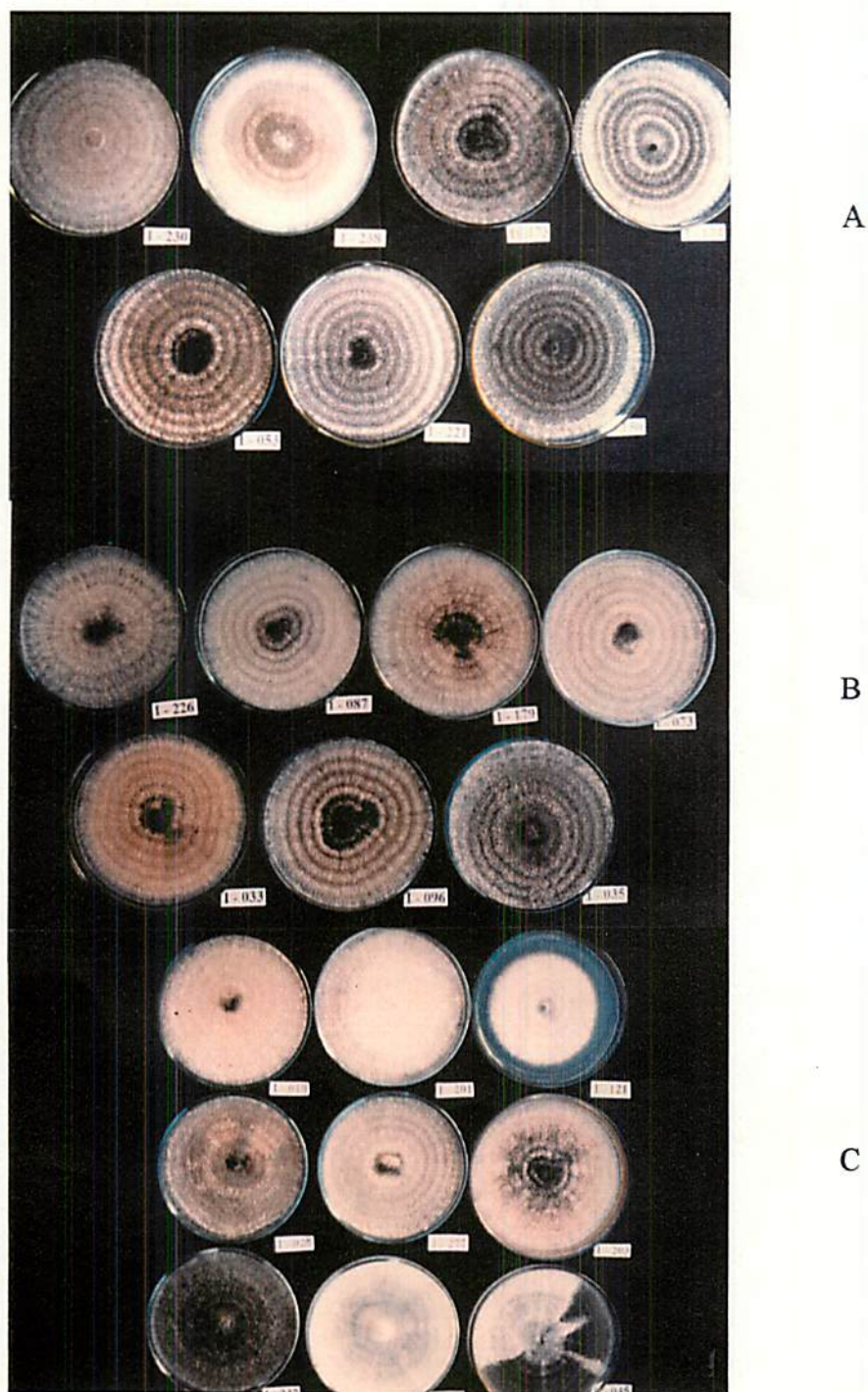


FIGURA 2. Aspectos das colônias de *Colletotrichum* em meio BDA, (A e B) com anéis circulares concêntricos e (C) sem a formação de anéis típicos. UFLA-MG. 1996.

parda demonstraram ampla variação quanto a topografia e a textura, apresentando micélio aéreo e ralo, intermediário e granuloso, respectivamente. Dentro da coloração rosa pardo, também foram verificadas variações para textura e presença ou ausência de anelamento. Para as colônias de coloração acinzentada, as características quanto a topografia e presença ou ausência de anéis circulares foram as mesmas para os isolados estudados mas apresentando diferentes texturas dos mesmos.

Esse trabalho discorda de Tanaka (1995), Malaguti (1955), Follin e Mangano (1983), que relatam ser possível caracterizar esses fungos pela coloração e tipo de micélio. Por este estudo constata-se a grande variabilidade das espécies entre as culturas. Através da variação em cor, partindo-se do branco até a tonalidade acinzentada, vê-se as diferenças acentuadas que podem ser indicativas de diferenças em esporulação, taxa de crescimento, pigmentação, forma e relevo das colônias, etc. (Lima, 1981; Tanaka, 1990).

Culturas atípicas de um dos organismos que muitas vezes se assemelham com as culturas do outro, geralmente dificultam a identificação e diferenciação dos dois fungos conforme observado neste estudo.

Viu-se também neste estudo que as colônias apresentaram uma topografia do micélio em forma intermediária, além de colônias com presença e ausência de anéis circulares, coloração parda e acinzentada e textura do tipo granuloso, denso, ralo e com zoneamento, confirmando os resultados de Malaguti (1955) quanto à dificuldade de diferenciação do fungo *Colletotrichum* em descrições culturais.

Arias (1995), trabalhando com caracterização cultural de diferentes isolados do complexo *Phomopsis* em diferentes meios de cultura, verificou que, com relação ao meio BDA, os isolados podem apresentar, na sua maioria, características miceliais consistentes em temperaturas de 21°C e 25°C. Entretanto, alguns isolados apresentaram variação morfológica,

sendo considerados inconsistentes. Quanto a coloração, o autor relatou pequenas variações em tonalidade e/ou intensidade da colônia nos diferentes meios.

Os resultados de coloração obtidos pelo sistema Munsell de notação de cores encontram-se na Tabela 4, demonstrando que os isolados puderam ser separados em 5 grupos, de acordo com a tonalidade e/ou intensidade das colônias.

