



**MARINA NUNES RONDON**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E  
FILOGENIA MOLECULAR DOS AGENTES  
ETIOLÓGICOS DA RAMULOSE E  
ANTRACNOSE DO ALGODOEIRO**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**MARINA NUNES RONDON**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E FILOGENIA MOLECULAR DOS  
AGENTES ETIOLÓGICOS DA RAMULOSE E ANTRACNOSE DO  
ALGODOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Ludwig H. Pfenning

**LAVRAS – MG**

**2013**

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

Rondon, Marina Nunes.

Caracterização biológica e filogenia molecular dos agentes  
etiológicos da ramulose e antracnose do algodoeiro / Marina Nunes  
Rondon. – Lavras: UFLA, 2013.

50 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Ludwig H. Pfenning.

Bibliografia.

1. *Colletotrichum gossypii*. 2. *Colletotrichum gossypii* var.  
*cephalosporioides*. 3. *Gossypium hirsutum*. 4. Patogenicidade. 5.  
MALDI-TOF. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

**MARINA NUNES RONDON**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E FILOGENIA MOLECULAR DOS  
AGENTES ETIOLÓGICOS DA RAMULOSE E ANTRACNOSE DO  
ALGODOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 1º de fevereiro de 2013.

Dr. José da Cruz Machado UFLA

Dr. Lucas Magalhães de Abreu UFLA

Dr. Mário Sobral de Abreu UFLA

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2013**

*A Marcos Tadeu, meu pai; a Laura Joanir, minha mãe, pelo amor, força e incentivo aos estudos.*

*A Flávia, minha irmã, pelo carinho e companheirismo.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço ao professor Ludwig H. Pfenning, pela orientação, disponibilidade e amizade.

Agradeço também à primeira professora de Fitopatologia, Solange Maria Bonaldo, da Universidade Federal de Mato Grosso – Sinop, por ter me proporcionado oportunidades de pesquisa e me iniciado no meio acadêmico.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação de Fitopatologia, que compartilharam seus conhecimentos e não mediram esforços para nos ensinar.

Agradeço aos pós-doutores, Dra. Maria Eloisa Salustiano, Dra. Sarah Costa Guimarães e Dr. Lucas Magalhães de Abreu, pelo apoio no desenvolvimento prático e teórico deste trabalho.

Agradeço a todos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, técnico, colegas e amigos, pela convivência diária, companheirismo e aprendizado.

Agradeço à Embrapa Algodão, Campina Grande PB e ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas, SP, por ceder parte dos isolados; a Silvia Regina Rodrigues de Paula Ribeiro, pela assistência técnica e ao professor Edson Rodrigues Filho, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), pelas análises proteômicas.

À minha família por todo incentivo, amor e carinho ao longo da minha interminável jornada. Sem vocês, esta conquista não teria sido alcançada.

Aos amigos queridos, de casa, de turma, de festas, de UFLA, de Lavras, que, de uma forma ou de outra, contribuíram para alegrar meu dia a dia, sempre dedicados e companheiros, me estimulando a completar a trajetória, agradeço e homenageio a todos.

Enfim, reitero a todos o meu apreço e a minha eterna gratidão.

Muito obrigada!

## RESUMO

A ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC), é uma importante doença que afeta as plantações de algodão no Brasil. Outro patógeno, aqui tratado como *Colletotrichum gossypii* (CG), está associado à antracnose do algodão. Ambos os patógenos são transmitidos pela semente e submetidos a regimes de quarentena em várias partes do mundo. No entanto, um método seguro para a sua detecção não está disponível. Este estudo foi realizado com o objetivo de testar a hipótese de que a ramulose e antracnose do algodão são causadas por patógenos distintos pertencentes ao complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*. Vinte e um isolados de CGC e cinco isolados de CG identificados preliminarmente foram investigados, utilizando-se sequências de ITS rDNA, TUB2 e GAPDH. Isolados representativos de cada espécie foram submetidos a testes de patogenicidade. Observou-se que isolados de CGC e CG formaram duas linhagens filogenéticas distintas dentro do clado delimitado recentemente *Colletotrichum theobromicola*, nas árvores TUB2 e GAPDH, bem como na árvore obtida com o conjunto de dados combinados (ITS rDNA + TUB2 + GAPDH). Em testes de patogenicidade, os isolados de CGC induziram necrose foliar em torno de sete dias após a inoculação, seguida por morte do meristema apical, encurtamento de entrenós e ramificação lateral anormal. Plantas inoculadas com isolados de CG apresentaram manchas necróticas foliares cerca de dois meses após a inoculação, sem sintomas adicionais. Estes resultados confirmam a distinção entre CGC e CG e da classificação de ambos os patógenos dentro do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*. Análises de perfil proteômico por MALDI-TOF também permitiram a diferenciação das linhagens. A disponibilidade de marcadores filogenéticos obtidos a partir de isolados de referência de patogenicidade conhecida neste estudo será útil no desenvolvimento de ensaios baseados em PCR para um diagnóstico confiável de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, em amostras de sementes.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*. *Colletotrichum gossypii*. *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides*. Patogenicidade. MALDI-TOF.

## ABSTRACT

Ramulosis, caused by *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC), is an important disease affecting cotton plantations in Brazil. Another pathogen, known as *Colletotrichum gossypii* (CG) is associated with anthracnose of cotton. Both pathogens are seed transmitted and subject of quarantine legislation. Nevertheless, there is no reliable method available for detection of these pathogens. The objective of this study was to test the hypothesis that ramulosis and anthracnose of cotton are caused by two distinct pathogens within the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Twenty one isolates previously identified as CGC and five isolates identified as CG were analyzed using sequences of ITS rDNA, TUB2 and GAPDH. Isolates of CGC and CG formed two clearly distinct phylogenetic lineages within the recently delimited *Colletotrichum theobromicola* clade, as shown in the TUB2 e GAPDH trees, as well in the combined analysis of ITS rDNA + TUB2 + GAPDH. Representative isolates of each pathogen were used in pathogenicity tests. Isolates of CGC induced foliar necrosis beginning seven days after inoculation, followed by the death of the apical meristem, shortening of the internodes and abnormal lateral ramification. Plants inoculated with CG had necrotic leaf spots beginning two months after inoculation, with no further symptoms. These results confirm that ramulosis and anthracnose have distinct etiological agents which induce typical symptoms. Analysis of protein profiles obtained by MALDI-TOF mass spectrometry confirmed the distinction between the pathogens. Our findings will give additional support for quarantine measures and the development of PCR based protocols for the detection of CGC in seed health testing.

Keywords: *Gossypium hirsutum*. *Colletotrichum gossypii*. *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides*. Pathogenicity. MALDI-TOF.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
2	ESTADO DA ARTE .....	12
2.1	As doenças e os sintomas .....	12
2.2	Histórico.....	13
2.3	Tendências modernas na pesquisa de <i>Colletotrichum</i> .....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	Obtenção dos isolados e preservação .....	17
3.2	Caracterização morfológica.....	20
3.3	Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento .....	20
3.4	Análises filogenéticas .....	22
3.5	Testes de patogenicidade .....	22
3.6	Espectrometria de massas MALDI-TOF .....	24
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Caracterização morfológica.....	27
4.2	Análises filogenéticas .....	29
4.3	Testes de patogenicidade .....	34
4.4	Espectrometria de massas MALDI-TOF .....	37
5	DISCUSSÃO .....	39
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
7	CONCLUSÃO .....	45
	REFERÊNCIAS .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

A ramulose é uma das mais importantes doenças do algodão (*Gossypium hirsutum*), no Brasil, ocorre nas principais áreas produtoras (SILVA-MANN et al., 2005). A doença também foi registrada no Paraguai e na Venezuela (MALAGUTI, 1955; MATHIESON; MANGANO, 1985) e pode estar presente em outros países da América do Sul. A cultura do algodão também é afetada por outra doença, a antracnose.

No Brasil, o agente causal da antracnose do algodão é chamado de *Colletotrichum gossypii*, embora não haja evidência sólida de que este seja o mesmo patógeno que causa a antracnose e a podridão de maçãs de algodão nos Estados Unidos (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012). No entanto, no Brasil, antracnose e ramulose parecem ser causadas por dois patógenos diferentes que pertencem ao complexo *Colletotrichum gloeosporioides* (BAILEY et al., 1996; SILVA-MANN et al., 2005; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

A doença ramulose foi primeiramente descrita em fazendas de algodão, no estado de São Paulo, por Costa e Fraga Jr. (1937) e, mais tarde, seu agente etiológico foi identificado como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, pelos mesmos autores (COSTA; FRAGA JR., 1939), que consideraram o patógeno como uma forma mais agressiva de *Colletotrichum gossypii*, outro patógeno do algodão descrito anteriormente, nos EUA (ATKINSON, 1891; SOUTHWORTH, 1890). Em 1946, Viégas validou o nome desta variedade, fornecendo uma descrição formal e indicando um tipo (VIÉGAS, 1946).

Os dois patógenos, que causam a ramulose e a antracnose, são transmitidos via semente de algodão. O nível de tolerância proposto para o patógeno da ramulose em lotes de sementes comerciais é zero, tal como definido pela autoridade fitossanitária brasileira (BRASIL, 2005) e o agente patogênico é também de importância quarentenária na Europa (EPPO, 2009). Testes de

sanidade são rotineiramente utilizados para a detecção do agente patogênico da ramulose em sementes (TANAKA; MENTEN; MACHADO, 1996). No entanto, a avaliação de marcadores morfológicos das culturas derivadas destes testes não é suficiente para uma identificação confiável, de acordo com o conceito atual de espécies no gênero *Colletotrichum* (CAI et al., 2009; 2011; CANNON et al., 2012).

Devido à importância econômica dessas doenças e à aparente restrição geográfica do seu agente etiológico, uma melhor legislação de quarentena e avaliações de risco da doença dependerá da correta identificação do patógeno, utilizando-se metodologias modernas de filogenia molecular, com posterior desenvolvimento de metodologias baseadas em detecção por PCR, código de barras de DNA e outros métodos de diagnóstico (CAI et al., 2011).