TABELA 4. Agrupamento dos isolados de *Colletotrichum* em função da coloração micelial da colônia em meio BDA pelo sistema Munsell. UFLA-MG. 1996

Munsell*	Coloração da Colônia Descrição	Referência dos Isolados
5 R	3/1 verde vermelho pálido escuro	I-237,
	5/2 vermelho fraco	I-029, I-174
	5/6 vermelho	I-173
	6/1 verde vermelho pálido	I-266, I-203
	6/2 vermelho pálido	I-019, I-073, I-221
	6/3 vermelho pálido	I-277
7,5 R	3/0 verde muito escuro	I-045
	4/2 vermelho fraco	I-150
	5/6 vermelho	I-053
10 R	4/4 vermelho fraco	I-096
	5/2 vermelho fraco	I-035
	6/6 vermelho claro	I-033
7 Y	7/1 verde claro	I-204, I-045
	8,0 branco	I-121
5 YR	6/3 marron vermelho pálido claro	I-230
	7/2 verde pálido	I-087
	7/4 rosa	I-238
	8/2 branco rosa pálido	

\* Sistema Munsell de notação de cores (tonalidade e intensidade).

Do ponto de vista de análise de rotina, a utilização de métodos que empreguem características culturais com a finalidade de diferenciação de fungos é considerada inviável, não só pela sua morosidade, como pela grande variação exibida pelos diferentes isolados em função de fatores circunstanciais que compõem o ambiente e as próprias características do hospedeiro e organismo.

#### **4.2 Determinação da identidade de *Colletotrichum*, através do hábito de crescimento em sementes de algodoeiro artificialmente inoculadas**

Com base no hábito de crescimento dos 30 isolados (Tabela 5) sobre as sementes inoculadas através de observação ao estereomicroscópio, sem o auxílio de observações ao microscópio biológico composto, viu-se que os isolados de *Colletotrichum* foram reunidos em 3 grupos (Tabela 6). Os resultados do exame indicaram que 40% dos isolados em estudo se enquadraram como *Colletotrichum gossypii* e cerca de 35,0% como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Vinte e cinco por cento dos isolados não exibiram hábitos de crescimento típicos de nenhum dos dois *Colletotrichum*, de acordo com os critérios descritos por Tanaka (1995).

O isolado I-087 e I-238, identificados como *Colletotrichum gossypii* através do hábito de crescimento, apresentaram as mesmas características que o isolado I-230 identificado como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Vale lembrar que a possibilidade de se ter ocorrência natural de um dos *Colletotrichum* nas sementes utilizadas deve ser descartada, conforme revelado pelos resultados da análise de sanidade conduzida para a amostra utilizada (Tabela 2).

TABELA 5. Procedências das amostras de sementes de algodoeiro, submetidas ao "Blotter test". UFLA-MG. 1996.

Amostra	Procedência		Cultivar/Linhagem	Nº dos Isolados de <i>Colletotrichum</i>
	Estado	Cidade		
1	PR	Andirá	IAPAR 71-PR3	I-1, I-87
4	PR	Andirá	IAPAR 71-PR3	I-22, I-183
6	PR	Andirá	IAPAR 71-PR3	I-24, I-31
10	PR	Itambaracá	IAPAR 71-PR3	I-69, I-184
11	PR	Campo Mourão	L 001 IAC 20	I-14, I-185
12	PR	Campo Mourão	L 010 IAC 20	I-42, I-131
13	PR	Campo Mourão	L 016 IAC 20	I-35, I-166
15	PR	Londrina	IAC 20 PR	I-53, I-230
16	PR	Jataizinho	PR 03	I-70, I-258
17	PR	Assaí	PR 03	I-196, I-263
22	PR	Itambaracá	IAPAR 71-PR3	I-125, I-208
2	SP	Ibitinga	IB 007/95 IAC 20-A	I-93, I-238
8	SP	Inúbia Paulista	LU 010/95 IAC 20	I-177, I-235
14	SP	Ibitinga	IB 010/95 IAC 20	I-142, I-243
19	SP	Ibitinga	IB 002/95 IAC 20-1	I-219, I-266

TABELA 6. Identificação dos isolados de *Colletotrichum* ao estereomicroscópio com base no hábito de crescimento em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) inoculadas artificialmente. UFLA-MG. 1996

<i>Colletotrichum gossypii</i>	<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	Identidade não definida*
I- 14	I- 1	I- 22
I- 87	I- 24	I- 35
I- 93	I- 31	I- 53
I- 125	I- 42	I- 166
I- 142	I- 69	I- 183
I- 185	I- 70	I- 184
I- 196	I- 131	I- 235
I- 208	I- 177	I- 258
I- 219	I- 230	
I- 238	I- 243	
I- 263		
I- 266		

\* Isolados que apresentaram características tanto de *Colletotrichum gossypii* quanto de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro.

É preciso considerar que, possivelmente, em um exame mais detalhado desses isolados de identidade não definida, com observações da análise de conídios e conidióforos com maior resolução conforme recomendado por Tanaka (1995), a identidade dos fungos pudesse ser revelada com segurança. Porém, essa possibilidade faz com que a análise nessas circunstâncias seja questionável para a utilização do método em esquema de rotina.

De modo geral, percebe-se que a identificação e diferenciação segura dos dois patógenos através do hábito de crescimento é dificultada, principalmente quando se depara com isolados que apresentam características que fogem do padrão descrito para sementes artificialmente inoculadas. Esses resultados reforçam os de Dudenas (1990) e Malaguti (1955), os quais comentam as dificuldades na distinção de isolados do fungo da antracnose e ramulose através de características morfológicas. Essas dificuldades são também ressaltadas por Tanaka (1990), Follin e Mangano (1983), Lima (1981).

Vieira (1996) considera os métodos convencionais de identificação de fungos baseados em características morfológicas, ineficazes, uma vez que características como pigmentação de micélio, formação, forma e tamanho de conídios são instáveis e altamente dependentes da composição dos meios, condições de ambiente e da própria variabilidade do patógeno.

Diante disso, torna-se necessário buscar alternativas mais sensíveis e estáveis que possam auxiliar na identificação e distinção segura entre os dois agentes em estudo.