Neste estudo, objetivou-se testar a hipótese de que a ramulose e a antracnose do algodão são causadas por agentes patogênicos distintos, pertencentes ao complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*. Para isso, foram avaliados marcadores morfológicos, realizadas análises de filogenia molecular a partir das sequências parciais do gene beta tubulina (TUB2) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), e a sequência completa da região ITS rDNA, conduzidos testes de patogenicidade e análise proteômica por espectrometria de massas MALDI-TOF.

## 2 ESTADO DA ARTE

### 2.1 As doenças e os sintomas

A antracnose é uma doença que afeta a cultura do algodoeiro e tem como agente causal o fungo *Colletotrichum gossypii* Southworth (teleomorfo *Glomerella gossypii*). Seus sintomas são apodrecimento nos frutos, conhecidos por maçãs e tombamento de plântulas (SOUTHWORTH, 1890).

O patógeno *C. gossypii* pode ocorrer em qualquer parte do algodoeiro, podendo ser altamente prejudicial para os frutos. As plântulas de algodão, quando afetadas pela antracnose, apresentam lesões deprimidas nas raízes e no colo e têm coloração pardo-avermelhadas a pardo-escuras, o que resulta em tombamento. *C. gossypii* pode viver saprofiticamente em restos de cultura. Entretanto, são as sementes contaminadas que constituem a principal fonte de inóculo (CIA; SALGADO, 1997).

De acordo com Costa e Fraga Jr. (1939), a doença conhecida como ramulose é causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, uma vez que observaram sintomas característicos nas plantas de algodão, porém, com caracteres morfológicos semelhantes aos de *C. gossypii* South.

Os sintomas iniciais da ramulose são pontos circulares em folhas jovens causando necrose, principalmente perto da nervura central, e o posterior desenvolvimento de perfurações em forma de estrela nas folhas. Em ramos afetados, a doença causa a morte de meristemas apicais e a brotação anormal de gemas laterais, levando à formação de aglomerados de ramos com entrenós curtos e inchados (KIRKPATRICK; ROTHROCK, 2001). Nas hastes pouco lenhosas ocorrem lesões necróticas elípticas, pardo-escuras, enquanto em tecidos mais velhos as lesões são cicatrizadas. Raramente, observou-se a ramulose em

plantas novas, e o patógeno ataca, preferencialmente, tecidos novos (COSTA; FRAGA JR., 1937).

A partir da caracterização do hábito de crescimento dos patógenos *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes foram verificadas características inerentes a cada um dos patógenos, permitindo a identificação do patógeno em sementes de algodoeiro incubadas (TANAKA; MENTEN; MACHADO, 1996). Contudo, não houve outros trabalhos utilizando técnicas para a separação pelas características morfológicas.

Os caracteres morfológicos como formato e tamanho de conídios, coloração da colônia são dependentes de inúmeras variáveis e, por isso, são instáveis. Além disso, a reprodução de sintomas semelhantes em diferentes cultivares de algodão tem dificultado a diagnose da doença. A partir da utilização das técnicas moleculares e bioquímicas, o diagnóstico de doenças em plantas tornou-se mais fácil, com métodos rápidos, sensíveis e específicos (CARVALHO; VIEIRA; MACHADO, 1997).

Diversos trabalhos têm sido conduzidos para esclarecer as dúvidas pertinentes à correta identificação dos patógenos, agentes causais da antracnose e da ramulose em algodoeiro. A diferenciação entre os dois patógenos é baseada, principalmente, em métodos tradicionais, como avaliação dos sintomas causados em plantas de algodão ou características morfológicas do fungo, porém, estes nem sempre apresentam resultados precisos e satisfatórios (SILVA-MANN et al., 2002; TANAKA; MENTEN; MACHADO, 1996).

## **2.2 Histórico**

O patógeno *Colletotrichum gossypii* South. foi observado em áreas produtoras de algodão atacando todas as partes da planta, e com maior frequência causando doença em frutos de algodoeiro (maçãs) na América do

Norte. A partir disso, o patógeno foi descrito utilizando o fruto como material infectado e a descrição foi feita, primeiramente, por Southworth (1890). Em 1891, Atkinson, ao investigar outras doenças no algodoeiro, encontrou o mesmo fungo na superfície de folhas sintomáticas, com o inóculo se espalhando rapidamente pelo campo de cultivo (ATKINSON, 1891). Por fim, descreveu-se o teleomorfo *Glomerella gossypii*, isolado a partir de maçãs de algodoeiro que apresentavam peritécios e que foram coletadas no estado da Louisiana, EUA (EDGERTON, 1909).

No ano de 1936, uma doença foi observada ocorrendo em cultivos de algodão no estado de São Paulo, que foi identificada, erroneamente, como “crumpling disease”. Após o conhecimento da ocorrência de uma doença que ainda não havia sido relatada no estado, pesquisadores do Instituto Agronômico de Campinas a identificaram e a descreveram. A partir de observações de plantas sintomáticas, os sintomas foram descritos e a doença nomeada como “superbrotamento ou ramulose do algodoeiro”, porém, não foi possível identificar seu agente causal (COSTA; FRAGA JR., 1937). Somente em 1939, o agente causal da ramulose foi descrito no Brasil como sendo o patógeno *Colletotrichum gossypii* (South) var. *cephalosporioides* A. S. Costa, por apresentar caracteres morfológicos muito semelhantes a *C. gossypii* South. Foi possível observar algumas diferenças entre os dois organismos, dentre elas a sintomatologia diferenciada de cada um (COSTA; FRAGA JR., 1939).

Os resultados publicados por Costa e Fraga Jr. (1937; 1939) sobre a etiologia da doença denominada ramulose são citados frequentemente por diversos autores, porém, não há fatos conclusivos para a diferenciação entre as duas prováveis espécies, sendo necessárias outras abordagens com a aplicação de técnicas modernas (HYDE et al., 2009).

### 2.3 Tendências modernas na pesquisa de *Colletotrichum*

Espécies do gênero *Colletotrichum* são agentes causais de doenças importantes, sendo responsável por diversas antracnoses e outras doenças em uma ampla gama de hospedeiros. Nem sempre a utilização de métodos tradicionais para identificação de fungos, baseados em características morfológicas, tem demonstrado resultados precisos e satisfatórios. Em revisão sobre o gênero *Colletotrichum*, verificou-se que o nome *C. gossypii* tem sido utilizado para duas prováveis espécies que causam diferentes sintomatologias no algodoeiro (HYDE et al., 2009; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

Um problema é a falta de características morfológicas confiáveis para a sistematização do gênero *Colletotrichum*, fazendo com que os limites entre as espécies sejam ambíguos e confusos. Isso, conseqüentemente, levou diversos autores a nomearem diferentes patógenos de acordo com sua especificidade de hospedeiro (HYDE et al., 2009). Essa dificuldade em reconhecer espécies de *Colletotrichum* é resultado de alguns fatores, como o número reduzido de caracteres morfológicos e que, na maioria das vezes, são variáveis; elas têm uma extensa gama de hospedeiros e apresentam variabilidade na patogenicidade; os espécimes tipo, muitas vezes, não existem ou se encontram em condições precárias, dificultando os estudos moleculares, e os nomes associados às sequências de genes, geralmente, estão errados nos bancos de dados (CAI et al., 2009; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

Com a ineficiência dos métodos tradicionais, outras técnicas têm sido utilizadas, como os marcadores moleculares de DNA, bioquímicos. Os marcadores moleculares têm demonstrado sucesso na identificação de outras espécies fúngicas ou linhagens intraespecíficas. Com padrões eletroforéticos de algumas isoenzimas foi possível encontrar diferenças entre os patógenos que causam antracnose e ramulose no algodoeiro (CARVALHO; VIEIRA;

MACHADO, 1997). Marcadores bioquímicos, a partir de análises isoenzimáticas de esterase, fosfatase ácida e peroxidase, não foram capazes de fazer distinção entre isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (SILVA-MANN et al., 2002).

Foi sugerido que, a partir da utilização da técnica de AFLP, é possível distinguir os isolados que causam antracnose dos isolados que causam ramulose. Estes resultados foram baseados em dez isolados com baixa representatividade (SILVA-MANN et al., 2005).

A partir de estudos moleculares da região ITS2 e do domínio D2 do gene 28S, os autores sugeriram que os isolados provenientes de algodão devem ser considerados uma *formae specialis* de *C. gloeosporioides* (BAILEY et al., 1996). A região ITS tem sido a mais utilizada para as análises moleculares do gênero *Colletotrichum*, porém, existem preocupações quanto à sua utilização, devido à baixa resolução que o gene tem fornecido para diferenciação das espécies (CAI et al., 2009). Isolados de *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* não foram separados em dois grupos distintos com a aplicação de algumas técnicas moleculares baseadas na região ITS (MEHTA; MEHTA, 2010).

A obtenção de perfis de proteínas de isolados fúngicos por espectrometria de massas MALDI-TOF é uma técnica que vem sendo aplicada para a identificação rápida e precisa, e consiste na obtenção de variados espectros que, juntos, formam um espectro principal (em inglês *main spectrum* ou MSP) (SANTOS et al., 2010). Os MSPs obtidos em outros estudos a partir de análises proteômicas apresentam topologia de árvores semelhantes de estudos filogenéticos moleculares (DE RESPINIS et al., 2010; DRUZHININA et al., 2005).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção dos isolados e preservação**

Vinte e um isolados considerados como *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* foram isolados a partir de plantas de algodão que apresentavam sintomas de ramulose em áreas produtoras dos estados de Goiás, Mato Grosso e São Paulo. Cinco isolados foram obtidos a partir de folhas, das maçãs e de amostras de sementes derivadas de plantas que apresentavam sintomas de antracnose nos estados da Bahia e São Paulo (Tabela 1). Culturas monospóricas de todos os isolados foram obtidas a partir de culturas puras. Todos os isolados estão preservados, a -80 °C, na Coleção Micológica de Lavras (CML), na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, Brasil.

Tabela 1 Isolados de *Colletotrichum* avaliados e números de acesso do GenBank das sequências geradas ou utilizadas neste estudo

Espécies	CML <sup>a</sup>	Outro código <sup>b</sup>	Hospedeiro/Substrato	Origem <sup>c</sup>	ITS	TUB2	GAPDH	
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2318	CNPA 27	<i>G. hirsutum</i> / folha	Santa Helena do Goiás, GO	JX844091	JX844117	--	
	2371	CNPA 53	<i>G. hirsutum</i> / folha	Santa Helena do Goiás, GO	JX844074	JX844100	--	
	2372	CNPA 54	<i>G. hirsutum</i> / folha	Primavera do Leste, MT	JX844075	JX844101	--	
	2373	CNPA 57	<i>G. hirsutum</i> / folha	Mineiros, GO	JX844076	JX844102	--	
	2374	CNPA 58	<i>G. hirsutum</i> / folha	Primavera do Leste, MT	JX844077	JX844103	JX847009	
	2375	CNPA 59	<i>G. hirsutum</i> / folha	Mineiros, GO	JX844078	JX844104	--	
	2376	CNPA 60	<i>G. hirsutum</i> / folha	Campo Verde, MT	JX844079	JX844105	--	
	2377	CNPA 61	<i>G. hirsutum</i> / folha	Primavera do Leste, MT	JX844080	JX844106	--	
	2378	CNPA 62	<i>G. hirsutum</i> / folha	Mineiros, GO	JX844081	JX844107	--	
	2379	CNPA 63	<i>G. hirsutum</i> / folha	Mineiros, GO	JX844082	JX844108	JX847010	
	2380	CNPA 65	<i>G. hirsutum</i> / folha	Novo São Joaquim, MT	JX844083	JX844109	--	
	2381	CNPA 66	<i>G. hirsutum</i> / folha	Novo São Joaquim, MT	JX844084	JX844110	--	
	2382	CNPA 69	<i>G. hirsutum</i> / folha	Pedra Preta, MT	JX844085	JX844111	--	
	2383	CNPA 70	<i>G. hirsutum</i> / folha	Itiquira, MT	JX844086	JX844112	--	
	2384	CNPA 71	<i>G. hirsutum</i> / folha	Itiquira, MT	JX844087	JX844113	JX847011	
	2385	CNPA 72	<i>G. hirsutum</i> / folha	Primavera do Leste, MT	JX844088	JX844114	--	
	2386	CNPA 74	<i>G. hirsutum</i> / folha	Itiquira, MT	JX844089	JX844115	--	
	2387	CNPA 75	<i>G. hirsutum</i> / folha	Itiquira, MT	JX844090	JX844116	--	
	2388	IAC 13350	<i>G. hirsutum</i> / folha	Piracicaba, SP	JX844092	JX844118	JX847012	
	2389	IAC 12405	<i>G. hirsutum</i> / folha	Ituverava, SP	JX844093	JX844119	JX847013	
	2390	IAC 11327	<i>G. hirsutum</i> / folha	Piracicaba, SP	JX844094	JX844120	--	
	<i>C. gossypii</i>	2324	IAC 1025	<i>G. hirsutum</i> / folha	Campinas, SP	JX844095	JX844121	JX847014
		2325	CG 1 LEM	<i>G. hirsutum</i> / semente	Luis E. Magalhães, BA	JX844097	JX844123	JX847015
		2326	CG 715 LEM	<i>G. hirsutum</i> / semente	Luis E. Magalhães, BA	JX844098	JX844124	--
		2327	CG 3 LEM	<i>G. hirsutum</i> / semente	Luis E. Magalhães, BA	JX844099	JX844125	JX847016
		2391	IAC 5393	<i>G. hirsutum</i> / maçã	Campinas, SP	JX844096	JX844122	--
	<i>C. 'gloeosporioides'</i>	1590		<i>Coffea</i> sp./ fruto				
<i>C. asianum</i>		ICMP 18696	<i>Mangifera indica</i>	Austrália	JX010192	JX010384	JX009915	
		ICMP 18580	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	FJ972612	JX010406	JX010053	
<i>C. boninense</i>		CBS 112115	<i>Leucospermum</i> sp.	Austrália	JQ005160	JQ005594	JQ005247	
		CBS 123755	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japão	JX010292	JQ005588	JX009905	
<i>C. fructicola</i>		ICMP 18645	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010172	JX010408	JX009992	

Tabela 2, conclusão

	ICMP 18581	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JX010165	JX010405	JX010033
<i>C. gloeosporioides</i>	IMI 356878	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	JX010152	JX010445	JX010056
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>kahawae</i>	ICMP 17905	<i>Coffea arabica</i>	Camarões	JX010232	JX010431	JX010046
	ICMP 17816	<i>Coffea arabica</i>	Quênia	JX010231	JX010444	JX010012
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JX010171	JX010404	JX009924
	ICMP 17795	<i>Malus domestica</i>	Estados Unidos	JX010162	JX010393	JX010051
<i>C. theobromicola</i>	ICMP 17958	<i>Stylosanthes guianensis</i>	Austrália	JX010291	JX010381	JX009948
	ICMP 18566	<i>Olea europaea</i>	Austrália	JX010282	JX010376	JX009953
	ICMP 18565	<i>Olea europaea</i>	Austrália	JX010283	JX010374	JX010029
	ICMP 18567	<i>Olea europaea</i>	Austrália	JX010287	JX010377	JX009985
	ICMP 17895	<i>Annona diversifolia</i>	México	JX010284	JX010382	JX010057
	ICMP 18649	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010294	JX010447	JX010006
	ICMP 17814	<i>Fragaria vesca</i>	Estados Unidos	JX010288	JX010379	JX010003
<i>C. theobromicola</i> (syn. <i>C. fragariae</i> )	ICMP 17927	<i>Fragaria x ananassa</i>	Estados Unidos	JX010286	JX010373	JX010024
<i>C. theobromicola</i> (syn. <i>C. gloeosporioides</i> f. <i>stylosanthis</i> )	ICMP 17957	<i>Stylosanthes viscosa</i>	Austrália	JX010289	JX010380	JX009962

<sup>a</sup> CML – Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil; <sup>b</sup> CNPA - Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa em Algodão, Campina Grande, PB, Brasil; IAC - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP, Brasil; ICMP – International Collection of Microorganisms from Plants, New Zealand; CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. <sup>c</sup> Estados brasileiros: BA – Bahia, GO – Goiás, MT – Mato Grosso, SP – São Paulo

### 3.2 Caracterização morfológica

Para a avaliação dos caracteres morfológicos, culturas monospóricas foram cultivadas, em triplicatas, em batata dextrose ágar (BDA) (Sigma Aldrich, Madrid, Espanha) e ágar extrato de malte 2% (MEA) (HIMEDIA, Mumbai, Índia), durante sete dias, a 20 °C, 25 °C e 30 °C, sob luz fluorescente constante. O diâmetro das colônias foi medido diariamente e utilizado para calcular as taxas médias de crescimento, em mm.dia<sup>-1</sup>. O tamanho e a forma de 30 conídios escolhidos aleatoriamente foram medidos a partir de cada isolado cultivado em BDA e MEA, a 25 °C. O tamanho e a forma de 120 conídios coletados a partir de folhas e caules de plantas inoculadas nos testes de patogenicidade e mostrando sintomas de ramulose ou antracnose também foram medidos e registrados. A taxa de crescimento das colônias e o comprimento de conídios foram avaliados por meio de box-plots (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

### 3.3 Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

Culturas monospóricas cultivadas em BDA por sete dias foram raspadas a partir da superfície de ágar e submetidas à extração do DNA genômico, utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. As concentrações de DNA foram medidas usando NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA).

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o kit Master Mix GoTaq® Incolor (Promega) no termociclador My Cycler™ (Bio-Rad, Hercules, EUA). O mesmo conjunto de *primers* foi utilizado para as reações de PCR e sequenciamento. Porções do DNA ribossomal nuclear, incluindo os espaçadores internos transcritos 1 e 2, bem como a região 5.8S (ITS), foram amplificados

com os *primers* ITS1Ext (*forward*; 5'-GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') e ITS4Ext (*reverse*; 5'-TTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), utilizando as seguintes condições de ciclo: (1) desnaturação, por 5 minutos, a 95 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturação, a 94 °C, por 30 segundos; (2) anelamento, por 30 segundos a 55 °C; (3) extensão, por 2 minutos a 72 °C, com extensão final, de 7 minutos, a 72 °C (TALHINHAS et al., 2002). Uma porção do gene beta tubulina (TUB2) foi amplificada com os *primers* TB5 (*forward*; 5'-GGTAACCAGATTGGTGCTGCCTT-3') e TB6 (*reverse*; 5'-GCAGTCGCAGCCCTCAGCCT-3') (PANACCIONE; HANAU, 1990), em 35 ciclos de PCR com as mesmas condições descritas para a amplificação de ITS, exceto para a temperatura de anelamento, que foi ajustada para 62°C. O fragmento do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi amplificado utilizando-se os *primers* GDF1 (*forward*; 5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3') e GDR1 (*reverse*; 5'-GGGTGGAGTCGTACTIONTGTGAGCATGT-3') (TEMPLETON et al., 1992), com as seguintes condições de ciclo: (1) desnaturação, por 5 minutos, a 94 °C; seguido por 34 ciclos de desnaturação, a 94 °C, por 45 segundos; (2) anelamento, por 45 segundos, a 60 °C; (3) extensão, 1 minuto, a 72 °C, com extensão final de 10 minutos, a 72 °C (PRIHASTUTI et al., 2009).

Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit Invisorb<sup>®</sup> Fragment Clean Up (Stratec Molecular, Berlim, Alemanha). O sequenciamento dos fragmentos gênicos foi realizado em sequenciador automático MegaBACE 500 (Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil), no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, Brasil.

### 3.4 Análises filogenéticas

Sequências consenso foram montadas a partir das sequências *forward* e *reverse*, utilizando-se SeqAssem ver. 07/2008 (SequentiX, Klein Raden, Alemanha). Sequências adicionais de membros do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012) foram obtidas a partir do GenBank (Tabela 1). As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se o programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). As sequências foram alinhadas usando MUSCLE implementado no MEGA 5. Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança foram construídas para cada um dos genes e para o conjunto de dados combinados com o modelo de Kimura-2 parâmetros de evolução da sequência de DNA. O suporte dos cladogramas foi inferido a partir de 1.000 replicações da análise de *bootstrap* (PHOULIVONG et al., 2010). As sequências geradas neste estudo foram depositadas no Genbank (Tabela 1).