#### **4.3 Análise RAPD de isolados de *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro**

De 15 oligonucleotídeos (primers) testados, 13 mostraram padrões de bandas polimórficos para os isolados em estudo (Tabela 7). As bandas foram identificadas com letras do







TABELA 7. Continuação

		Isolados																													
Primer / Bandas	87	1	93	23	18	22	24	17	23	18	69	18	14	13	42	16	35	14	24	23	53	25	70	26	19	26	21	31	20	12	
G <sub>9</sub>	a	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	b	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	c	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	d	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	e	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C <sub>19</sub>	a	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	b	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	c	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	d	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	e	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	f	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A <sub>1</sub>	a	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	b	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	c	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	d	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	e	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	f	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Continua...



alfabeto, sendo que “a” corresponde ao maior fragmento de DNA amplificado e assim por diante, em ordem decrescente.

As bandas mais intensas e consistentes foram consideradas nos estudos de similaridade (Figura 3).

Os padrões de bandas obtidos foram primer-genótipo dependentes e variaram de 1 a 7. Esses valores concordam com os resultados obtidos por Vieira (1996) trabalhando com diferenciação entre *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* utilizando marcadores RAPD, quando obteve uma variação de 2 a 7 para padrões de bandas.

Para um mesmo primer, neste estudo observou-se diferenças no número e na posição de bandas entre isolados, o que indica o alto grau de polimorfismo apresentado pelos diferentes isolados. Este mesmo alto grau de polimorfismo entre isolados foi verificado também em estudos com *Colletotrichum graminicola* por Guthrie (1992) que analisou diferentes isolados coletados na África, Estados Unidos, Índia e Porto Rico.

Os coeficientes de similaridade obtidos através da análise dos diferentes padrões de bandas para cada par combinado de isolados, mostraram valores variando de 55% a 99% (Tabela 8).

O valor de 55% foi obtido para o par de isolados I-125 e I-238, ambos obtidos em regiões distintas, sendo o isolado I-125 procedente de Itambaracá-PR e o isolado I-238 de Ibitinga-SP (Figura 1). Além disto, os isolados foram obtidos de cultivares diferentes, isto é, I-125 foi isolado a partir da cultivar IAPAR-71/PR 3 e o I-238 da cultivar IAC 20-A. Este valor baixo de similaridade genética, ligado ao fato de ter ocorrido entre isolados de origem diferente, sugere alta capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais em função da alta variabilidade (Tanaka, 1990; Lima, 1981). Provavelmente, isto também se deva a alta especificidade patógeno-hospedeiro em que a transmissão e a conseqüente sobrevivência nas sementes faz com

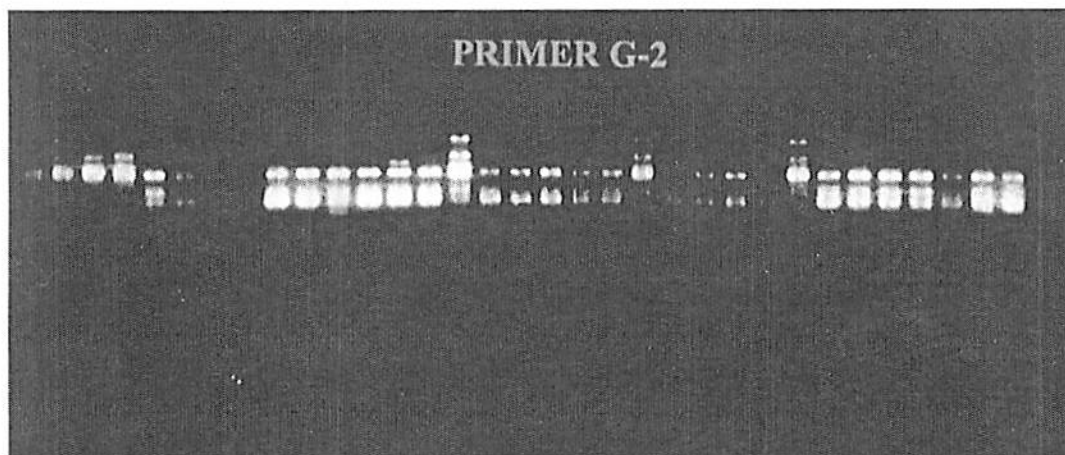


FIGURA 3. Gel de agarose mostrando padrão dos produtos amplificados dos isolados de *Colletotrichum* procedentes dos Estados do Paraná e São Paulo, obtidos com o primer G<sub>2</sub> da marca Operon.

que o patógeno, com os cultivos sucessivos, seja selecionado pelo “genótipo” hospedeiro. Esta especificidade tem sido descrita por vários autores (Arantes et al., 1986; CIA et al., 1988a; CIA et al., 1988b; Lima, 1981; CIA, Gridi-Papp e Fuzatto, 1982; Carvalho et al., 1981; Tanaka, 1990; Vilarinhos et al., 1995; Lima et al., 1984; Lima, Carvalho e Carvalho, 1986).

O maior valor de similaridade encontrado foi de 99% para o par de isolados I-184 e I-235, obtidos a partir das variedades IAPAR-71 PR3 e IAC 20 oriundas, respectivamente das regiões de Itambaracá-PR e Inúbia Paulista-SP. Essa similaridade dos isolados de diferentes regiões e variedades pode ser explicada pela existência de linhagens hospedeiras que provavelmente possuem mesma base genética (Prof. A.C. Fraga, DAG/UFLA, comunicado pessoal).

TABELA 8. Estimativas, em porcentagem, das similaridades genéticas (método Simple Matching) entre os 30 isolados de *Colletotrichum*, baseadas em dados de RAPD. UFLA-MG, 1996.

ISOLADOS	87	1	93	238	183	22	24	177	235	184	69	185	14	131	42	166	35	142	243	230	53	258	70	263	196	266	219	31	208	125	
87		79	82	62	75	86	73	79	81	82	81	82	79	82	77	75	77	78	78	78	66	75	68	74	68	81	67	64	74	66	
1			81	71	79	82	71	81	79	81	79	78	75	84	78	63	70	77	82	77	67	74	64	64	75	67	79	66	63	70	78
93				66	79	82	68	81	82	84	82	84	81	84	78	74	78	79	88	77	64	77	73	75	70	82	68	63	70	67	
238					70	73	64	74	73	71	70	71	71	74	77	59	68	62	67	67	63	70	63	71	68	70	64	70	68	55	
183						86	70	90	89	90	92	85	88	82	93	75	82	86	84	84	74	86	79	90	85	86	81	81	82	77	
22							75	88	89	90	86	90	85	93	88	78	82	86	75	81	68	78	77	85	77	84	73	73	79	71	
24								77	78	77	78	71	77	74	74	64	74	64	73	78	63	70	63	74	68	75	64	70	71	63	
177									96	97	96	92	92	89	95	77	86	79	85	90	73	82	78	86	84	93	79	77	84	81	
235										99	95	93	93	90	93	78	88	81	84	86	68	81	79	85	84	92	81	78	79	79	
184											96	95	92	92	95	79	86	82	85	88	70	82	81	86	84	93	79	77	81	81	
69												90	93	88	93	81	88	81	89	89	71	84	79	85	85	95	81	78	79	79	
185													89	95	89	79	84	82	82	82	64	77	75	81	78	88	74	71	75	75	
14														86	89	79	86	79	85	88	70	82	78	84	84	90	79	77	78	75	
131															86	77	81	82	82	82	64	74	73	81	75	85	71	71	75	73	
42																79	86	82	82	85	73	88	81	92	86	90	77	82	84	78	
166																	82	81	75	75	68	78	74	77	79	78	70	70	68	66	
35																		77	82	82	70	79	78	81	89	85	77	77	78	73	
142																			78	78	77	81	74	85	77	78	73	75	71	71	
243																				86	68	84	74	79	79	86	73	73	71	74	
230																					77	86	77	88	79	86	75	78	79	74	
53																						82	78	81	70	74	71	71	67	64	
258																							82	90	79	86	78	74	71		
70																								84	78	79	71	71	67	64	
263																								84	82	79	85	81	73		
196																									79	82	79	82	78	70	
266																															
219																															
31																															
208																															

A similaridade entre os isolados provenientes do Estado do Paraná variou de 63 à 96% (Tabela 9). Os pares combinados de isolados I-1 - I-31, I-1 - I-166, I-24 - I-53, I-24 - I-125, I-70 - I-24 apresentaram o menor valor de similaridade dentre os isolados provenientes do Estado do Paraná, que foi de 63% (Tabela 9). Os pares de isolados foram obtidos das regiões de Andirá (amostra 1) - Andirá (amostra 6); Andirá (amostra 1) - Campo Mourão (amostra 13); Andirá (amostra 6) - Londrina; Andirá (amostra 6) - Itambaracá (amostra 22); Jataizinho - Andira (amostra 6), respectivamente. Apesar da dissimilaridade apresentada por estes isolados, vale ressaltar que as regiões das quais foram provenientes apresentam semelhança quanto as condições ambientais, bem como a mesma cultivar, exceto para os isolados I-53 e I-166, os quais foram obtidos de sementes da cultivar IAC- 20, mas de linhagens diferentes dos demais. Este fato sugere uma ampla variabilidade desse organismo, independente do local e cultivar de origem. O isolado I-166, procedente de Campo Mourão, município situado na região noroeste do Estado do Paraná, apresentou menor valor de similaridade (63%). Nesse caso, a distância genética coincidiu com a distância do local de origem.

Em relação ao Estado de São Paulo, a similaridade variou de 62% à 96%, sendo que o maior valor encontrado foi de 96% para o par de isolados I-177 e I-235, ambos pertencentes a Inúbia Paulista-SP. O resultado encontrado sugere que isolados de mesma procedência e de mesmo cultivar-hospedeiro foram semelhantes. O menor valor de similaridade encontrado, 62%, foi entre isolados I-238 e I-142 (Tabela 10). Embora os dois isolados sejam provenientes de Ibitinga-SP, variedades IAC 20-A e IAC 20, respectivamente, eles confirmam a variabilidade do patógeno independente do local e a variedade de origem.

Pode-se observar, pelo dendrograma obtido (Figura 4), que os isolados provenientes do Paraná e São Paulo estão interligados num mesmo grupo, apresentando o valor de 77% de similaridade genética para cada estado e entre os mesmos, o que diverge dos





TABELA 10. Estimativas das similaridades genéticas (método Simple Matching) entre 8 isolados de *Colletotrichum*, provenientes do Estado de São Paulo. UFLA-MG. 1996.

Isolados	93	177	235	142	243	219	266	238
93		81	82	79	88	68	82	66
177			96	79	85	79	93	74
235				81	84	81	92	73
142					78	73	86	62
243						73	78	67
219							78	64
266								70
238								

resultados de Vilarinhos et al. (1995), trabalhando com *Colletotrichum lindemuthianum*; Guthrie et al. (1992) identificando e diferenciando *Colletotrichum graminicola*; Vasconcellos (1993), trabalhando na diferenciação de *Colletotrichum truncatum*; Vieira (1996), trabalhando com diferenciação de *C. gossypii* e vários outros utilizando RAPD. Baseados nas distâncias genéticas entre isolados, conseguiram separar os isolados em grupos distintos, podendo ser visualizado através do dendrograma.

A grande proximidade entre os isolados de estados diferentes é confirmada pela formação de subgrupos no dendrograma. Este fato pode ser atribuído à proximidade geográfica entre os estados e também à adaptação dos mesmos ao ambiente, cultivar ou linhagem.

As diferenças morfológicas entre os fungos nem sempre coincidem com as diferenças genéticas observados ao nível de marcadores moleculares e, por isso, os critérios morfológicos podem ser questionáveis, dada a similaridade genética dos isolados morfológicamente diferentes.