### 3.5 Testes de patogenicidade

Os testes de patogenicidade foram realizados com sete isolados do patógeno da ramulose *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (CML 2371, CML 2374, CML 2383, CML 2385, CML 2386, CML 2389, CML 2390) e cinco isolados do patógeno da antracnose *C. gossypii* (CML 2324, CML 2325, CML 2326, CML 2327, CML 2391). Um isolado adicional de *C. 'gloeosporioides'* (CML 1590), endófito da folha de cafeeiro, também foi incluído nos ensaios de patogenicidade. Dois experimentos foram conduzidos utilizando-se as cultivares de algodão DeltaOPAL<sup>®</sup> (MDM) e FiberMax 966 LL<sup>®</sup> (Bayer CropScience), inoculados 32 dias após a emergência das plantas. Um terceiro experimento foi realizado com a cultivar FiberMax 966 LL<sup>®</sup> e inoculado 52 dias após a emergência das plantas.

Cada isolado foi cultivado em BDA, a 25 °C, com 12 horas de fotoperíodo, durante 10 dias, para induzir a esporulação. As suspensões de conídios foram preparadas por adição de água destilada estéril às placas e o micélio foi raspado suavemente. As suspensões resultantes foram filtradas por meio de dupla camada de gaze e a concentração de conídios ajustada a  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>. As sementes de algodão foram plantadas em vasos de 5 L, contendo uma mistura de solo, areia e esterco bovino (2:1:1), e as plantas foram mantidas numa casa de vegetação com 80% de umidade relativa e temperatura média de cerca de 25°C, próximo do ótimo para a progressão de ramulose (MONTEIRO et al., 2009). Duas mudas com hábito de crescimento uniforme foram mantidas em cada vaso. As plantas foram inoculadas 32 (Experimento 1 e 2) ou 52 (Experimento 3) dias após a emergência, por pulverização da suspensão de conídios até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as plantas foram colocadas em câmara úmida durante 72 horas e transferidas de volta para a casa de vegetação. Plantas pulverizadas com água destilada estéril serviram como controle negativo. Cada tratamento foi composto por quatro repetições, com duas plantas cada, dispostos em um delineamento inteiramente casualizado.

As plantas foram avaliadas quanto aos sintomas da doença em intervalos de três dias, durante as primeiras duas semanas, e em intervalos de oito dias, durante dez semanas. Sintomas da doença foram avaliados utilizando-se uma escala qualitativa desenvolvida para ramulose por Araújo et al. (2003), com as seguintes notas e descrições: 1 - plantas sem sintomas; 2 - plantas com necrose e manchas em folhas jovens; 3 - plantas que apresentam manchas necróticas em folhas e caules, morte dos meristemas apicais e entrenós encurtados; 4 - plantas com necrose e manchas nas folhas e caules, entrenós encurtados e superbrotamento e 5 - plantas mostrando manchas necróticas em folhas, entrenós encurtados, superbrotamento e redução no tamanho. O reisolamento dos patógenos de plantas doentes foi feito no final do experimento para completar o

postulado de Koch. As médias dos resultados das avaliações da doença foram calculadas entre os isolados de cada espécie dos agentes patogênicos e avaliadas em intervalos de tempo discretos (MONTEIRO et al., 2009).

### 3.6 Espectrometria de massas MALDI-TOF

A obtenção de perfis de proteínas dos isolados de *Colletotrichum* por espectrometria de massas utilizando a técnica MALDI-TOF foi realizada no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, em parceria com o professor Edson Rodrigues Filho, como atividade do projeto em rede SISBIOTA.

Os isolados foram inoculados, em duplicata, em placas de poliestireno de 60 mm contendo o meio de cultura ágar extrato de malte 2% (MEA) e incubados, a 23°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz branca, durante sete dias (Tabela 2). Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, pequenas porções das colônias contendo conídios foram retiradas com palitos de madeira esterilizados e transferidas diretamente para os poços de uma placa de amostras de aço polido (MPT384 *target plate*, Bruker Daltonics, Bremen, DE). Sete isolados (CML 2325, 2372, 2377, 2379, 2382, 2387 e 2391) não esporularam e pequenas porções de micélio foram utilizadas como amostras. Após a aplicação, as amostras foram recobertas com 2 µL da solução de matriz, composta por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) dissolvido em água, acetonitrila e TFA (H<sub>2</sub>O-ACN-TFA 1,0:0,95:0,05), e secas em temperatura ambiente.

Os espectros de massa foram obtidos em um sistema Autoflex Speed TOF/TOF, composto por uma fonte de ionização MALDI e um analisador de massas por tempo de voo (TOF), controlado pelo software Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics, Bremen, DE). Foram adquiridos e acumulados até 500

espectros por cada amostra depositada na placa, no intervalo de massa/carga (m/z) de 2.500 a 20.000, dando origem a um espectro composto. Cada repetição biológica foi aplicada em três poços da placa e cada poço foi avaliado três vezes. Um total de 18 espectros compostos (2 placas x 3 poços/placa x 3 avaliações/poço) foi adquirido para cada isolado.

Os espectros obtidos de cada isolado foram carregados no programa MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics), processados utilizando algoritmos padrões contidos no software e utilizados para a montagem de um MSP, em que picos presentes em, pelo menos, 25% dos 18 espectros compostos de cada isolado foram incorporados ao respectivo MSP. Os MSPs foram identificados com os códigos dos respectivos isolados e submetidos à análise multivariada de classificação para a obtenção de um dendrograma.

Tabela 2 Isolados de *Colletotrichum* analisados por espectrometria de massas MALDI-TOF

Espécies	CML <sup>a</sup>	Outro código	Hospedeiro/substrato	Origem <sup>b</sup>	
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	2318	CNPA 27	<i>G. hirsutum</i> /folha	Santa Helena do Goiás, GO	
	2371	CNPA 53	<i>G. hirsutum</i> /folha	Santa Helena do Goiás, GO	
	2372	CNPA 54	<i>G. hirsutum</i> /folha	Primavera do Leste, MT	
	2374	CNPA 58	<i>G. hirsutum</i> /folha	Primavera do Leste, MT	
	2375	CNPA 59	<i>G. hirsutum</i> /folha	Mineiros, GO	
	2376	CNPA 60	<i>G. hirsutum</i> /folha	Campo Verde, MT	
	2377	CNPA 61	<i>G. hirsutum</i> /folha	Primavera do Leste, MT	
	2378	CNPA 62	<i>G. hirsutum</i> /folha	Mineiros, GO	
	2379	CNPA 63	<i>G. hirsutum</i> /folha	Mineiros, GO	
	2380	CNPA 65	<i>G. hirsutum</i> /folha	Novo São Joaquim, MT	
	2381	CNPA 66	<i>G. hirsutum</i> /folha	Novo São Joaquim, MT	
	2382	CNPA 69	<i>G. hirsutum</i> /folha	Pedra Preta, MT	
	2383	CNPA 70	<i>G. hirsutum</i> /folha	Itiquira, MT	
	2384	CNPA 71	<i>G. hirsutum</i> /folha	Itiquira, MT	
	2385	CNPA 72	<i>G. hirsutum</i> /folha	Primavera do Leste, MT	
	2386	CNPA 74	<i>G. hirsutum</i> /folha	Itiquira, MT	
	2387	CNPA 75	<i>G. hirsutum</i> /folha	Itiquira, MT	
	2388	IAC 13350	<i>G. hirsutum</i> /folha	Piracicaba, SP	
	2389	IAC 12405	<i>G. hirsutum</i> /folha	Ituverava, SP	
	<i>C. gossypii</i>	2390	IAC 11327	<i>G. hirsutum</i> /folha	Piracicaba, SP
2458		LAPS 341	<i>G. hirsutum</i> /folha	Dourados, MS	
569		-	<i>G. hirsutum</i> /maçã	Porto Alegre, RS	
2324		IAC 1025	<i>G. hirsutum</i> /folha	Campinas, SP	
2325		CG 1 LEM	<i>G. hirsutum</i> /semente	Luis E. Magalhães, BA	
2326		CG 715 LEM	<i>G. hirsutum</i> /semente	Luis E. Magalhães, BA	
2327		CG 3 LEM	<i>G. hirsutum</i> /semente	Luis E. Magalhães, BA	
2391		IAC 5393	<i>G. hirsutum</i> /maçã	Campinas, SP	
<i>Colletotrichum</i> sp.		2459	LAPS 30	<i>G. hirsutum</i> /folha	Maracaju, MS
		2460	LAPS 32	<i>G. hirsutum</i> /folha	Primavera do Leste, MT
	2461	LAPS 33	<i>G. hirsutum</i> /maçã	Primavera do Leste, MT	

<sup>a</sup> CML – Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. <sup>b</sup> Estados brasileiros: BA – Bahia, GO – Goiás, MS – Mato Grosso do Sul, MT – Mato Grosso, RS – Rio Grande do Sul, SP – São Paulo

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização morfológica

Isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* exibiram uma variada gama de formas e cores de colônia, refletindo uma variação fenotípica natural ou efeitos da preservação prolongada *in vitro*. A taxa de crescimento médio variou de 7-14 mm.dia<sup>-1</sup>, para os isolados cultivados em MEA, e de 5,5-12 mm.dia<sup>-1</sup>, para aqueles cultivados em BDA (Figura 1). A temperatura mais favorável para o crescimento micelial foi de 25 °C, nos dois meios de cultura.

Isolados de *C. gossypii* tendem a crescer mais rápido do que *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em BDA, nas três temperaturas (Figura 1A) e a 30 °C, em MEA (Figura 1B). O tamanho e a forma de conídios produzidos por *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* foram muito semelhantes, independente do meio de cultura ou da temperatura. Os conídios apresentaram formato reto-cilíndrico, afilado em direção à base, com largura de 2,5-5 µm. O comprimento médio de conídios foi de 12,5 µm, para isolados cultivados em MEA e 15 µm, para isolados cultivados em BDA. Os conídios avaliados diretamente dos acérvulos das folhas da planta, *in vivo*, apresentaram comprimento médio de 15 µm (Figura 1C).