Por outro lado, os resultados deste estudo suportam a justificativa de que *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* sejam mantidos em

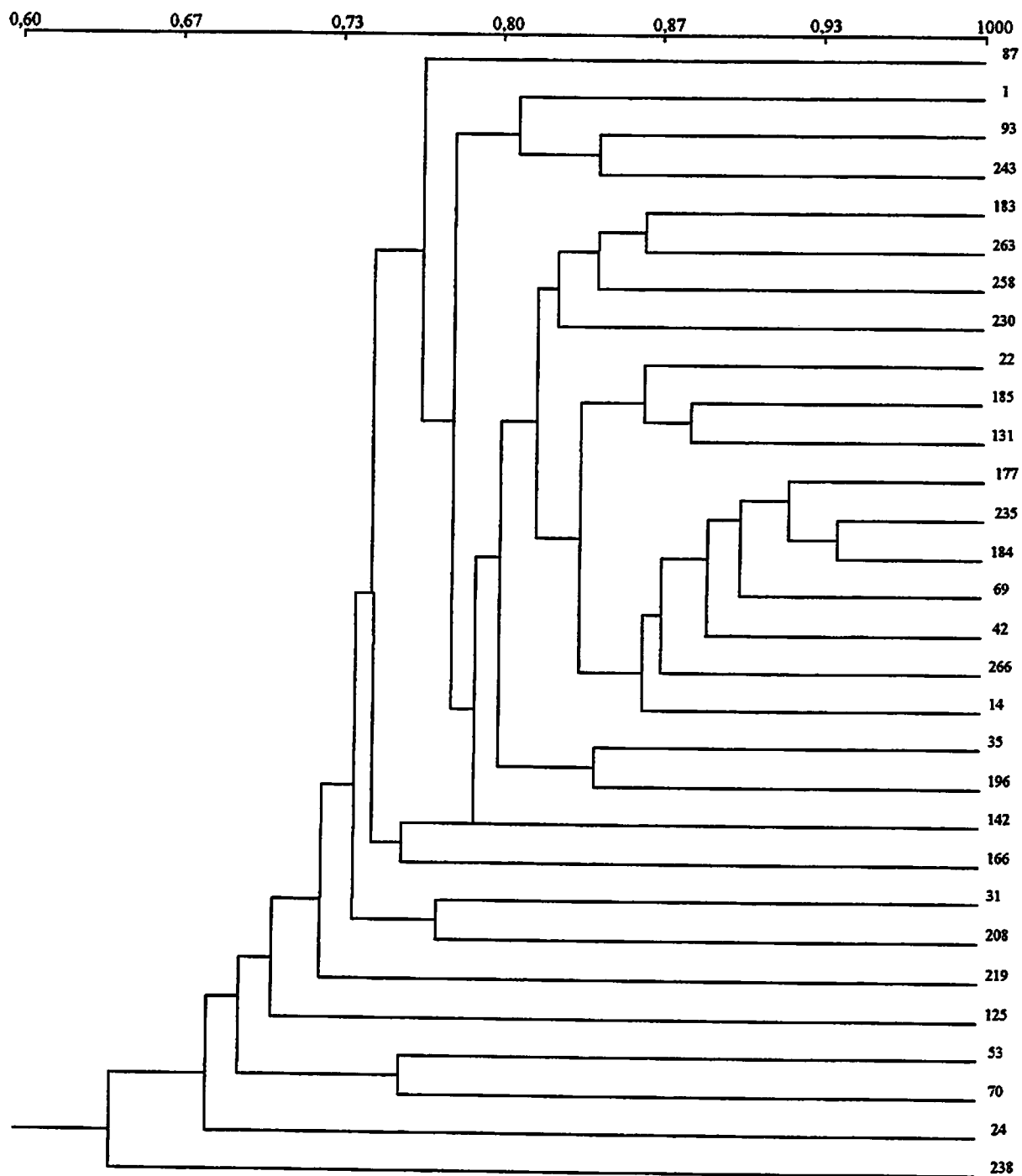


FIGURA 4. Agrupamentos entre isolados de *Colletotrichum*, baseados em coeficiente de similaridade Simple Matching. UFLA-MG. 1996.

uma mesma espécie, pois há uma continuidade genética entre os isolados estudados dos Estados do Paraná e São Paulo. Para estudos mais conclusivos nesta direção seria necessário o estudo de maior número de isolados abrangendo maior variabilidade desses dois organismos.

A similaridade genética demonstrada no presente estudo comprova que *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* surgiu como um variante patogênico de *Colletotrichum gossypii*.

A pequena variação genética entre isolados de cada organismo e entre os dois organismos provavelmente decorre da homogeneidade genética do hospedeiro. Em relação a outras culturas, como soja e milho, percebe-se que a variação genética do algodoeiro é relativamente baixa.

Considerando a análise da similaridade genética com marcadores moleculares RAPD, observou-se que os padrões genéticos encontrados e os dados de caracterização morfológica apresentam grande proximidade entre os mesmos, dificultando a visualização das distâncias entre os isolados.

Diante dos resultados deste estudo, vê-se que a continuidade do mesmo deve ser norteada levando-se em conta maior número de isolados com diferentes procedências, buscando, dessa maneira, utilizar formas dos organismos com maior variação genética.

## 5 CONCLUSÕES

- Através da caracterização cultural foi constatada grande variabilidade entre os isolados de *Colletotrichum* estudados.
- A caracterização cultural, sob condições do teste de sanidade de sementes padrão, não revelou ser um meio seguro de diferenciar *Colletotrichum gossypii* de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.
- A análise do hábito de crescimento de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, através de observação ao estereomicroscópio, não foi capaz de distinguir, com a segurança requerida, ambos os organismos.
- O agrupamento dos isolados de *Colletotrichum*, com base nos marcadores RAPD utilizados, não correspondeu à separação baseada em morfologia das culturas puras e hábito de crescimento sobre as sementes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J. A manifestação tardia da “ramulose” ou superbrotamento do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.18, n.8, p.135-138, ago. 1952.
- ABRAHÃO, J. Controle à ramulose tardia do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.27, n.6, p.121-123, jun. 1961.
- ABRAHÃO, J.; COSTA, A.S. Instruções para o reconhecimento da “ramulose” do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v.15, n.3, p.59-60, mar. 1949.
- AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAR, A.S. **The fungi. An Advanced Treatise**. London: Academic Press, 1973, v.4, 621p.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. **Introductory micology**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1962. 632p.
- ALFENAS, A.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; MATSUOKA, K.; FIGUEREDO, G. Variabilidade isoenzimática entre culturas fúngicas com diferentes níveis de patogenicidade. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 14, Viçosa, 1987. **Anais...** Viçosa: UFV, 1987.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- ARANTES, E.M.; FUZATTO, M.G.; CHIAVEGATO, E.J.; CIA, E. Comportamento de variedades nacionais de algodoeiro em Mato Grosso, na presença de ramulose. In: **REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO**, 4, Belém, 1986. **Resumo**. Belém: EMBRAPA, 1986. p.25.
- ARIAS, S.M.S. **Aspectos da detecção em sementes e controle biológico de *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* em soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. Lavras: UFLA, 1995. 76p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- ARX, J.A.von. Die arten der gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, 29, p.413-468, 1957.
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. ***Colletotrichum: Biology, Pathology and Control***. Wallingford: Redwood Press, 1992. 388p.

- BALLS, S; REEVES, J. Application of rapid techniques to seed health testing-prospects and potential. In: DUNCAN, J.M.; TORRANCE, L., ed. **Techniques for the rapid detection of plant pathogens**. Cambridge: University Press, 1992. p.193-209.
- BAXTER, A.P. van der. WESTHUIZEN, G.C.A.; EICKER, A. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, 2, p.259-289, 1983.
- BAXTER, A.P.; van der WESTHUIZEN, G.C.A.; A synoptic key to South African isolates of *Colletotrichum*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, 3, p.265-266, 1984.
- BERNIER, L.; JENG, R.S; HUBBES, M. Differentiation of aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocystis ulmi* by polyacrylamide gel electrophoresis of intramycelial proteins. **Mycotaxon**, New York, v.17, p.456-472, 1983.
- BITANCOURT, A.A. A antracnose e as falhas no plantio de algodão. **O Biológico**, São Paulo, v.1, n.11, p.402-404, nov. 1935.
- BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. Restriction fragment length polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v.94, p.1129-1137, 1990.
- BRAITHWAITE, K.S.; MANNERS, J.M. Human hypervariable minisatellite probes detect DNA polymorphisms in the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Current Genetics**, Springer Verlag, v.16, p.473-475, 1989.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**, Brasília: AGIPAN, 1992. 365p.
- BROMMONSCHENKEL, S.H.; ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, K. Análise genética de padrões isoenzimáticos de isolados de *Phytophthora infestans*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n.2, p.155, jul. 1987.
- BURDON, J.J.; MARSHALL, D.R.; LUIG, N.H.; GOW, D.J.S. Isoenzyme studies on the origin and evolution of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* in Australia. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v.35, p.231-238, 1982.
- CARVALHO, J.M.F.C.; LIMA, E.F.; CARVALHO, O.S.; CARVALHO, L.P. Identificação de fonte de resistência à ramulose em linhagens de algodoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 4, Belém, 1986. **Resumo**. Belém: EMBRAPA-CNPA, 1986. p.105.
- CARVALHO, L.P.; CARVALHO, J.M.F.C.; LIMA, E.F.; CAVALCANTE, F.B. Influência da concentração de esporos na patogenicidade de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa e avaliação da resistência de cultivares e linhagens de algodoeiro herbáceo à ramulose. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, n.3, p.395-402, out. 1981.

- CARVALHO, L.P.; CAVALCANTI, F.B.; LIMA, E.F.; SANTOS, E.O. Influência da ramulose nas características de fibra e produção do algodoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.9, n.3, p.593-598, out. 1984.
- CHOWHURST, R.N.; GAWTHORNE, B.T.; RIKKERINK, E.H.A.; TEMPLETON, M.D. Differentiation of *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae*. *Current Genetics*, Springer Verlag, v.20, p.391-396, 1991.
- CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. *Summa Phytopathologia*, Piracicaba, v.3, n.3, p.167-193, maio/jul. 1977.
- CIA, E.; FUZATTO, M.G.; GRIDI-PAPP, I.L.; CHIAVEGATO, E.J.; DUDIENAS, C.; CAMARGO, A.P.; CAMPANA, M.P.; LELIS, L.G. Comportamento dos materiais genéticos estudados nos ensaios nacional e regional paulista de variedades em 1986/87 em face de doenças e nematóides. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 5., Campina Grande, 1988. *Resumo...* Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1988a. p.27.
- CIA, E.; FUZATTO, M.G.; GRIDI-PAPP, I.L.; CHIAVEGATO, E.J.; DUDIENAS, C.; CAMARGO, A.P.; CAMPANA, M.P.; LELIS, L.G.L.; BORTOLETTO, N.; PAULO, E.M.; KASAI, F.S. Comportamento de materiais genéticos estudados nos ensaios nacional e regional paulista de variedades em 1987/88 em face das doenças e nematóides. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 5., Campina Grande, 1988. *Resumo...* Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1988b. p.28.
- CIA, E.; GRIDI-PAPP, I.L.; FUZATTO, M.G. Avaliação de linhagens e variedades para resistência múltipla à doenças do algodoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 2, Salvador, 1982. *Resumo...* Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1982. p.239.
- COODINGTON, A.; GOULD, D.S. Use of RFLPs to identify races of fungal pathogens. In: DUNCAN, J.M.; TORRANCE, L. (ed.). *Techniques for the rapid detection of plant pathogens*. Cambridge: University Press, 1992. p.162-176.
- COSTA, A.S. Infestação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* South e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. *Jornal da Agronomia*, Piracicaba, v.2, p.265-272, 1939.
- COSTA, A.S.; FRAGA JÚNIOR, C.G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v.12, n.5/6/7, p.249-252, maio/jul. 1937.
- CROUS, P.W.; ALFENAS, A.C.; WINGFIELD, M.J. *Calonectria scoparia* and *Calonectria morganii* sp. nov., and variation among isolates of their *Cylindrocladium* anamorphs. *Mycological Research*, Cambridge, v.97, n.6, p.701-708, June 1993.
- CROUS, P.W.; JANSE, B.J.H.; VICTOR, D.; MARAIS, G.F.; ALFENAS, A.C. Characterization of some *Cylindrocladium* species with three-septate conidia using morphology, isozyme banding patterns and DNA polymorphisms. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart-Alemanha, v.16, p.266-273, 1993.