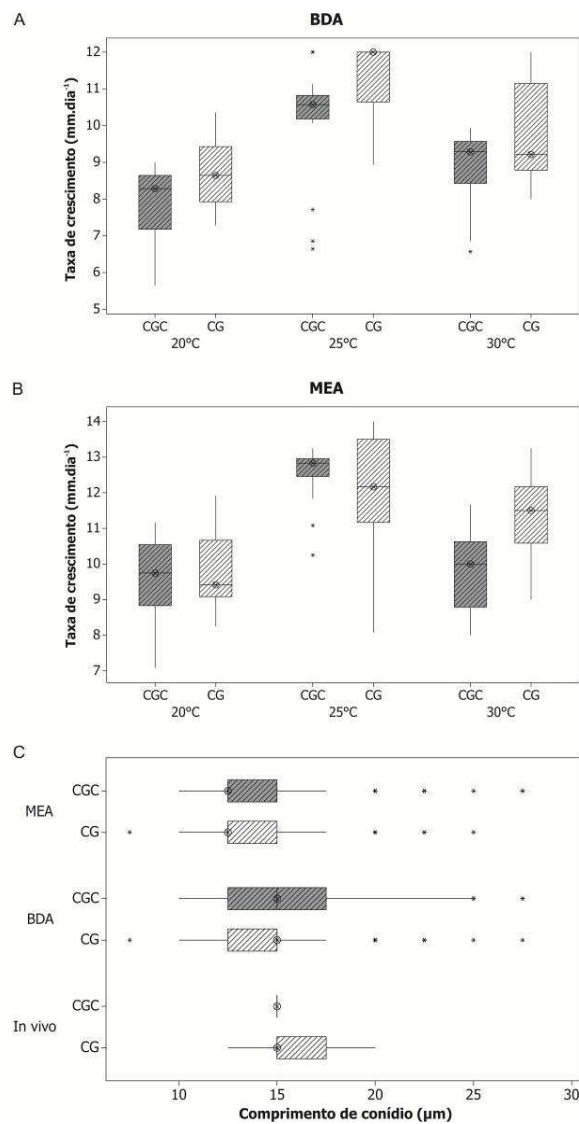


Figura 1 *Box-plots* mostrando taxas de crescimento ( $\text{mm.dia}^{-1}$ ) de isolados de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC) e *Colletotrichum gossypii* (GC), em três temperaturas (20 °C, 25 °C e 30 °C) em BDA (A) e MEA (B); (C) comprimento de conídios de CGC e CG cultivados em MEA e BDA, ou isolados de plantas sintomáticas (*in vivo*). As caixas mostram o intervalo interquartil, o círculo dentro das caixas representa a mediana, as linhas indicam os menores e os maiores valores não discrepantes. Os asteriscos indicam *outliers*

## 4.2 Análises filogenéticas

Sequências de DNA de ITS e TUB2 foram obtidas para todos os 26 isolados estudados neste trabalho, enquanto as sequências de GAPDH foram geradas para cinco isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e três isolados de *C. gossypii*. Análises filogenéticas preliminares das sequências utilizando-se Neighbor-Joining e um conjunto de dados completo de membros do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides* (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012) mostraram que *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* pertencem ao clado *Colletotrichum theobromicola* (dados não mostrados). Análises posteriores das sequências dos genes ITS, TUB2 e GAPDH, utilizando um número mais restrito de isolados de referência, confirmaram este achado (Figura 2-4).

Isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *C. gossypii* e sequências de referência de *C. theobromicola* formaram um grupo monofilético, com 61% de suporte de bootstrap, distinto de outros membros do complexo de espécies *C. gloeosporioides* na árvore de ITS (Figura 2). *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* formaram dois grupos monofiléticos distintos dentro do clado bem suportado de *C. theobromicola*, nas árvores filogenéticas de TUB2 e GAPDH (Figuras 3 e 4, respectivamente), com valores de bootstrap variando de 54% a 68%.

As sequências de ITS, TUB2 e GAPDH foram combinadas e analisadas por máxima verossimilhança, uma vez que nenhum conflito foi observado entre as topologias das árvores de genes individuais. A topologia da árvore resultante foi semelhante à das árvores de genes individuais TUB2 e GAPDH e os clados contendo *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* receberam bom suporte de bootstrap (Figura 5).

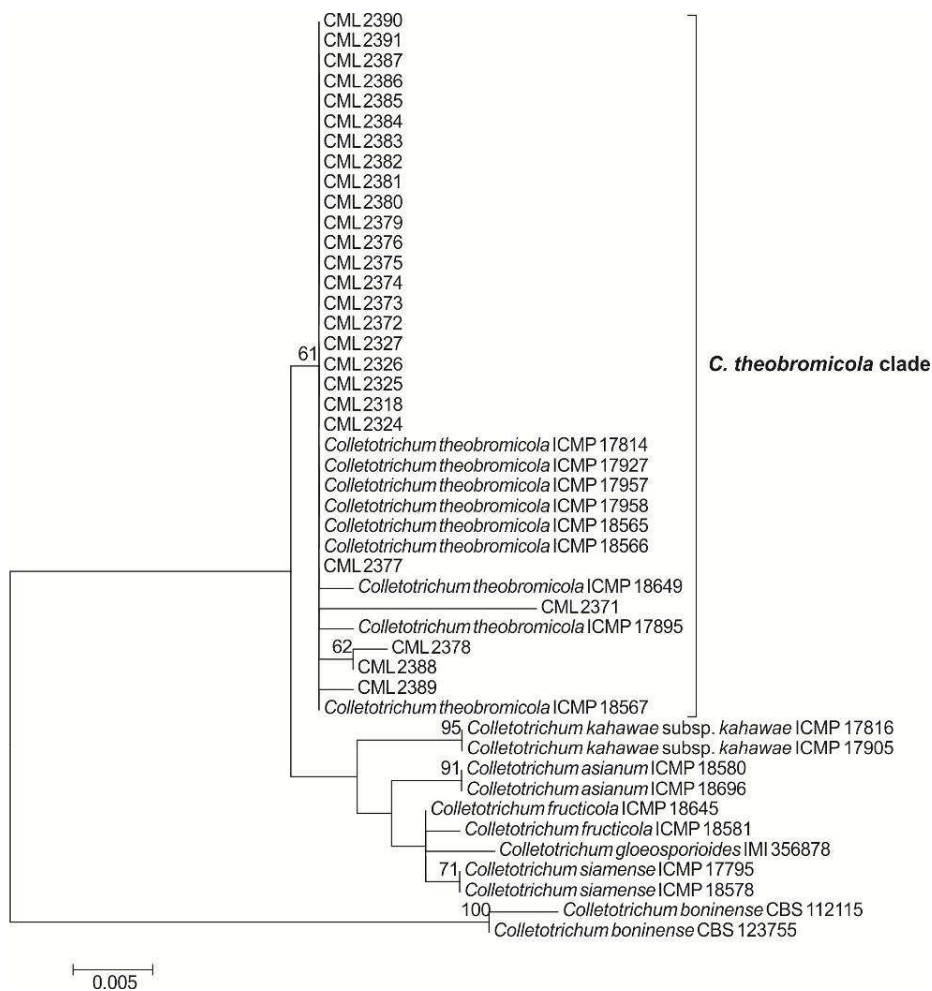


Figura 2 Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências do gene ITS rDNA, mostrando as relações entre *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Colletotrichum gossypii* e outros membros do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*. O modelo Kimura 2-parâmetros foi utilizado para a substituição de nucleotídeos. Os valores de *bootstrap* maiores que 50% (1.000 repetições) estão representados nos nós. *Colletotrichum boninense* (CBS 112115 e CBS 123755) foi utilizado como *outgroup* em todas as árvores

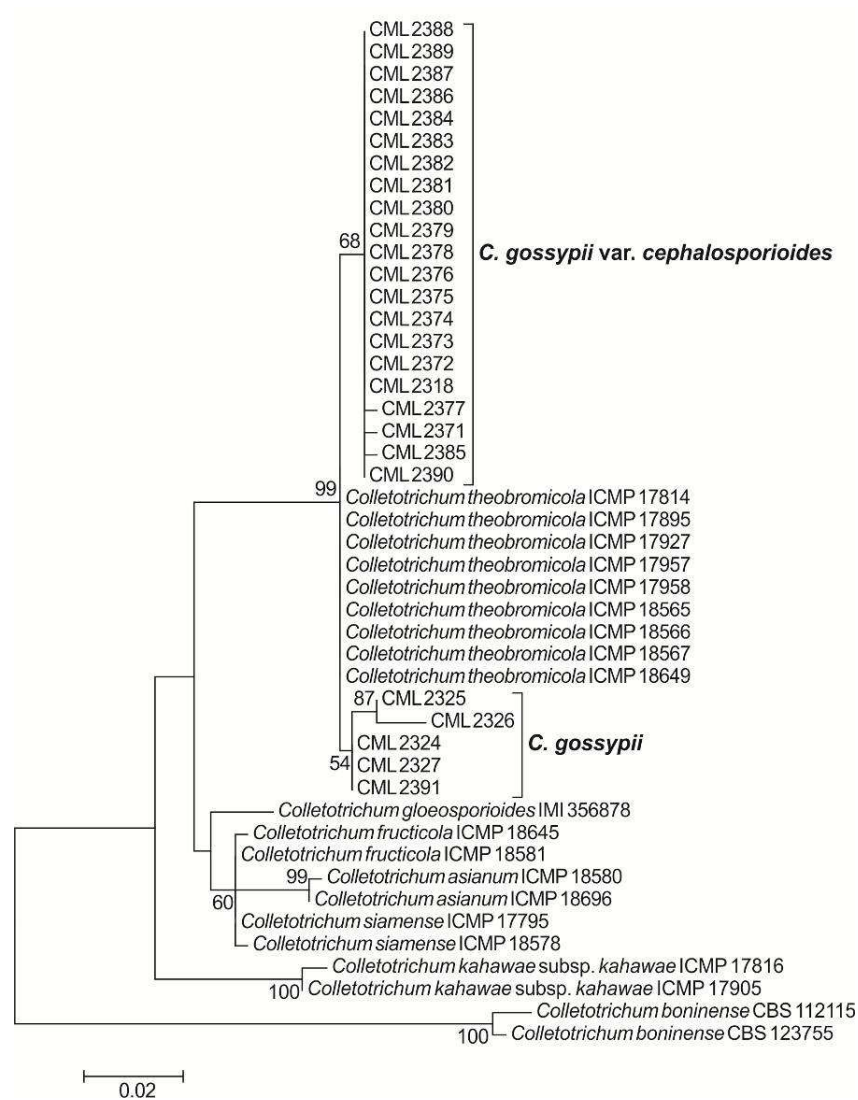


Figura 3 Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências do gene TUB2, mostrando as relações entre *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Colletotrichum gossypii* e outros membros do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*. O modelo Kimura 2-parâmetros foi utilizado para a substituição de nucleotídeos. Os valores de *bootstrap* maiores que 50% (1.000 repetições) estão representados nos nós. *Colletotrichum boninense* (CBS 112115 e CBS 123755) foi utilizado como *outgroup* em todas as árvores