- CROUS, P.W.; PHILIPS, A.J.L.; WINGFIELD, M.J. Effects of cultural conditions on vesicle and conidium morphology in species of *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella*. *Mycologia*, New York, n.84, p.497-504, 1992.
- CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; ALFENAS, A.C. *Cylindrocladium parasiticum* sp. nov., a new name for *C. crotalariae*. *Mycological Research*, Cambridge, v.97, n.7, p.889-896, July 1993.
- DRUMOND, O.A. A ramulose em Minas Gerais. *Boletim de Agricultura*, Belo Horizonte, v.10, n.3/12, p.95-97, 1961.
- DUDIENAS, C. Caracterização morfológica, auxanográfica e patogênica de *Colletotrichum gossypii* South. e *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Júnior. Piracicaba: ESALQ/USP, 1990. 67p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- EL-GHOLL, N.E.; UCHIDA, J.Y.; ALFENAS, A.C.; SCHUBERT, T.S.; ALFIERI, S.A. Jr.; CHASE, A.R. Induction and description of perithecia of *Calonectria spathiphylli* sp. nov. *Mycotaxon*, New York, n.45, p.285-300, 1992.
- FIGUEREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, v.33, n.1, p.9-13, jan. 1967.
- FOLLIN, J.C.; MANGANO, V. Etude sur la ramulose du cotonnier. *Cotton et Fibres Tropicales*, Paris, v.38, n.2, 209-215, 1983.
- FÖRSTER, H.; OUDEMANS, P.; COFFEY, M.D. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. *Experimental Mycology*, New York, v.14, p.18-31, 1990.
- FÖSTER, L.M.; KOZAK, K.R.; LOFTUS, M.G.; STEVENS, J.J.; ROSS, K.I. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycology Research*, Cambridge, v.97, n.7, p.769-781, July 1993.
- GRAJAL-MARTIN, M.P.; SIMON, C.J.; MUEHLBAUER, F.J. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. *Phytopathology*, St. Paul, v.83, n.6, p.612-614, June 1993.
- GUTHRIE, P.A.I.; MAGILL, C.W.; FREDERIKSEN, R.A.; ODUODY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, St. Paul, v.82, n.8, p.832-835, Aug. 1992.
- HODGES Jr., C.S.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A. The conspecificity of *Cryphonectria cubensis* and *Endothia eugeniae*. *Mycologia*, New York, v.78, n.3, p.343-350, May/June 1986.
- HOLLIDAY, P. *A dictionary of plant pathology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. n.p.



- HOLLIDAY, P. **Fungus diseases of tropical crops**. Cambridge: Cambridge University Press, 1980. n.p.
- HUETTEL, R.N.; DICKSON, D.W.; KAPLAN, D.T. Biochemical identification of the races of *Radopholus similis* by starch gel eletrophoresis. **Journal of Nematology**, Iowa, v.15, n.2, p.338-344, Apr. 1983.
- INFORMAÇÕES ECONÔMICAS, São Paulo, v.25, n.9, set. 1995.
- JENG, R.S.; BERNIER, L.; BRASIER, C.M. A comparative study of cultural and electrophoretic characteristics of the eurasian an north american races of *Ophiostoma ulmi*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, n.7, p.1325-1333, July 1988.
- JENG, R.S.; HUBBES, M. Identification of aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocysts ulmiby* polyacrilamide gradient gel electrophoresis. **Mycotaxon**, New York, n.17, p.445-455, 1983.
- JONES, M.J.; DUNKLE, L.D. Analysis of *Cochliobolus carbonum* races by PCR amplification with arbitrary and gene-specific primers. **Phytopathology**, St Paul, v.83, n.4, p.366-370, Apr. 1993.
- JUNGHANS, D.T. **Diversidade genética de isolados de fungo *Pisolithus tinctorius* por marcadores RAPD**. Viçosa: UFV, 1995. 50p. (Tese - Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- KIM, W.D.; MARTENS, J.W.; HOWES, N.K. Electrophoretic analysis of detergent-soluble polypeptides of nine races of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* and their relation to *P. graminis* f.sp. *tritici*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.6, p.111-118, 1984.
- KIMATI, H. Doenças do algodoeiro - *Gossypium* spp. In: GALLI, F., ed. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Ceres, 1980, v.2, p.29-48.
- KIMURA, O.; DIANESE, J.C. Caracterização proteica e isoenzimática dos patovares de *Xanthomonas campestris* que atacam a mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.18, n.11, p.1215-1228, 1983.
- KOZLOWSKI, M.; STEPIÉN, P.P. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid in taxonomy. **Journal of General Microbiology**, London, v.128, part. 3, p.471-476, Mar. 1982.
- LIMA, E.F. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* AS. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose. Viçosa: UFV, 1981. 47p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- LIMA, E.F.; CARVALHO, J.M.F.C.; CARVALHO, L.P.; COSTA, J.N. Transporte e transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, através da semente do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, n.1, p.105-115, fev. 1985.

- LIMA, E.F.; CARVALHO, L.P.; CARVALHO, J.M.F.C. Seleção para resistência à ramulose em algumas cultivares e linhagens de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* HUTCH). In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 4., Belém, 1986. **Resumo...** Belém: EMBRAPA, 1986. p.104.
- LIMA, E.F.; CARVALHO, L.P.; SANTOS, E.O.; CARVALHO, J.M.F.C. Avaliação de germoplasma de algodoeiro para resistência à ramulose causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.3, p.561-565, out. 1984.
- LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 276-298p.
- MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: ESAL/FAEPE, 1988, 107p.
- MACHADO, J.da C.; LANGERAK, C.J. Improvement of a blotter method to detect economically important fungi associated with seeds of cotton. In: **SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING**, Ottawa, 1993. **Proceeding...** Ottawa: ISTA, 1993. p.48-58.
- MALAGUTTI, G. La escobilha del algodón en Venezuela. **Agronomia Tropical**, Recife, v.5, p.73-86, 1955.
- MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academic Sciences of the United States of America**, Washington, v.45, p.453-463. 1959.
- McPHERSON, M.J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G.R. **PCR practical approach**. Oxford: University Press. 1992. 253p.
- MENEZES, M.; OLIVEIRA, M.A.de. **Fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 1993. 277p.
- MICALES, J.A.; BONDE, M.R.; PETERSON, G.L. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. **Mycotaxon**, New York, v.27, p.405-449, 1986.
- MILLS, P.R., SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection of the Anthracnose Pathogen *Colletotrichum*. In: SCHOTS, A.; DEWEY, F.M.; OLIVER, R. **Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Qualification**. Wallingford: Redwood Press, 1994. p.183-189.
- MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.98, p.137-144, 1992.
- MUCHOVEJ, J.J.; MUCHOVEJ, R.M.C. **Noções básicas de Micologia**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1989. 155p.

- MUNSELL COLOR COMPANY, INC. **Munsell soil color charts**. Baltimore, 1975. n.p.
- NAVES, R.de L.; CHITARRA, G.S.; MACHADO, J.da C. Detecção diferencial de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* através do método de incubação em papel de filtro ("Blotter test") modificado. **Informativo Abrates**, Brasília, v.5, n.2, p.100, 1995. (Resumo, n.153).
- NEALE, D.B.; DEVEY, M.E.; JERMSTAD, K.D.; AHUJA, M.R.; ALOSI, M.C.; MARSHALL, K.A. Use of DNA markers in forest tree improvement research. **New For.**, n.5, p.1-17, 1992.
- NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: MacMillan Press, 1977. 1887p.
- OUELLET, T.; SEIFERT, K. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* Strains using RAPD and PCR amplification. **Phytopathology**, St Paul, v.83, n.9, p.1003-1007, Sept. 1993.
- PIZZINATO, M.A. Testes de sanidade de sementes de algodão. In: Soave, J.; Wetzell, M.M.V.S. **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987, p.331-346.
- PIZZINATO, M.A.; CIA, E.; FUZATTO, M.G. Transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes de algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.17, p.217, 1991.
- REGO, A.M.; MAFFIA, L.A.; ALFENAS, A.C. Virulência e análise de isoenzimas de *Colletotrichum orbiculare*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.4, p.552-559, dez. 1994.
- ROHLF, F.J. **Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York: version 1.70, 1992. 470p.
- ROLLO, F.; SALVIR, R.; TORCHIA, P. Highly sensitive and fast detection of *Phoma tracheiphila* by polymerase chain reaction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Springer Verlag, v.32, p.572-576, 1990.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, n.4732, p.1350-1354, Dec. 1985.
- SANTOS, G.R.; ZAMBOLIN, L.; BATISTA, V.G. Transmissão de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por sementes de algodoeiro em função do período de inoculação das plantas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.19, n.3/4, p.177-180, jun./dez. 1993.
- SCHAFFER, C.; WOSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen. *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.136, p.124-136, 1992.

- SCHESSER, K.; LUDER, A.; HENSON, J.H. Use of the polymerase chain reaction to detect the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* in infected wheat plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.553-556, 1991.
- SHERRIFF, C.; BAILEY, J.A. Ribosomal DNA sequences as a means of establishing a phylogenetic taxonomy for the genus *Colletotrichum*. **IACR Report**, v.5, p.55-56, 1991.
- SOBREIRA, D.G. **Qualidade fisiológica e detecção de fungos em alguns lotes de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) produzidas no Estado de Minas Gerais, safra 1985/86**. Lavras: ESAL, 1988. 70p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- SUTTON, B.C. The appressoria of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.46, p.873-876, 1968.
- SUTTON, B.C. **The coelomycetes**. London: Commonwealth Mycological Institute, 1980.
- SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. ***Colletotrichum: Biology, Pathology and Control***. Wallingford: Redwood Press, 1992. 388p.
- TANAKA, M.A.S. Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro. Piracicaba: ESALQ/USP, 1990. 111p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia).
- TANAKA, M.A.S. Problemas na detecção do agente causal da ramulose em sementes de algodão. In: MENTEN, J.O.M. (ed.). **Patógenos em Sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1995. p.93-108.
- TANAKA, M.A.S. Técnicas auxiliares em Laboratório de Patologia de Sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.313-328.
- TANAKA, M.A.S.; MARIANO, M.I.A.; MENTEN, J.O.M. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das semente em função do tempo de exposição. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.15, p.232-237, 1989.
- TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M.; MACHADO, J.C. Growth habit of *Colletotrichum* species on cotton seeds. In: ISTA-INTERNATIONAL SEED TESTING. Association, 24<sup>th</sup> Congress, Copenhagen, June, 7-16 1995. (Papers).
- TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.3, n.2, p.125, 1988.
- TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.15, p.219-225, 1991.

- TEIXEIRA, H. *Colletotrichum gossypii* South: em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) transmissibilidade e controle. Lavras: UFLA, 1995. 74p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- TOOLEY, P.W.; FRY, W.E.; GONZALEZ, M.J.V. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *The Journal of Heredity*, Baltimore, v.76, n.1, p.431-435, Jan./Feb. 1985.
- VASCONCELOS, M.G.V.de Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão *Phaseolus vulgaris* L. pelo uso de marcadores moleculares RAPD. Viçosa: UFV, 1993. 54p. (Tese - Mestrado em Agroquímica).
- VIÉGAS, H.P. Alguns fungos do Brasil. XII. Fungi Imperfect - Melanconiales. *Bragantia*, Campinas, v.6, n.1, p.5-7, jan. 1946.
- VIEIRA, M.G.G.C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro. Lavras: UFLA, 1996. 129p. (Tese de Doutorado em Fitotecnia).
- VILARINHOS, A.D.; PAULO Jr, T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the Random Amplified Polymorphic DNA Technique. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, n.2, p.194-197, jun. 1995.
- VILGALYS, R.; GONZALES, D. Ribossomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St Paul, v.80, n.2, p.151-158, Feb. 1990.
- WATKINS, G.M. *Compendium of Cotton Diseases*. Minn: APS Press, 1981.
- WEBSTER, J. *Introduction of fungi*. 1.ed. Cambridge, The University Press, 1970. 424p.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using P.C.R. with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribossomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GLEFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J., ed. *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, 1989. p.315-322.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEX, S.V. DNA polymorphism and amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.



... (faint text, possibly a title or header)

... (faint text)

... (faint text)

... (faint text)

... (faint text)

... (faint text)

... (faint text)

... (faint text)

... (faint text)

... (faint text)

... (faint text)