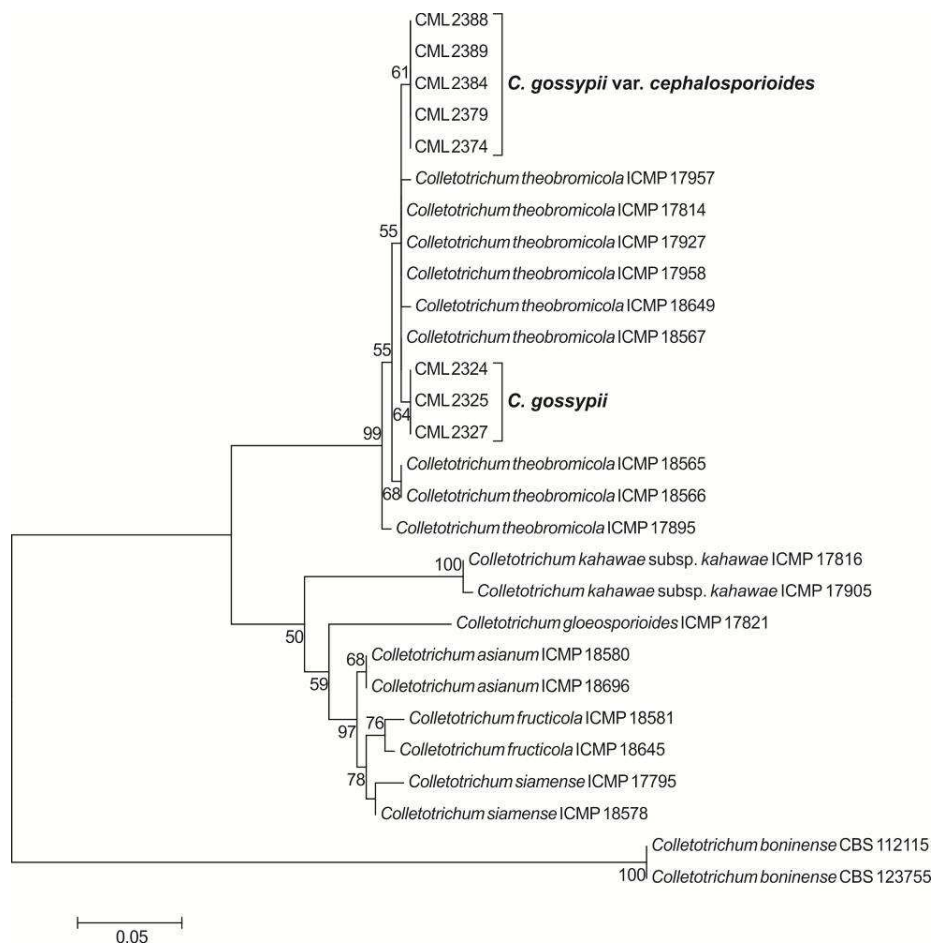


Figura 4 Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências do gene GAPDH, mostrando as relações entre *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Colletotrichum gossypii* e outros membros do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*. O modelo Kimura 2-parâmetros foi utilizado para a substituição de nucleotídeos. Os valores de *bootstrap* maiores que 50% (1.000 repetições) estão representados nos nós. *Colletotrichum boninense* (CBS 112115 e CBS 123755) foi utilizado como *outgroup* em todas as árvores

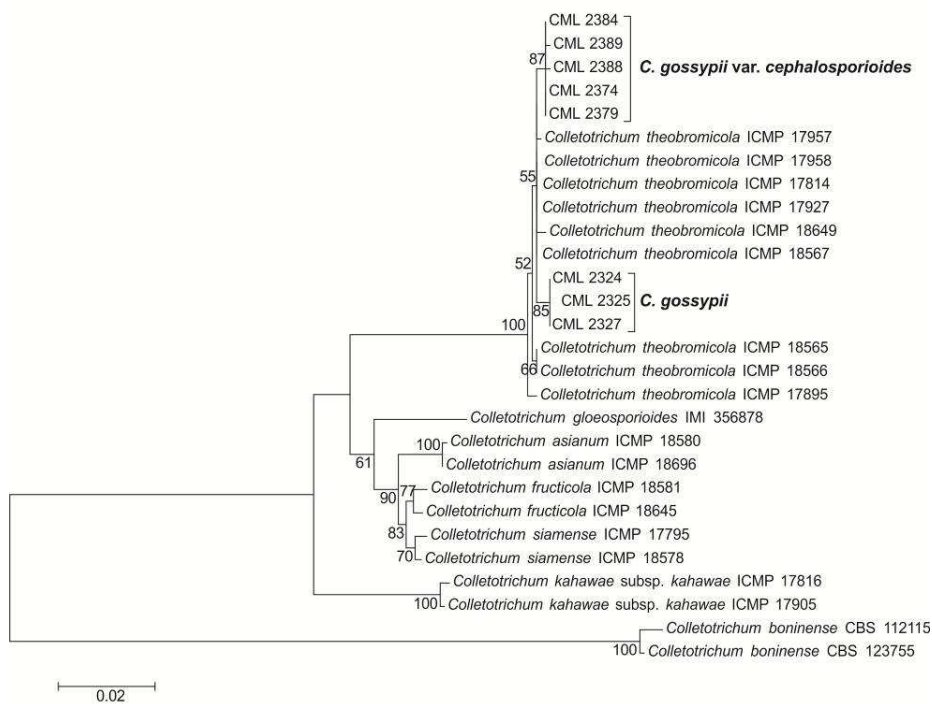


Figura 5 Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida a partir do alinhamento combinado das sequências dos genes ITS rDNA, TUB2 e GAPDH, mostrando as relações entre *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Colletotrichum gossypii* e outros membros do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*. O modelo Kimura 2-parâmetros foi utilizado para a substituição de nucleotídeos. Os valores de *bootstrap* maiores que 50% (1.000 repetições) estão representados nos nós. *Colletotrichum boninense* (CBS 112115 e CBS 123755) foi utilizado como *outgroup* em todas as árvores

### 4.3 Testes de patogenicidade

Plantas inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, 32 dias após emergência (DAE), começaram a exibir manchas foliares necróticas logo aos sete dias após a inoculação (DAI). O desenvolvimento da doença foi mais rápido entre 90 e 121 DAE (58 e 89 DAI) (Tabela 3). A típica necrose foliar em forma de estrela (Figura 6A) pode ser observada durante todo o experimento.

A morte de meristemas apicais (Figura 6B) teve início aos 76 DAE (44 DAI) e o superbrotamento apareceu, pela primeira vez, quando as plantas estavam com 87 dias de idade (55 DAI). Plantas atrofiadas, malformadas, (Figura 6C) puderam ser observadas aos 108 DAE (76 DAI). Os primeiros sintomas da antracnose foliar causada por *C. gossypii* começaram 83 DAE (51 DAI) e, logo, todas as plantas inoculadas exibiram sintomas foliares (Tabela 3). Manchas marrons características de antracnose ocorreram seguindo a nervura central foliar (Figura 6D) e, sem a progressão da doença, os sintomas foram observados até o fim do experimento (Tabela 3).

Quando as plantas foram inoculadas com 52 DAE com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, os sintomas de ramulose progrediram de forma semelhante, com um desenvolvimento mais rápido entre 99 e 121 DAE (47 e 69 DAI) (Tabela 3). A morte de meristemas apicais e o encurtamento de entrenós começaram 89 DAE (37 DAI), o superbrotamento foi observado 111 DAE (59 DAI) e a redução da altura de plantas 128 DAE (76 DAI), quando comparadas com plantas inoculadas com água (Figura 6E). Plantas inoculadas com *C. gossypii* mostraram os primeiros sintomas de antracnose foliar 128 DAE (76 DAI) e uma pequena proporção manteve-se assintomática até o fim do experimento (Tabela 3). O isolado CML 1590 de *C. 'gloeosporioides'* não induziu sintomas da doença em plantas de algodão, durante os testes de patogenicidade (Figura 6F).

Tabela 3 Média e desvio padrão dos sintomas<sup>a</sup> de ramulose (CGC) e antracnose (CG) em plantas de algodão inoculadas com isolados de *Colletotrichum*, aos 32 e 52 dias após a emergência (DAE). Lavras, MG, Brasil

Dias após a emergência (DAE)		Dias após a emergência (DAE)										
		49	62	72	83	90	99	108	121	130	142	160
32	CGC	2,00	2,00	2,00	2,50±0,51	2,85±0,67	3,05±0,76	3,40±0,88	3,85±1,04	3,90±1,07	4,15±1,04	4,25±1,07
	CG	1,00	1,00	1,00	1,19±0,40	1,69±0,48	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	CGLO	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Controle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
52	CGC	-	1,55±0,51	1,80±0,41	1,90±0,31	2,05±0,51	2,15±0,59	2,65±0,93	3,30±1,17	3,35±1,23	3,35±1,23	3,35±1,23
	CG	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,53±0,52	1,93±0,26	1,93±0,26
	CGLO	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Controle	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

CGC – *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*; CG – *Colletotrichum gossypii*; CGLO – *Colletotrichum 'gloeosporioides'*.

<sup>a</sup>Os sintomas foram classificados de acordo com a seguinte escala: 1 - plantas sem sintomas; 2 - plantas com necrose e manchas em folhas jovens; 3 - plantas que apresentam manchas necróticas em folhas e caules, morte dos meristemas apicais e entrenós encurtados; 4 - plantas com necrose e manchas nas folhas e caules, entrenós encurtados e superbrotamento e 5 - plantas mostrando manchas necróticas em folhas, entrenós encurtados, superbrotamento e redução no tamanho

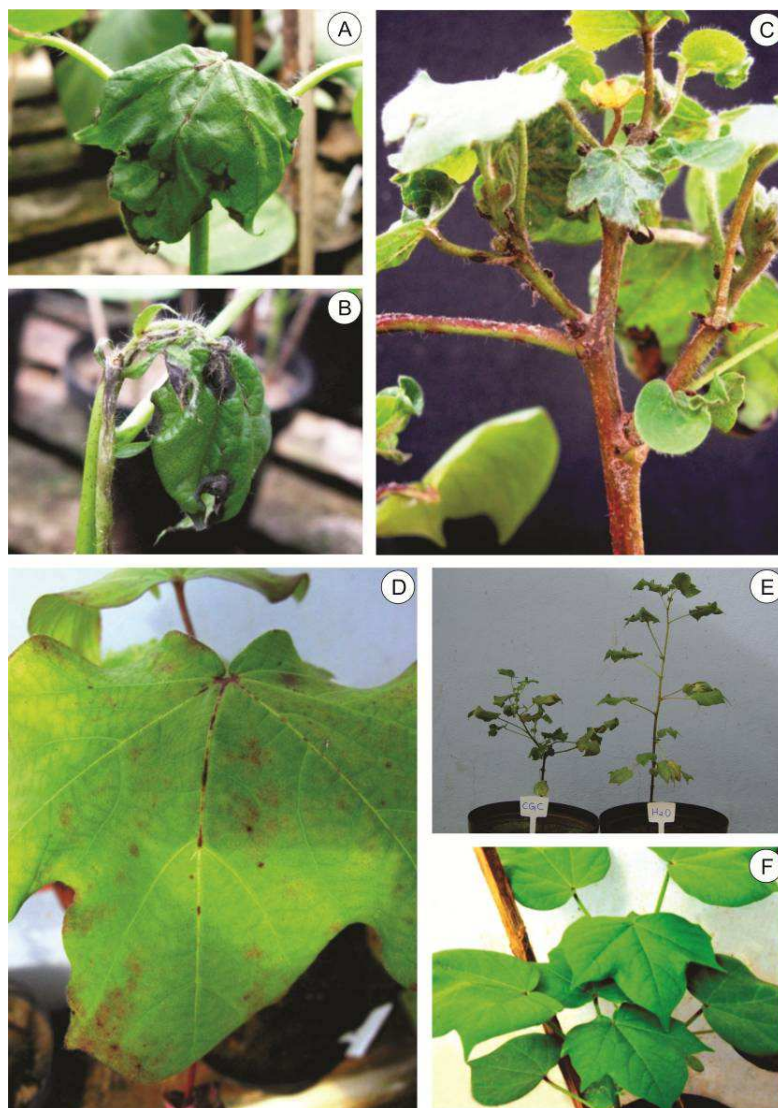


Figura 6 Plantas de algodão com sintomas de ramulose e antracnose. (A) típica necrose foliar em forma de estrela, em folhas inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CGC); (B) morte do meristema apical induzida por CGC; (C) malformação e superbrotamento em planta inoculada com CGC; (D) manchas marrons características de antracnose seguindo as nervuras foliares; (E) redução de porte induzida por CGC e planta testemunha inoculada com água; (F) planta saudável

#### 4.4 Espectrometria de massas MALDI-TOF

Trinta isolados foram analisados por espectrometria de massas MALDI-TOF. Entre os sete isolados que não esporularam, dois deles (CML 2372, CML 2387) não foram analisados porque produziram espectros de massa de baixa qualidade. Os espectros de cada isolado foram combinados em um espectro principal que contém informações sobre os sinais de massa característicos compartilhados pela maioria dos isolados e que, futuramente, servirão de referência para a identificação de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*.

O dendrograma gerado por espectrometria de massas MALDI-TOF compartilhou grupos semelhantes aos das árvores filogenéticas obtidas por sequenciamento de genes. Houve a separação entre os isolados que produzem somente o teleomorfo, isolados não esporulados e isolados bem esporulados. Os isolados teleomórficos (CML 2459, CML 2460, CML 2461) compõem o primeiro grupo e foram classificados como *Colletotrichum* sp. Entre os isolados que não estavam esporulando no momento da análise, houve a distinção em dois grupos, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* (CML 2377, CML 2379, CML 2382) e *C. gossypii* (CML 2325, CML 2391). Os isolados esporulados apresentaram três grupos, dos quais dois representam a mesma espécie filogenética, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. O terceiro grupo formado representa os isolados esporulados classificados como *C. gossypii* (Figura 7).

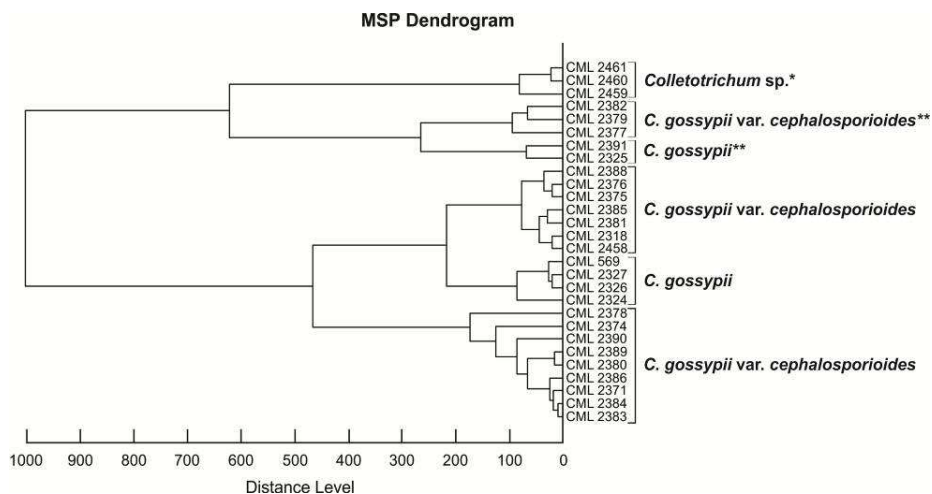


Figura 7 Dendrograma baseado em análises de espectrometria de massas MALDI-TOF, mostrando o agrupamento dos isolados estudados. \*Isolados que produzem somente teleomorfo. \*\*Isolados não esporulados

## 5 DISCUSSÃO

Os objetivos maiores, neste estudo, foram testar a hipótese de que *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* são dois patógenos distintos e compreender as relações filogenéticas entre os isolados obtidos de folhas, maçã e sementes de algodão. A proposta foi utilizar filogenia multigene e a correlação entre o genótipo e o fenótipo (CAI et al. 2009).

Os agentes etiológicos que causam as doenças ramulose e antracnose do algodão no Brasil pertencem a duas linhagens filogenéticas distintas dentro do complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*. Em estudo anterior, utilizando isolados provenientes de plantas da família Malvaceae, Bailey et al. (1996) utilizaram sequências curtas do gene rRNA (ITS2 e o domínio D2 do gene 28S) e também observaram duas linhagens, mas consideraram *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e '*C. gossypii*' como coespecíficas, devido à pequena divergência das sequências entre elas. Nenhum dado de patogenicidade foi fornecido por estes autores e somente três isolados obtidos de algodão foram utilizados. Mais tarde, Silva-Mann et al. (2005) obtiveram padrões de bandas diferentes para *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e '*C. gossypii*', utilizando marcadores AFLP, porém, os resultados foram baseados em apenas dez isolados. Esse tipo de abordagem, estudo de populações, requer maior número de isolados de diferentes regiões.

Nos testes de patogenicidade, isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* começaram a induzir sintomas da doença uma semana após a inoculação e os progressos da ramulose foram semelhantes aos observados em ensaios de campo (MONTEIRO et al. 2009), o que resultou numa elevada proporção de plantas de algodão atrofiadas e malformadas, ao final dos períodos de avaliação, especialmente as plantas inoculadas aos 32 DAE (Tabela 3). Entretanto, plantas inoculadas com *C. gossypii* induziram sintomas foliares

tardios que não progrediram para outras partes da planta. Ambos os patógenos são considerados importantes agentes de tombamento de plântulas (TANAKA; MENTEN; MACHADO, 1996), mas experimentos de inoculação em sementes não foram realizados para confirmar a patogenicidade.

Todos os isolados de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* agruparam dentro do clado delimitado recentemente, *C. theobromicola* (ROJAS et al., 2010; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012), nas análises filogenéticas, mas mantiveram-se como dois subclados distintos nas árvores filogenéticas de TUB2, GAPDH e árvore combinada (Figura 3, 4 e 5). Outro subclado com bom suporte foi formado no interior do clado *C. theobromicola* na árvore filogenética de cinco genes obtida por Weir, Johnston e Damm (2012), mas estes efeitos foram todos devido à sua proximidade filogenética. *C. theobromicola*, agora definido, também inclui isolados de referência de *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* f. *stylosanthis*, dois patógenos de plantas aparentemente específicos aos hospedeiros associados a morango e *Stylosanthes*, respectivamente (BUDDIE et al., 1999; MUNAUT; HAMAIDE; MARAITE, 2002).

Foi confirmado que a região ITS não tem resolução suficiente para a distinção de espécies do gênero *Colletotrichum*, assim como já observado para *C. gloeosporioides* (CANNON; BUDDIE; BRIDGE, 2008). Os nomes dos patógenos do algodão foram mantidos, uma vez que *C. theobromicola* ainda pode ser separado em novas espécies ou variedades. Isso será possível se a especificidade de hospedeiros de isolados patogênicos de plantas puder ser confirmada após inoculações cruzadas (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

As avaliações dos caracteres culturais e morfológicos, tais como o tamanho de conídios e a taxa de crescimento, foram realizadas em combinação com diferentes meios de cultura e de temperatura para as espécies estudadas. Todos os isolados apresentaram grande variação fenotípica, então, a morfologia

não foi informativa para categorizar os isolados, o que foi possível ser observado em outras espécies de *Colletotrichum* (PHOULIVONG et al., 2010; ROJAS et al., 2010). Os caracteres morfológicos não foram úteis no presente estudo, uma vez que não foi possível identificar qualquer marcador morfológico. Mais recentemente, estudos moleculares avançados mostraram a complexidade para distinguir espécies filogenéticas a partir de estudos morfológicos (CROUCH et al., 2009; ROJAS et al., 2010).

O nome de *Colletotrichum gossypii* é atualmente aplicado ao agente etiológico da antracnose do algodão no Brasil, com base na similaridade dos sintomas aos da doença descrita nos EUA (ATKINSON, 1891; SOUTHWORTH, 1890). O agente etiológico da ramulose foi nomeado *C. gossypii* var. *cephalosporioides* depois de ser considerada uma forma mais agressiva de *C. gossypii*, por Costa e Fraga Jr. (1939). *C. gossypii* var. *cephalosporioides* é um nome válido associado a um material tipo existente (IAC 1584, Maio, 24, 1936) (VIÉGAS, 1946), enquanto o nome *Colletotrichum gossypii* é incerto, uma vez que nenhum material tipo está disponível para comparações e estudos filogenéticos (HYDE et al., 2009).

A análise por espectrometria de massas MALDI-TOF lançou uma nova era na rotina dos laboratórios que trabalham com diagnose de microrganismos, demonstrando ser eficaz na identificação de espécies fúngicas e facilitando o diagnóstico (DE RESPINIS et al., 2010). Os MSPs gerados neste estudo demonstraram que os isolados possuem proteínas com informação suficiente para distinção entre as espécies *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. A separação das espécies filogenéticas em grupos distintos na análise por MALDI-TOF não inviabiliza a utilização da análise proteômica, uma vez que o intuito é fazer o diagnóstico das doenças recorrentes no algodoeiro, ramulose e antracnose. Inicialmente, as análises foram realizadas para verificar a eficácia em separar as espécies filogenéticas e compor um banco de dados.

Os resultados obtidos neste estudo dão suporte filogenético para a distinção feita mais de 70 anos atrás das duas formas de *Colletotrichum* causando diferentes doenças em algodão no Brasil (COSTA; FRAGA JR., 1939). A ramulose é uma das doenças mais importantes em cultivos de algodão no Brasil e a correta identificação do seu agente etiológico durante testes de rotina de sanidade de sementes é um requisito ainda por preencher. A disponibilidade de marcadores filogenéticos obtidos a partir de isolados de referência com a patogenicidade conhecida, a partir deste estudo, será útil no desenvolvimento de ensaios baseados em PCR confiáveis para a diagnose de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em amostras de sementes.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente, houve a hipótese de que a ramulose e a antracnose do algodão são causadas por agentes patogênicos distintos. Com o auxílio da metodologia empregada, análises filogenéticas, testes de patogenicidade e análises proteômicas, foi possível confirmar a hipótese que *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii* são duas linhagens filogenéticas distintas.

Com a formação de novas coleções de isolados e a epitificação de *C. gossypii*, nos EUA, será possível uma definição taxonômica mais precisa dos agentes patogênicos da antracnose, de acordo com os conceitos atuais de espécies de *Colletotrichum*. Ainda será preciso verificar se o agente etiológico da antracnose no Brasil é, de fato, o mesmo dos EUA.

O próximo passo é a aplicação do conceito de espécie biológica por meio de cruzamentos e o desenvolvimento de protocolos para a detecção baseada em PCR também deverá ser aplicado com os isolados estudados. É possível vislumbrar a aplicação de espectrometria de massas MALDI-TOF a partir de material vegetal, tornado-a uma análise de rotina. Novos testes de patogenicidade devem ser conduzidos com a inclusão de isolados pertencentes ao clado *C. theobromicola* com inoculações cruzadas em plantas de cacau e algodão.

Os resultados obtidos, juntamente com os resultados futuros, terão importância para a identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas ao algodão, a quarentena, os programas de melhoramento de plantas e o manejo e o controle de doenças.

Grande parte dos resultados obtidos nesse estudo foi incluída em um manuscrito submetido à revista *Phytopathology*, intitulado *Ramulosis of cotton is caused by a distinct phylogenetic lineage within the Colletotrichum gloeosporioides species complex*, de autoria Maria Eloisa Salustiano, Marina

Nunes Rondon, Lucas M. de Abreu, Sarah da Silva Costa, José da Cruz Machado e Ludwig H. Pfenning, em parceria com o Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA, com dedicação exclusiva da Dra. Maria Eloisa Salustiano.

## 7 CONCLUSÃO

Não foi possível determinar marcadores morfológicos para a distinção das duas linhagens, *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* é uma linhagem filogenética distinta de *Colletotrichum gossypii*, e ambas agrupam-se no clado *Colletotrichum theobromicola*, baseado nas análises filogenéticas de TUB2 e GAPDH.

A região ITS não apresenta sítios informativos em número suficiente para a diferenciação das duas linhagens, *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

*Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* são patógenos do algodoeiro e reproduzem sintomas específicos após inoculação.

A análise proteômica por espectrometria de massas MALDI-TOF mostrou ser uma técnica viável para a detecção específica das linhagens *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, com a vantagem de ser rápida e de fácil realização.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. E. et al. Escalas de notas para avaliação de doenças foliares do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4., 2003, Goiânia. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. CD-ROM.
- ATKINSON, G. F. Anthracnose of cotton. **Journal of Mycology**, Washington, v. 6, n. 1, p. 173-178, 1891.
- BAILEY, J. A. et al. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 1076-1083, Oct. 1996.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Sistema integrado de legislação** - Instrução Normativa MAPA 25/2005 - Padrões para produção e comercialização de algodão. Disponível em: <[http://www.lassul.com.br/v1/upload/downloads/file\\_5.pdf](http://www.lassul.com.br/v1/upload/downloads/file_5.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2012.
- BUDDIE, A. G. et al. Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, p. 385-394, Apr. 1999.
- CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Chiang Ray, v. 39, p. 183-204, Dec. 2009.
- CAI, L. et al. The need to carry out re-inventory of plant pathogenic fungi. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, p. 205-213, July/Aug. 2011.
- CANNON, P. F.; BUDDIE, A. G.; BRIDGE, P. D. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 104, p. 189-204, 2008.

CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p.181-213, 2012.

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

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossipium* spp.) In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 41-52.

COSTA, A. S.; FRAGA JUNIOR, C. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 12, p. 249-259, maio/jun. 1937.

COSTA, A. S.; FRAGA JUNIOR, C. Sobre a natureza de ramulose ou superbrotamento do algodoeiro. **Jornal de Agronomia**, Piracicaba, v. 2, p. 151-160, 1939.

CROUCH, J. A. et al. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, Lawrence, v. 101, n. 5, p. 648-656, Sept./Oct. 2009.

DE RESPINIS, S. et al. MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. **Mycological Progress**, Berlin, v. 9, p. 79–100, Mar. 2010.

DRUZHININA, I. S. et al. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, n. 10, p. 813–828, Oct. 2005.

EDGERTON, C. W. The perfect stage of the cotton anthracnose. **Mycologia**, Lawrence, v. 1, n. 3, p. 115-120, May 1909.

EPPO. **Datasheets on quarantine pests**. *Glomerella gossypii*. EPPO quarantine pest. 2009. Disponível em: <[http://www.eppo.int/QUARANTINE/fungi/Glomerella\\_gossypii/GLOMGO\\_ds.pdf](http://www.eppo.int/QUARANTINE/fungi/Glomerella_gossypii/GLOMGO_ds.pdf)>. Acesso em: 15 out. 2012.

HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, Chiang Ray, v. 39, p. 147-183, Dec. 2009.

KIRKPATRICK, T. L.; ROTHROCK, C. S. **Compendium of Cotton Diseases**. 2<sup>nd</sup> ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2001.

MALAGUTI, G. La escobilla del algodón en Venezuela. **Agronomia Tropical**, Maracay, v. 5, n. 1, p. 73-86, 1955.

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

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

MONTEIRO, J. E. B. A. et al. Development of ramulosis disease of cotton under controlled environment and field conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 6, p. 659-665, June 2009.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; MARAITE, H. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 5, p. 579–593, May 2002.

PANACCIONE, D. G.; HANAU, R. M. Characterization of two divergent  $\beta$ -tubulin genes from *Colletotrichum graminicola*. **Gene**, v. 86, n. 2, p. 163-170, Feb.1990.

PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Chiang Ray, v. 44, p. 33-43, Oct. 2010.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee in northern Thailand. **Fungal Diversity**, Chiang Ray, v. 39, p. 89-109, Dec. 2009.

ROJAS, E. I. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, Lawrence, v. 102, n. 6, p. 1318-1338, Nov./Dec. 2010.

SANTOS, C. et al. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 2, p. 375-385, Feb. 2010.

SILVA-MANN, R. et al. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 27-32, jan./fev. 2002.

SILVA-MANN, R. et al. AFLP markers differentiate *Colletotrichum gossypii* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 169-172, mar./abr. 2005.

SOUTHWORTH, E. A. Anthracnose of cotton. **Journal of Mycology**, Washington, v. 6, n. 1, p. 100-105, Jan. 1890.

TALHINHAS, P. et al. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 9, p. 986-996, Sept. 2002.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, May 2011.

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

TEMPLETON, M. D. et al. Cloning and molecular characterization the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene**, v. 122, n. 1, p. 225-230, Dec. 1992.

VIÉGAS, A. P. Alguns fungos do Brasil XII. Fungi Imperfecti – Melanconiales. **Bragantia**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 1-37, jan. 1946.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, n. 1, p. 115-180, Aug. 2012.